



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**DIFERENCIACIÓN SEXUAL: BIOLOGÍA
MOLECULAR Y SUS DESORDENES**

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

JONATHAN ENRIQUE SALAZAR MORALES

**DIRECTOR DE TESINA
DR. LUIS RAMOS TAVERA
ASESOR INTERNO
DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**

CIUDAD DE MÉXICO A 30 DE MAYO DE 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **SALAZAR MORALES JONATHAN ENRIQUE**, con número de cuenta **308325823**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **30 de mayo de 2017** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

VOCAL Dr. LUIS RAMOS TAVERA*

SECRETARIO Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

SUPLENTE Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

SUPLENTE Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

Angélica Flores Ramírez
Luis Ramos Tavera
Leticia Morales Ledesma

Lucila Álvarez Barrera

Juan José Rodríguez Mercado

El título de la tesina que presenta es: **Diferenciación sexual: biología molecular y sus desordenes.**

Opción de titulación: Tesina

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 18 de abril de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

“Un profesional que no se apasiona, es un estorbo con conocimiento”. Yokoi Kenji

Agradecimientos

A mis padres, Elsa Morales y Enrique Salazar,
por su apoyo incondicional durante el desarrollo
de mi carrera académica y sobre toda decisión
que he tomado en mi vida.

A mi Universidad, a la ENP 2, la FES Zaragoza
y los miembros de mi comité tutorial por su
acertada opinión en la realización de este
trabajo.

A familiares y amigos que me aportaron ideas,
momentos y viajes; que estuvieron ahí a su manera
cuando los necesité.

Mención especial: Mary Sandoval, Alberto
Aguilera, Oscar Romero, Edwin Duarte,
Catalina Solano, Erik Brambila, Isabel Pérez,
Juan Reyna, Marcelino López, Ángel Lima, Pedro
Jiménez, David Villafaña, Marcos Rivera, Emilio Paz,
Oscar Cabrera, Raquel Montero, Nadia Ortiz,
Gabriel Vallecillo, Monse Maravilla, Carlos Toral,
Amanda Zúñiga, Erik De Jesús, Erandy Villegas,
Orlando Juárez, Edgar Guillén, “Los Zaragozauros” y algunos
otros que espero me disculpen por no mencionar.

Reconocimientos

Esta revisión se realizó en el laboratorio de Bioquímica Hormonal, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Mi más grande respeto y admiración al Dr. Luis Ramos Tavera, por su calidad humana y profesional. Agradezco me haya aceptado en su grupo de trabajo y me haya enseñado lo necesario para ser un profesional y mejor persona.

A los compañeros del laboratorio: Lizz, Erika, Raziél, Karla Tovar, Aurora Sainz y Karlita Zaragozana.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Diferenciación sexual	2
1.2 Genes reguladores	14
1.3 Diferenciación ovárica	27
1.4 Diferenciación testicular	30
1.5 Andrógenos	33
1.6 Esteroidogénesis	37
1.7 <i>AKR1C2</i> y <i>HSD17B6</i>	41
1.8 Desordenes del desarrollo sexual	44
2. JUSTIFICACIÓN	48
3. OBJETIVOS	49
4. METODOLOGÍA	50
5. DISCUSIÓN	51
6. BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

Durante la embriogénesis, el mecanismo de diferenciación sexual depende de un grupo de genes determinantes de la masculinización y feminización localizados en cromosomas autosómicos y cromosomas sexuales. Los andrógenos testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT) inducen la diferenciación sexual del fenotipo masculino durante el desarrollo. En varones 46,XY las mutaciones en la esteroidogénesis generan Desordenes del Desarrollo Sexual (DSD) caracterizado por ambigüedad de genitales externos, criptorquidia, micropene, hipospadias penoescrotales o azoospermia a genitales externos completamente femeninos; no obstante esto muchas malformaciones congénitas heredables siguen sin explicarse y sugieren que no todos los factores génicos han sido identificados, al respecto hemos concluido que la etiología de este defecto congénito puede ser una condición multifactorial, en donde varios genes pueden estar implicados. Ante este contexto la pregunta que surge es ¿Qué genes podrían estar involucrados como causa de DSD? El objetivo de esta revisión bibliográfica es identificar información científica relacionada a la diferenciación sexual y asociarla a desordenes genéticos y de la esteroidogénesis. Si bien el número de genes aquí presentados es limitado, los datos permiten concluir que las mutaciones inactivantes en genes involucrados en la diferenciación sexual son una causa frecuente de DSD, esto no descarta la posibilidad que otros genes estén involucrados en la patogénesis de este defecto congénito.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Diferenciación sexual

En mamíferos, el programa biológico de diferenciación sexual puede ser dividido en dos etapas sucesivas: (i) determinación del sexo y (ii) diferenciación del sexo. El proceso de determinación del sexo (cromosómico) se inicia en el momento de la fertilización, cuando el pronúcleo del espermatozoide que posee un cromosoma “X” o un cromosoma “Y” fertiliza el pronúcleo del ovocito que solo porta un cromosoma “X”, dando como resultado un macho XY o una hembra XX (Almiñana et al., 2014).

Se ha argumentado que los cromosomas sexuales XX y XY de mamíferos se originaron a partir de un par de autosomas hace aproximadamente 300 millones de años (Delbridge y Graves, 1999; Lahn et al., 2001). En mamíferos placentarios y marsupiales el mecanismo de determinación del sexo es similar, lo que implica que surgió antes de su divergencia hace 148 millones de años. Sin embargo, una diferencia muy notable entre prototerios y metaterios son sus cromosomas sexuales: en monotremas machos se presentan múltiples cromosomas sexuales complejos que forman una cadena durante la meiosis, mientras que en marsupiales se tiene típicamente un sistema cromosómico XX para hembras y XY para machos (Deakin 2015).

El cromosoma X de humanos abarca aproximadamente 160 Mb y se han determinado múltiples genes que experimentan inactivación para equilibrar la expresión de genes ligados al cromosoma X entre varones y hembras. La

inactivación del cromosoma X en cada célula femenina se produce durante la fase de blastocisto tardío entre los días 7 y 18 del desarrollo embrionario (Grumbach y Conte, 1998).

De acuerdo a la hipótesis de Lyon formulada en 1961, el cromosoma X de mamíferos es único en el genoma debido a su alto grado de conservación y a la inactivación de uno de sus dos cromosomas X presentes en hembras. En 1959 Ohno demostró que la inactivación de uno de los cromosomas X resulta en la formación de una partícula heterocromática adyacente a la membrana nuclear denominada corpúsculo de Barr (Fig. 1). Murray Barr en 1949 demostró que este corpúsculo no está presente en machos XY y únicamente se encuentra en células femeninas (Harper 2011).

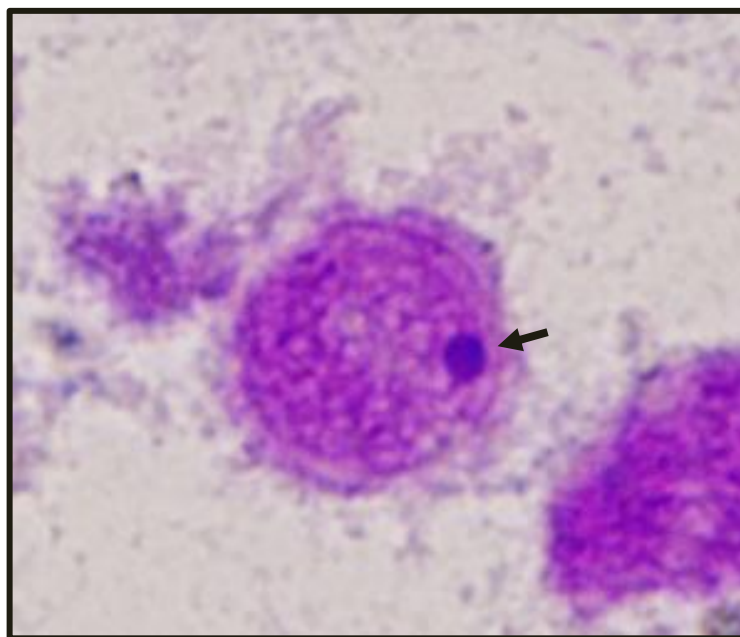


Fig. 1. Corpúsculo de Barr de humano teñido con azul de toluidina. 100X. Imagen tomada en el departamento de Biología de la Reproducción, laboratorio de Bioquímica Hormonal. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Los procesos de inactivación del cromosoma X se llevan a cabo en un locus multifuncional denominado XIC, que está localizado en Xq13 y que contiene los elementos necesarios para el recuento del número de cromosomas X, para la elección del X que será silenciado y para el propio mecanismo de silenciamiento acompañado por múltiples cambios epigenéticos. Este locus incluye el gen *XIST*, un gen de 32 kb que transcribe un RNA no codificante de 19 kb. El RNA es procesado y poliadenilado pero no se traduce. La expresión de *XIST* es necesaria para iniciar el silenciamiento del cromosoma X, pero no para los mecanismos de conteo, elección o posterior mantenimiento del mecanismo de silenciado cromosómico.

En el locus XIC se localiza el mecanismo de conteo y de elección cromosómica, que dependen del locus XCE. Adicional al incremento de expresión de *XIST* se requiere de factores génicos ubicados a varias kb del mismo locus XIC. Uno de ellos es el gen denominado *RNF12*, situado a 500 kb en dirección 5' del gen *XIST*, que codifica para una proteína con actividad de ubiquitina-ligasa y que activa la expresión de *XIST*. Otro factor génico implicado en la activación de *XIST* es el gen *JPX*, que transcribe un RNA no codante y que aún se desconoce a detalle su mecanismo de acción (Avner y Heard, 2001; Payer 2016).

Uno de los factores génicos indispensables para mantener la expresión del gen *XIST* en uno de los dos cromosomas X es el gen anti sentido denominado *TSIX* y cuyo transcrito se empalma parcialmente con el RNA codificado por *XIST*. *TSIX* mantiene un patrón de expresión muy semejante a *XIST*. En etapas tempranas se expresan ambos alelos, pero al inicio de la inactivación se expresa

únicamente el alelo del cromosoma X que permanecerá activo. Esto ha sugerido que la expresión de *TSIX* desempeña un papel importante en la expresión transitoria de *XIST* y en la elección del cromosoma que finalmente será inactivado. La regulación de la expresión del gen *TSIX* es controlada por el factor CTCF, el cual se une a una región de metilación diferencial, llamada DXPas34, sólo cuando la región se encuentra desmetilada (Avner y Heard, 2001; Pinter 2016).

Después de seleccionar el cromosoma inactivo y de procesar el inicio del silenciamiento, los cambios siguientes son el mantenimiento del mecanismo de silenciado cromosómico. El mecanismo de mantenimiento del silenciado consiste en recubrir todo el cromosoma X con el RNA codificado por *XIST* y desencadenar los cambios característicos de un cromosoma X inactivo: metilación de las islas CpG, desacetilación de histonas, replicación tardía en la fase S, presencia de una histona especial (macroH2A) en lugar de H2A. Recientemente, se ha observado que la lisina 27 de la histona H3 está metilada en el cromosoma X inactivo.

En el cromosoma X que permanecerá activo el RNA codificado por *XIST* no llega a estabilizarse y el propio gen *XIST* se silencia y detiene su expresión. Embriológicamente en un cariotipo XY sólo existe la expresión baja y transitoria del gen *XIST* de origen materno y que nunca se inactiva porque el mecanismo de conteo detecta la presencia de un solo cromosoma X (Avner y Heard, 2001; Moindrot y Brockdorff, 2016). Los estudios de genética molecular han mostrado que la inactivación sesgada del cromosoma X en mujeres (OMIM 300087) es causada por mutaciones en el gen *XIST*. El diagnóstico clínico en este grupo de mujeres se ha asociado a distrofia muscular y a posibles abortos espontáneos.

La inactivación del cromosoma X no es completa y no afecta a todos los genes del cromosoma X. Se ha reportado que un 65% de los genes presentes en el cromosoma X se inactivan; un 20% de los genes se inactivan sólo parcialmente y un 15% evitan totalmente el mecanismo de inactivación. Para estos genes existen dos copias funcionales en cariotipos XX pero sólo existe una copia en cariotipos XY. Para evitar diferencias de dosis génica algunos de estos genes que escapan a la inactivación presentan un gen homólogo funcional en el cromosoma Y. Este mecanismo de compensación hace que ambos sexos tengan la misma dosis génica funcional (Avner y Heard, 2001; Balaton y Brown; 2016). La inactivación del cromosoma X ciertamente está presente en marsupiales y monotremas, pero el fenotipo y los mecanismos difieren cualitativamente de mamíferos placentarios.

El cromosoma Y es todo lo contrario al cromosoma X, es muy pequeño y genéticamente esta carente de genes (tiene aproximadamente 40). En su mayoría estos genes están asociados a la determinación testicular y espermatogénesis (Graves 1996; Avner y Heard, 2001). El gen *SRY* localizado en el cromosoma Y es un factor transcripcional necesario para el establecimiento de la determinación testicular y se ha establecido que evolucionó a partir del gen *SOX9*, un gen autosómico en monotremas (Swain y Lovell-Badge 1999; Deakin 2015) y en aves, en este último grupo la determinación del sexo es homogamética (ZZ) para machos y heterogamética (ZW) para hembras (Zarkower 2001).

El cromosoma Y de humanos está constituido estructuralmente por tres regiones: una región masculina específica del Y (*MSY*), una región

pseudoautosómica (PAR1 Y PAR2) y una región de heterocromatina sobre Yq. Las regiones PARs contienen 20 genes que codifican para proteínas (16 genes en la región PAR1 y 4 genes en la región PAR2) y que a su vez también están presentes en el cromosoma X. La región MSY contiene 23 genes que codifican para proteínas y numerosos pseudogenes. Mientras que los genes en la región PARs están presentes en ambos cromosomas sexuales y son sometidos a recombinación meiótica de manera similar con genes autosómicos (Helena y Morris, 2007). Los genes en la región MSY son excluidos de la recombinación meiótica con una pareja de cromosomas homólogos.

Los genes MSY evolucionaron hace unos 300 millones de años después del comienzo de la diferenciación X-Y. Los genes *MSY* son clasificados en dos grupos en función de sus patrones de expresión. Los genes del Grupo-I se expresan de manera ubicua y los genes del Grupo-II se expresan específicamente y predominantemente en testículos. Se ha postulado que los genes del Grupo-I *MSY* funcionan como reguladores de la expresión génica y la estabilidad de las proteínas así como al mantenimiento de la dosis ancestral de pares de genes homólogos X-Y, por ejemplo, *DDX3Y*, *EIF1AY*, *KDM5D*, *RPS4Y*, *TBL1Y*, *USP9Y*, *UTY* y *ZFY*. Las expresiones ubicuas y/o somáticas de genes *MSY* sugieren que la expresión equilibrada entre sus genes y sus homólogos X podrían ser cruciales para mantener la condición saludable en los varones.

En humanos, 12 de 14 genes funcionales X-Y apareados (86%) escapan a la inactivación del X en el sexo femenino, para mantener de este modo el equilibrio de dosificación de X-Y de genes apareados. Por otro lado, los genes del Grupo-II,

incluyendo *HSFY*, *SRY*, la proteína de unión al RNA, el gen ligado al Y (*RBMY*), la proteína-testículo específica y el gen codante-Y (*TSPY*) pueden desempeñar diversas funciones a partir de sus homólogos X (Lahn y Page, 1997; 1999; Skaletsky et al., 2003; Ginalski et al., 2004; y Morris, 2007; Jangravi et al., 2013; Bellott et al., 2014).

El hallazgo de una constitución cromosómica sexual 47,XXY en varones con síndrome de Klinefelter y de sólo un cromosoma X en mujeres con el síndrome de Turner, proporcionó las bases para establecer que el cromosoma Y contenía un Factor Determinante Testicular (TDF) y que puede inducir el desarrollo gonadal incluso en presencia de dos o más cromosomas X. La presencia de un cromosoma Y estimula la diferenciación testicular incluso en individuos con una constitución cromosómica sexual 49,XXXXY; mientras que no se produce diferenciación testicular en los individuos 45,X0 (Goodfellow, 1993). Además de esto, los análisis en cuatro pacientes varones con cariotipo XX y presencia testicular demostraron la translocación de una pequeña región del cromosoma Y sobre el cromosoma X, esto permitió sugerir que en el humano la región determinante del sexo se localizaba sobre el cromosoma Y (Palmer et al., 1989; Sinclair et al., 1990).

La determinación cromosómica XX y XY se observa a partir de mamíferos euterios, metaterios y prototerios, no obstante esto; el grupo de monotremas carece del gen *SRY*, cuyo mecanismo de determinación sexual está controlado por el gen *DMRT1*. El origen del gen *SRY* está representado por un evento de duplicación del gen *SOX* (Foster et al., 1994).

En 1990 el grupo de Sinclair identificó un gen denominado *SRY* (región determinante del sexo Y), ubicado en la región determinante del sexo y adyacente al límite pseudoautosómico del cromosoma Y. En el hombre el *SRY* consta de 3.8 kb a lo largo del cromosoma Y (Yp11.2). El gen *SRY* carece de intrones y presenta un marco de lectura abierto que codifica para un factor transcripcional de 204 aa con una masa molecular de 24 kD (Su y Lau, 1993). Posteriormente, el homólogo *Sry* de ratón fue clonado y se encontró que esta región le confiere masculinidad sobre un cariotipo XX e interesantemente se expresaba en el borde urogenital justo antes de la formación de los cordones testiculares, siendo esto la primera diferencia entre machos y hembras durante la embriogénesis. Múltiples estudios en mamíferos han reportado la importancia del *SRY* como un gen “maestro” que controla y regula el desarrollo de la gónada bipotencial hacia la formación de los testículos (Gubbay et al., 1990).

Las mutaciones en el gen *SRY* han sido identificadas en el 1% de los individuos con DSD 46,XY y en un 15% en individuos con Disgenesia Gonadal Completa 46,XY (OMIM 480000). Las mutaciones génicas del *SRY* suelen surgir *de novo* en la espermatogénesis; no obstante esto, algunas son hereditarias y por lo tanto específicas del desarrollo masculino (origen paterno). Braun et al. (1993) y Maier et al. (2003) han reportado independientemente casos de hermafroditismo verdadero 46,XY con mutaciones en el gen *SRY*. La reversión del sexo fenotípico en estos pacientes está asociada a ausencia testicular e infertilidad, aunque en algunos casos reportados se ha descrito ambigüedad de genitales (Veitia et al., 1997).

La segunda etapa denominada diferenciación del sexo (gonadal y fenotípica) es por definición un dimorfismo sexual que describe las diferencias morfológicas entre el sexo femenino y el masculino. En la diferenciación sexual masculina se lleva a cabo la formación de los genitales internos o conductos de Wölff (epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales) y externos (escroto, pene y uretra peneana). En machos la Hormona AntiMülleriana (AMH) provoca la regresión de los conductos de Müller; mientras que en la diferenciación sexual femenina los conductos de Müller se diferencian en oviducto, útero y tercio superior de la vagina (Teixeira, 1996; Grumbach y Conte, 1998).

La diferenciación sexual, en mamíferos masculinos es una consecuencia de la síntesis de hormonas de origen gonadal. Por lo tanto, el desarrollo del fenotipo masculino y el dimorfismo sexual sólo puede ocurrir cuando los testículos fetales segregan dos hormonas clave en un período crítico en la gestación temprana, un fenómeno embriológico aclarado por los estudios de Jost et al (1953). La AMH y el andrógeno T son las dos hormonas clave producidos por el testículo para asegurar el desarrollo masculino. Además, un componente clave en este proceso es la expresión del desarrollo de receptores transmembranales y/o nucleares afines para estas dos hormonas en los tejidos blanco (di Clemente et al., 1994; Chávez et al., 2001).

La AMH es una glicoproteína sintetizada en las células de Sertoli fetales durante la 8-10 semana de gestación del humano y pertenece a la superfamilia de las TGF- β o factor de crecimiento transformante beta, en donde se incluye la inhibina y la activina. La AMH induce apoptosis de las células epiteliales de los

conductos Müllерianos mediante unión a sus receptores transmembranales denominados tipo I y tipo II (Hughes 2001). El gen *AMH* ha sido mapeado en el cromosoma 19p13.3-p13.2 y está constituido por 5 exones que codifican para un polipéptido de 560 aa (Cohen-Haguénauer et al., 1987).

Después de la determinación testicular, la biosíntesis y acción de los andrógenos es el requisito esencial para la diferenciación sexual masculina. El control de la esteroidogénesis testicular gonadotrópica fetal, inicialmente regulada por la gonadotropina coriónica humana (hCG) y más tarde por la hormona luteinizante (LH); es regulado a través del receptor LH/hCG de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G. En las gónadas del conejo, la regulación en la biosíntesis de testosterona fetal temprana parece ser un mecanismo independiente de gonadotropinas, mientras que estudios en ratones con alteraciones en el gen del receptor de *LH/hCG* mostraron una diferenciación normal pero con genitales hipoplásicos. En humanos, las mutaciones inactivantes en el receptor de LH dan lugar a diferentes fenotipos en los varones, incluyendo reversión sexual completa, genitales ambiguos o únicamente micropene aislado (George et al., 1978; Misrahi et al., 1998; Themmen y Huhtaniemi, 2000; George et al., 2001).

El ovario fetal en desarrollo es esteroidogénicamente activo en rumiantes como cabras (Pannetier et al., 2006), ovejas (Mauléon et al, 1977; Quirke et al, 2001) y ganado (Shemesh, 1980; Yang y Fortune, 2008). En general, en estas especies, la actividad esteroidogénica es elevada antes del inicio de la meiosis fetal femenina. El contenido de estradiol y andrógenos gonadales y la secreción de

estradiol disminuyen cuando inicia la profase I de la meiosis (Shemesh et al., 1978; Quirke et al., 2001). Además, los estrógenos han mostrado ser cruciales para la diferenciación ovárica adecuada en diferentes especies de marsupiales (Fadem y Tesoriero, 1986; Coveney et al, 2001); peces (Krisfalusi y Cloud, 1999; Guiguen et al, 1999) reptiles (Pieau et al., 1999) y aves (Scheib, 1983; Elbrecht y Smith, 1992; Wade y Arnold, 1996). Estos datos en conjunto apoyan la hipótesis de que los estrógenos desempeñan un papel importante en el control de la diferenciación del ovario durante la vida fetal de algunos mamíferos. Por el contrario, el ratón, uno de los modelos más estudiados en la determinación del sexo y el desarrollo de las gónadas, no presenta esteroidogénesis ovárica durante la vida fetal (Fisher et al, 1998). Los ratones con mutación nula de los genes *Cyp19*, *Star* (Hasegawa et al., 2000) o el receptor de estrógenos (Couse et al., 1999; Dupont et al, 2000) no presentan fenotipos anormales en los ovarios de neonatos.

La carencia de genes candidatos para la determinación del ovario ha propuesto la idea errónea que el desarrollo del ovario sigue una vía por “default” o “pasiva”, la cual es llevada a cabo en ausencia del gen *SRY*. A la fecha aún no se ha identificado un gen candidato, equivalente al *SRY* o *SOX9*, que controle la diferenciación del sexo femenino y específicamente la determinación del ovario durante la etapa embrionaria; por lo que los mecanismos que determinan la formación del ovario son aún pobremente conocidos. No obstante, recientemente la determinación pasiva del ovario ha sido puesta en duda debido a la obtención de datos que demuestran la expresión de genes que podrían estar determinando

la diferenciación del ovario. Algunos reportes han demostrado que los genes *DAX1*, *WNT4*, *FOXL2* y *RSPO1* podrían estar implicados en la determinación del ovario durante esta etapa embrionaria.

El programa de diferenciación sexual cerebral es regulado por la acción de hormonas esteroideas de origen gonadal y presentan la habilidad de establecer los núcleos cerebrales sexualmente dimórficos en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Neil et al, 1981). Este modelo de diferenciación sexual controlado por esteroides no es válido para marsupiales, en esta infraclase de mamíferos terios, el desarrollo inicial del escroto, marsupio y glándula mamaria no es controlado por hormonas de origen gonadal (O et al., 1988).

La constitución génica de los cromosomas sexuales es determinante para la diferenciación sexual masculina o femenina de la gónada primitiva. La expresión de un gen localizado en el cromosoma Y ha sido reportada como indispensable para la diferenciación testicular; no obstante esto, otros genes tanto autosómicos como localizados en el cromosoma X son también necesarios para la diferenciación del testículo fetal. Se ha descrito que la diferenciación sexual en mamíferos es controlada por una cascada de diferentes genes reguladores localizados en los cromosomas sexuales y autosomas (Grumbach, 1998).

1.2 Genes reguladores

Durante el desarrollo fetal temprano, ambos sexos cromosómicos XX o XY poseen primordios gonadales indiferenciados con tendencia a la feminización o a la masculinización dependiendo de la constitución génica. Hacia la 5ª semana de vida fetal, cuando la cavidad celómica está completamente formada, el mesodermo intermedio forma un pliegue longitudinal dirigido hacia el interior de la cavidad, denominado borde urogenital. Las células procedentes de esta región se diferencian para formar el primordio gonadal (mesonefros), el riñón (metanefros) y la glándula suprarrenal (pronefros), siendo ya aparente a finales de la 5ª semana (Capel 2000; Ono y Harley 2013; Eggers et al., 2014).

Aun cuando el esquema molecular de la determinación sexual en mamíferos no ha sido dilucidado totalmente se sabe que *SRY* y *SOX9* son genes reguladores para el inicio de la determinación de la gónada masculina alrededor de la 6ª semana de gestación cuando el borde urogenital indiferenciado se desarrolla en una gónada bipotencial, mientras que los genes *DAX1* (Bardoni et al., 1994), *WT1* (Kriedberg, 1993), *LIM1* (Kobayashi et al., 2004), *SF1* (Morohashi 1999), *GATA4* y *FOG2* (Tevosian et al., 2002) son considerados como los genes principales responsables para controlar la morfogénesis y la diferenciación testicular (Hanley et al., 2000).

En la 6ª semana del desarrollo embrionario, el factor transcripcional *SOX9* (*SRY-BOX 9*) controla la formación de testículos a partir de la gónada bipotencial. El gen que codifica la proteína *SOX9* es esencial para el desarrollo sexual y la

condrogénesis. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 17 en q24.1-q25.1 (Tommerup et al., 1993). El gen *SOX9* codifica para un polipéptido de 509 aa con una masa molecular de 56 kDa y contiene un dominio HMG homólogo al gen *SRY* (104-182). El dominio presenta 71 % de similitud entre ambos genes. El extremo C-terminal de la proteína tiene una región rica en prolinas y glutaminas similar a los dominios de activación presentes en algunos factores de transcripción. La proteína *SOX9* se localiza en el citoplasma de células somáticas de la gónada indiferenciada de ambos sexos.

En el momento de la determinación testicular, la diferenciación de células de Sertoli y por tanto de la expresión de la AMH, la proteína *SOX9* se localiza en el núcleo de las células de Sertoli del testículo, mientras que en las mujeres este gen se encuentra apagado. El gen *SOX9*, expresado conjuntamente con el gen *SRY*, regula múltiples genes involucrados en la diferenciación testicular (Cox et al., 2011). En el curso del desarrollo testicular, *SOX9* reprime la expresión del gen *WNT4* quien a su vez actúa sobre el gen *DAX1* durante el desarrollo ovárico. Durante la condrogénesis del ratón, el gen *Sox9* es expresado conjuntamente con la colagenasa tipo II (*Col2a1*), la principal proteína de la matriz del cartílago (Bell et al., 1997) y se ha sugerido que la expresión de *COL2A1* durante la formación del hueso es directamente regulada por la proteína *Sox9*.

Los ensayos realizados por Murakami et al. (2000) han sugerido que la señalización mediante FGF y MAPK desempeña un papel importante en la regulación de la expresión de *SOX9* durante la diferenciación de condrocitos. Al respecto, el gen *SOX9* ha sido asociado a una patología ósea denominada

displasia campomélica (OMIM 608160), un desorden génico autosómico dominante caracterizado por el acortamiento y arqueamiento de los huesos tubulares largos, especialmente las extremidades inferiores, así como también por presentar escapula hipoplásica, hombros subdesarrollados, ausencia del par 12 de las costillas, curvatura anormal de la columna vertebral, discapacidad auditiva y genitales ambiguos. Además, el *SOX9* ha sido asociado en pacientes con reversión sexual 46,XY (Foster et al., 1994). Asimismo, se ha reportado que la duplicación de *SOX9* en un individuo 46,XX ocasiona reversión sexual en ausencia de *SRY*.

El desarrollo adecuado del eje hipotálamo–hipófisis–gónada ha sido asociado al receptor huérfano denominado NRB01 o *DAX1* (Dosis sensible a la reversión sexual). El *DAX1* ha sido descrito como un gen anti-testicular y un gen responsable para la adecuada formación de la glándula suprarrenal en el adulto. El polipéptido es codificado por el gen *NR0B1*, consta de 2 exones separados por un intrón de 3.4 kb y ha sido mapeado sobre el cromosoma Xp21.2. *DAX1* es un receptor nuclear huérfano de 470 aa con un dominio de unión al DNA en el extremo NH₂ terminal. El dominio está compuesto por dedos de zinc altamente conservados entre la superfamilia de receptores nucleares. El extremo carboxilo terminal muestra un dominio de unión al ligando, característica típica de un receptor a hormonas esteroideas.

En la etapa de formación del borde urogenital se ha reportado que *DAX1* antagoniza la acción del gen *SRY* (Swain et al., 1998); sin embargo Meeks et al., (2003) demostraron que los genes *NR0B1* y *SRY* son necesarios para la

formación testicular normal. Estas evidencias han puesto en conflicto la posible participación del gen *DAX1* en el desarrollo del ovario. Los ensayos moleculares han establecido que el *DAX1* es un represor transcripcional de la expresión del gen *STAR* y de esta manera inhibe significativamente la formación de esteroides (Zazopoulos et al., 1997). Otros genes como el *NR5A1* (SF1), *NR3C4* (receptor de andrógenos) y *NR3C3* (receptor de progesterona) son antagonizados por *DAX1*. Muscatelli et al. (1994) demostraron que las mutaciones en el gen *DAX1* dan lugar a hipoplasia suprarrenal congénita ligada al cromosoma X asociada con hipogonadismo hipogonadotrópico (OMIM 300473).

A la fecha, los ensayos moleculares sobre el desarrollo sexual de los mamíferos no han atribuido un gen activo a eventos regulatorios específicos para la determinación de ovario y el desarrollo genital interno. Sin embargo, ahora parece que el desarrollo femenino en el ratón, al menos, está regulada por miembros de la familia *Wnt* de moléculas de señalización del desarrollo. *Wnt-4* se expresa en el mesonefros en desarrollo y por lo tanto participa en el desarrollo de las gónadas. Este es regulado en el testículo (tal vez por *Sry*), pero permanece activo en el ovario; aunque también se ha detectado su expresión en los conductos de Müller y está ausente en los conductos de Wolff. La interrupción de *Wnt-4* da como resultado hembras masculinizadas en los ovarios, que producen andrógenos a partir de células de Leydig, hay formación de conductos de Wolff y ausencia de conductos de Müller (Niakan y McCabe, 2005).

El factor esteroideogénico 1 (SF1) o *NR5A1* es un receptor nuclear que se identificó como un regulador de la diferenciación del primordio gonadal y la

esteroidogénesis en ratones intactos (Luo et al., 1994). En humanos el gen *NR5A1* se localiza en el cromosoma 9q33.3 y presenta una talla de 22 kb dividido por 7 exones y 6 intrones, de los cuales los exones del 2-7 codifican, mientras que el primer exón es no codificante. La región exónica codifica para una proteína de 461 aa y contiene dominios de unión al DNA altamente conservados, denominados dedos de zinc (Taketo et al., 1995; Oba et al., 1996; Wong et al., 1996). En ratones y humanos se ha detectado su expresión en la cresta urogenital y continúa en las glándulas suprarrenales, las gónadas, el hipotálamo y la hipófisis.

Durante el desarrollo embrionario, *NR5A1*, conjuntamente con factores de transcripción como *SRY*, *DAX1*, *SOX9*, *GATA4* y *WT1* controlan la determinación de las gónadas y la diferenciación sexual (Nachtigal et al., 1998; Tremblay y Viger, 2003; Sekido y Lovell-Badge 2008). En células de Leydig, *NR5A1* activa la expresión de varias enzimas implicadas en la esteroidogénesis, como 3β -HSD, *CYP11A1* y *StAR*. En células de Sertoli de humano, *NR5A1* activa la expresión del gen *AMH*, que induce la regresión de las estructuras de Müller (Shen et al., 1994). En células de la teca, de la granulosa y cuerpo lúteo el SF1 regula la expresión de genes esteroidogénicos como *CYP11A1*, *StAR*, 3β -HSD y *CYP17* (Morohashi 1999). Las mutaciones reportadas en el gen *NR5A1* han sido asociadas a alteraciones en la función de la glándula suprarrenal, falla ovárica prematura (OMIM 612964) y reversión del sexo DSD 46,XY (OMIM 612965).

Durante la embriogénesis de mamíferos el gen *WT1* (Wilm's Tumors 1) ha sido considerado un factor crítico para la diferenciación del borde urogenital, determinación del sexo gonadal y tejido renal (Kreidberg et al 1993). En el

humano, el gen *WT1* está localizado en la región cromosómica 11p13. El cDNA que codifica para *WT1* fue clonado en 1990 a partir de niños con tumores renales o tumor de Willms', un síndrome que afecta a 1 de 10,000 nacimientos. El gen consta de 10 exones que codifican para un factor de transcripción con dominios de unión al DNA mediante cuatro dedos de zinc. Debido a la presencia del dominio de trans-activación y trans-represión el gen *WT1* puede actuar como un activador o un represor dependiendo del tipo celular en donde sea expresado (Rose et al., 1990; Gessler et al., 1992; Hohenstein P y Hastie ND, 2006).

En humanos, ensayos moleculares han mostrado que las gónadas masculinas expresan conjuntamente *WT1* y *SRY*. Las observaciones en estos resultados han sugerido que durante la determinación sexual *WT1* controla la expresión del gen *SRY* y consecuentemente activa la organogénesis del tejido testicular (Hossain y Saunders, 2001). Adicional a esto, se ha reportado que la asociación entre los factores *WT1* y *SF1* estimula la expresión del gen *AMH*, mientras que el producto del gen *DAX1* antagoniza la expresión de ambos factores. La expresión del gen *WT1* está confinada al riñón y las gónadas (Nachtigal et al., 1998). En el borde urogenital del ratón los transcritos de *WT1* son detectados tempranamente a los 9 dpc tanto en macho como en hembras. Después de la diferenciación sexual de la gónada el mRNA de *WT1* es localizado en las células de Sertoli y en la túnica albugínea en el macho. En la hembra se detecta en las células de la granulosa, en la capa epitelial del ovario, en el útero, oviducto y en el endometrio (Bandiera et al., 2015).

En humanos, las mutaciones en el gen *WT1* (OMIM 607102) han sido asociadas con síndromes tales como el síndrome WAGR (Tumor maligno del riñón, aniridia, anomalías genitourinarias y síndrome de retraso mental, OMIM 194072), síndrome de Denys-Drash (nefropatías y anomalías genitales, OMIM 194080) y el síndrome Frasier (DSD 46,XY y nefropatía glomerular, OMIM 136680). Las características comunes de estos síndromes son la predisposición a fallas renales y malformaciones en el sistema reproductivo masculino.

A pesar del amplio conocimiento que se ha obtenido sobre el gen *WT1* en la gónada masculina poco ha sido documentado sobre el efecto que ejerce sobre la diferenciación gonadal femenina y a la fecha aún se desconocen sus efectos sobre las células de la teca y de la granulosa en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Asimismo, los mecanismos que regulan el control génico de *WT1* sobre *WNT4* y *RSPO1*, dos genes asociados a la diferenciación gonadal femenina a partir de una gónada indiferenciada, permanecen aún por resolverse.

Los factores de transcripción GATA presentan dos dedos de zinc que se unen a secuencias consenso 5'-AGATAG-3' y estructuralmente están asociadas entre sí por su alto porcentaje de homología. Desempeñan un papel crítico en la morfogénesis hepática, cardíaca, pulmonar y gonadal. Aunque el papel exacto que juega la familia de proteínas GATA en el desarrollo gonadal no ha sido bien establecido, diversas observaciones han reportado que el gen *GATA4* podría ser el único miembro de la familia GATA que está presente en las células somáticas del primordio gonadal (Tremblay y Viger, 2003). Huang et al., (1995; 1996) aislaron, clonaron y mapearon el gen *GATA4* y mostraron su localización

cromosómica en 8p23.1-p22. El gen *GATA4* está constituido por 6 exones y 5 intrones que abarcan un transcrito de 4.4 kb. La región exónica codifica para una proteína de 442 aa. El factor *GATA4* interacciona cooperativamente con múltiples proteínas (*NR5A1* y *FOG2*) para regular la expresión de los genes determinantes del sexo como *SRY*, *SOX9* y *AMH*; asimismo, factores clave androgénicos como *STAR*, *CYP19A1*, *INHA* (que codifica la subunidad α de la inhibina) y *HSD3B2* (Miyamoto et al., 2008; Nishida et al., 2008; Viger et al., 2008).

Estudios realizados en ratones muestran que este factor se expresa en las células somáticas de la gónada en etapa indiferenciada (11.5 dpc) en ambos sexos. En el inicio del dimorfismo sexual de la gónada, la expresión del gen *GATA4* se empieza a detectar de manera dimórfica. En gónadas XY la expresión es incrementada en las células de Sertoli y regulada negativamente en las células intersticiales; mientras que en las gónadas XX, la expresión es regulada negativamente en todas las células. La expresión del gen *GATA4* persiste en las células somáticas del testículo postnatal y es reactivada en el ovario adulto con predominio en las células de la granulosa (Tremblay y Viger, 2003). En humanos (Lourenco et al., 2011), mutaciones (p.Gly221Arg) con pérdida de la función del gen *GATA4* han sido asociadas a DSD 46,XY con anomalías del desarrollo testicular (OMIM 600576).

Las proteínas DMRT son factores de transcripción que contienen un dominio DM (dominio de unión al DNA semejante a un dedo de zinc). Los dominios DM fueron identificados por primera vez en dos genes reguladores de invertebrados denominados *doublesex* (*dsx*) y *male abnormal 3* (*mab-3*). *Mab-3* y

Dsx son factores de transcripción distintos que regulan la diferenciación sexual en machos de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, respectivamente (Shen and Hodgkin, 1988; Burtis and Baker, 1989). Los genes *Dmrt* han sido ampliamente estudiados debido a que representan factores de transcripción en las vías que regulan la determinación y diferenciación sexual desde cnidarios hasta mamíferos lo que indica que este tipo de factores de transcripción se encuentran altamente conservados evolutivamente (Raymond et al., 1998; Zarkower, 2013).

En humanos, el factor de transcripción DMRT1 es una proteína codificada por el gen *DMRT1*, localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (9p24.3). El gen *DMRT1* está formado por 5 exones y 3 regiones no codificantes altamente conservadas. La proteína DMRT1 está constituida por 373 aa. Estructuralmente el dominio DM está compuesto por dedos de zinc y se ha identificado una señal de localización nuclear (NLS) entre los motivos de zinc (aa 89 y 104 KGHKR y KK).

Dentro de los genes *DMRT*, el gen *DMRT1* parece tener el papel más importante en el desarrollo sexual de los vertebrados ya que su expresión es específica de la gónada en mamíferos, aves, tortugas, ranas y peces. La expresión del gen *Dmrt1* mantiene un perfil dimórfico durante el desarrollo de la gónada, siendo más alta la expresión en el testículo que en el ovario. Se ha demostrado que este gen regula distintos procesos en el desarrollo sexual como la diferenciación de la gónada, la gametogénesis y la determinación sexual. En humanos se ha observado que deleciones de la región cromosómica donde se encuentra el gen *Dmrt1* se relacionan con disgenesia gonadal (OMIM: 602424).

El gen *Foxl2* (Factor de transcripción L2 con un dominio de unión a DNA denominado cabeza de horquilla) pertenece a una familia de factores de transcripción que comparten un dominio de unión al DNA de aproximadamente 110 aa, con una estructura de hélice-vuelta-hélice (Führer, 2002). La expresión de *Foxl2* es sexualmente dimórfica, se detecta en gónadas femeninas y no en gónadas masculinas; este patrón de expresión está conservado entre los diferentes grupos de vertebrados (Cocquet et al., 2002). De igual forma, su función en la diferenciación ovárica se encuentra conservada, particularmente en la diferenciación de las células de la granulosa. Se ha propuesto que *Foxl2* puede actuar en la regulación del gen *Cyp19*, el cual codifica para la enzima aromatasa que cataliza la transformación de andrógenos a estrógenos durante la esteroidogénesis ovárica (Govoroun et al., 2004; Liu et al., 2007).

En mamíferos, la expresión de *Foxl2* es específica de hembras y se detecta durante las fases tempranas del desarrollo gonadal (Cocquet et al., 2002). Este gen se ha relacionado con el síndrome de blefarofimosis, ptosis y epicanto inverso (BPES), el cual se caracteriza por anomalías en los párpados y falla ovárica prematura, lo que sugiere que este factor podría ser importante para el desarrollo de la gónada femenina (Crisponi et al., 2001; Ottolenghi et al., 2007). Los transcritos de *Foxl2* se localizan en las células mesenquimáticas del ovario y posteriormente en las células de la granulosa, aunque su expresión disminuye en la etapa postnatal (Loffler et al., 2003; Schmidt et al., 2004). Las células de la granulosa en ovarios de ratones homocigotos nulos (*Foxl2*^{-/-}), no son capaces de completar la transición de células escamosas a cuboidales, lo que conduce a la

ausencia de folículos secundarios y atresia folicular. Lo anterior indica que *Foxl2* es esencial en la diferenciación de las células de la granulosa (Schmidt et al., 2004). Por otra parte, aunque *Foxl2* tiene una función importante en el desarrollo ovárico en mamíferos, los ratones XX mutantes para *Foxl2* no presentan defectos durante el desarrollo temprano que puedan conducir a una reversión sexual; de igual forma, los casos de pacientes con el síndrome BPES no muestran reversión sexual de hembra a macho (Schmidt et al., 2004; Uda et al., 2004), de manera que el gen *Foxl2* se podría excluir como un factor determinante del ovario (Wilhelm et al., 2007).

En aves, los estudios indican que el gen *Foxl2*, al igual que en mamíferos, se activa específicamente en las hembras. El inicio de la expresión de este gen ocurre justo antes del inicio de la diferenciación sexual gonadal y se sugiere que actúa activando el gen de la aromatasa, la cual transforma andrógenos a estrógenos, un paso importante en el desarrollo hacia la vía de diferenciación ovárica (Govoroun et al., 2004; Hudson et al., 2005).

Tabla 1. Localización cromosómica y genes involucrados en la diferenciación sexual y fenotipo asociado a DSD en humanos.

Locus	Gen	Función	Fenotipo	No. OMIM
11p13	<i>WNT1</i>	Codifica para un factor de transcripción que contiene dedos de zinc que es crítico para el desarrollo y función del borde urogenital.	Tumor de Wilms, anomalías renales, tumores gonadales (Síndromes de WAGR, Denys - Drash y Frasier).	607102
9q33	<i>NR5A1</i>	Involucrado en la determinación y diferenciación gonadal. Activa la expresión de varias enzimas implicadas en la esteroidogénesis.	Insuficiencia suprarrenal primaria; fenotipos más leves han aislado disgenesia gonadal parcial.	184757
17q24-25	<i>SOX9</i>	Responsable de la diferenciación testicular.	Reordenamientos en el locus 17q24x; fenotipo más leve que las mutaciones puntuales. Displasia campomélica.	608160
9p24.3	<i>DMRT1</i>	Regula distintos procesos en el desarrollo sexual como la diferenciación de la gónada, la gametogénesis y la determinación sexual.	En humanos se ha observado que deleciones de la región cromosómica donde se encuentra el gen <i>DMRT1</i> (9p) se relacionan con disgenesia gonadal.	602424
9q22	<i>HSD17B3</i>	Su actividad biológica ha sido asociada al metabolismo de andrógenos y síntesis de neuroesteroides.	Androgenización parcial en la pubertad.	605573
2p23	<i>SRD5A2</i>	Regulador en la conversión de T a DHT.	Deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 asociado a hipospadias.	607306
Xp21.3	<i>DAX1</i>	Formación de la glándula suprarrenal.	Hipogonadismo hipogonadotrópico.	300473
3q22.3	<i>FOXL2</i>	Factor de transcripción involucrado en el desarrollo del ovario y formación folicular.	Falla ovárica prematura. Blefarofimosis, Ptosis, Epicanto Inverso tipo 1.	605597
1p36.12	<i>WNT4</i>	Regulador clave de la diferenciación gonadal en los humanos.	Reversión sexual 46,XY.	158330
8p11.23	<i>STAR</i>	Regula la translocación intra-mitocondrial del colesterol.	Su deficiencia provoca la forma más severa de hiperplasia suprarrenal congénita.	600617

Yp11.3	SRY	Activación de la determinación testicular.	Individuos XX pueden tener un fenotipo masculino si presentan una translocación del gen <i>SRY</i> a uno de los cromosomas X.	480000
19p13.3-p13.2	AMH	Inhibe la formación de los conductos Müllarianos en el embrión masculino	Actividad inadecuada del gen conlleva al Síndrome de Persistencia de los Tubos Mullerianos.	600957
17q12	LIM1-LHX1	Es uno de los genes responsables de la morfogénesis y diferenciación testicular.	Mutaciones pueden ser una causa de síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser.	601999
11q13	SF1	Controla el desarrollo sexual en el embrión y en la pubertad.	Las mutaciones pueden producir genitales ambiguos, ausencia de pubertad e infertilidad.	184757
8p23.1-p22	GATA4	Su función más importante es el desarrollo cardíaco, pero también se ha visto requerido durante el desarrollo testicular.	Se han asociado mutaciones en este gen con defectos del <i>septum arteriosum</i> .	600576
Xq12	NR3C4	Receptor intracelular nuclear a andrógenos	Mutaciones en el AR están asociados con síndromes de insensibilidad a los andrógenos.	313700
15q23-q24	CYP11A1	Inicia la esteroidogénesis mediante la conversión de colesterol en pregnenolona.	Una deficiencia del gen, causa hiperplasia suprarrenal congénita lipóide.	118485
1p34.3	RSPO1	Regula la vía de señalización WNT	La pérdida de función puede causar reversión sexual.	609595

1.3 Diferenciación ovárica

En el humano la diferenciación del ovario inicia en la novena semana de gestación y no es histológicamente aparente hasta los 70 días o casi el tercer mes de desarrollo, no siendo completa la diferenciación hasta el sexto mes de vida gestacional. La diferenciación comprende tres procesos: i) la conversión de las células germinales en oocitos, ii) el desarrollo de las células foliculares con la formación de los folículos primarios y iii) la diferenciación de las células esteroideogénicas. Las células germinales primordiales derivan del endodermo del saco vitelino y migran al primordio gonadal; las del epitelio celómico, derivadas del primordio gonadal, se diferencian en células de la granulosa y las células mesenquimales del primordio gonadal dan lugar a las células del estroma ovárico (Wilson, et al., 1981; Byskov, et al., 1985; Lawrence, et al., 1992).

El proceso de meiosis de las células germinales femeninas comienza entre las semanas 10 y 13 de vida fetal, habiéndose completado la primera meiosis de todas las oogonias hacia los 7-8 meses, por lo que al nacer el producto, el ovario contiene oocitos primarios en el último estadio de la profase I, denominado diploteno. Cada oocito rodeado de células de la granulosa forma un folículo primario. La mayor parte de estos folículos permanecen en este estadio hasta la pubertad. Los oocitos sufren un proceso de atresia, de tal forma que de un máximo de 5-7 millones a los 3 meses de vida fetal solo quedan unos 2 millones al nacer. El proceso de atresia continúa durante la infancia hasta quedar sólo unos 100.000 al llegar a la pubertad (Vainio, et al., 1999).

Las células foliculares parecen proceder de la cresta urogenital al igual que las de Sertoli en el testículo. El desarrollo folicular comienza en el centro del ovario y consiste en el engrosamiento por células foliculares de un oocito secundario y la formación de una lámina basal. El mantenimiento de las células foliculares fetales parece necesitar la presencia de ovocitos, sin los cuales sufren una regresión. La formación de los folículos primordiales alcanza un máximo entre las semanas 20 y 25 de gestación, periodo durante el cual las concentraciones plasmáticas de FSH de origen fetal hipofisario alcanzan el máximo nivel. La maduración completa de los folículos ováricos precisa la acción de las gonadotrofinas hipofisarias fetales, de forma que el desarrollo folicular es incompleto en los fetos humanos anencefálicos (Jordan, et al., 2001).

Se han identificado solo algunos genes asociados a la diferenciación ovárica, por ejemplo genes como *DAX1* y *WNT4* han sido involucrados ya que alteraciones en su función permiten la diferenciación de células de Leydig en la gónada femenina y se ha sugerido una función represora de la diferenciación masculina. Existen otros genes que aún no han sido bien identificados y que regulan parte de esta diferenciación ovárica. Recientemente se identificó una mutación en el gen *R-spondin1* (*RSPO1*), la cual provoca la reversión sexual en individuos con genotipo XX, quienes en contraste con su fórmula cromosómica desarrollan un fenotipo masculino. El gen *RSPO1* se expresa en la gónada fetal en los dos sexos al inicio del desarrollo. Sin embargo, *Rspo1* incrementa su expresión en los ovarios y la disminuye en los testículos, en proporción inversa al gen *Sox9*, responsable de la diferenciación testicular. En la gónada masculina, la ausencia

de *RSPO1* no afecta el desarrollo normal del testículo (los individuos XY con la mutación son fértiles). Los ovarios en cambio, no pueden desarrollarse de acuerdo con su genotipo XX y siguen el camino hacia testículos. Como el gen (*SRY*) no existe en las mujeres, parece evidente que la carencia de *RSPO1* en un momento crítico del desarrollo gonadal, desencadena el programa completo de masculinización a partir de la expresión del *Sox9* en la gónada bipotencial transformándola en testículo (Chassot, et al., 2008).

Si bien no es necesaria la presencia de dos cromosomas X para la diferenciación ovárica, sí parece ser imprescindible para el mantenimiento de la diferenciación del ovario y del proceso de ovogénesis tal como lo demuestra el proceso de involución y atresia que se produce con el cariotipo 45,X (Swain et al., 1999).

1.4 Diferenciación testicular

La organización de la gónada primitiva en el testículo comienza dos semanas antes que el ovario mediante la individualización de los túbulos seminíferos, derivados de los cordones epiteliales y del blastema gonadal, en cuyo interior se diferencian y multiplican las células de Sertoli procedentes del epitelio celómico de la cresta urogenital, quedando las células germinales englobadas en su interior. Las células germinales derivan de células primitivas endodérmicas, de la capa interna del endodermo del saco vitelino; su proliferación y diferenciación quedan detenidas en esta fase, en el estadio de espermatogonia primitiva. Durante la séptima semana de gestación, aparece la diferenciación de las células de Leydig y da inicio la actividad antimülleriana de las células de Sertoli. Hacia la octava semana el testículo y el mesonefros tienen una posición adyacente al riñón. Al degenerar el mesonefros persiste una banda caudal que liga el testículo a la cresta urogenital y que constituirá el gubernaculum (Josso, et al., 1993; Hiort y Holterhus, 2000).

En el caso de los genitales externos se sabe que la enzima 5α -reductasa tipo 2 presente en el seno urogenital causa la biotransformación de la T a DHT, provocando su virilización. El desarrollo del pene y el escroto comienza poco después del desarrollo de los conductos wolffianos. El pliegue genital se alarga y fusiona para formar el pene y la uretra, las tumefacciones se fusionan y forman un escroto bilobular que sirve como receptáculo para los testículos en el momento de descender (Wilson, et al., 1981).

En mamíferos, los testículos se ubican a ambos lados de la línea media y descienden poco antes del nacimiento a la bolsa escrotal. Las gónadas masculinas maduran durante el desarrollo prepuberal y realizan una doble función: producción de espermatozoides y secreción de hormonas esteroideas y proteicas. Los testículos están conformados por dos compartimentos; el intersticial y el túbulo seminífero. Los túbulos seminíferos están rodeados por células alargadas denominadas, mioides, inmediatamente después se encuentra la membrana basal en donde se encuentran dos tipos celulares: las células germinales en distintos estadios de maduración y las de Sertoli (Akingbemi, 2005).

Entre este último tipo celular existen uniones estrechas que forman la barrera hematotesticular que se desarrolla durante la pubertad justo antes de que se inicie la espermatogénesis y divide el epitelio germinal en un compartimiento basal y otro luminal. Las células de Sertoli son de forma cilíndrica, se extienden desde la membrana basal hasta la superficie luminal del epitelio, el núcleo de esta célula es ovalado y con un nucléolo grande. En el citoplasma se encuentran gotas de lípido y un retículo endoplasmático liso bien desarrollado.

Las células más inmaduras o espermatogonias tienen un soporte en la membrana basal y forman el epitelio germinativo. En dirección a la luz del túbulo se encuentran los espermatoцитos primarios, secundarios y espermátidas. En este último tipo celular se presentan una serie de cambios que culminan con la formación del espermatozoide, el que se ubica en la luz del túbulo.

Las células de Sertoli durante el desarrollo prepuberal y en la etapa adulta presentan un papel nutritivo debido a que mantienen el epitelio germinal, adicional a esto llevan a cabo la función de fagocitosis de residuos de citoplasma después

de la transformación de espermatida a espermatozoide. Las células de Sertoli sintetizan diferentes proteínas y hormonas como la proteína de unión a andrógenos SHBG, indispensable para su traslado hasta las células blanco. Las células mioides además de ser responsables de la función contráctil del túbulo, que ayuda al transporte de los espermatozoides no móviles hasta la red testicular, intervienen en la regulación paracrina del testículo, ya que producen un factor no mitogénico que estimula la diferenciación de las células de Sertoli durante el periodo fetal. La función de las células de Sertoli es controlar la producción de espermatozoides y después conservarlos en buenas condiciones por lo que se conocen también como células nodriza. Funcionan como barrera inmunológica y también son responsables de la determinación del sexo en el feto. Funcionan gracias a la acción de la testosterona y de la hormona FSH.

El estroma, ubicado entre los túbulos seminíferos, contiene tejido conjuntivo en donde se encuentran las células intersticiales de Leydig. Las células de Leydig constituyen sólo el 5% de las células somáticas del testículo (Setchell, 2008). Están bajo el control de la secreción de LH por el eje hipotálamo-hipófisis. Estas células se relacionan con la función endocrina del testículo a través de la producción de los andrógenos (Hou et al., 1990; Chen et al., 2009).

1.5 Andrógenos

El testículo induce la diferenciación sexual masculina y el descenso testicular a través de los andrógenos, T y DHT. Los andrógenos son las hormonas esteroides masculinas involucradas en el dimorfismo sexual, mantenimiento de la fertilidad y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. La acción de los andrógenos está mediada por la unión del ligando al receptor de andrógenos (AR), un receptor nuclear que se encuentra localizado en el cromosoma Xq11-12. El gen *AR* o *NR3C4* es miembro de una superfamilia de receptores nucleares que presentan regiones altamente homologas, un dominio N-terminal implicado en la transactivación y con un número variable de repeticiones de glutamina y glicina, las longitudes de los cuales parecen influir en la actividad transcripcional del AR; un dominio central de unión a DNA altamente conservado dentro de la familia y un dominio C-terminal de unión al ligando. El AR también contiene subdominios, denominados AF1 y AF2, que regulan la interacción de los dominios N- y C-terminales (Hughes, 2007).

La acción biológica de T y DHT difiere con la de otras hormonas esteroides. Al respecto se ha determinado que tanto T y DHT interactúan con un mismo receptor (AR) y ejercen efectos fisiológicos diferentes. Se sabe que la interacción T-AR regula la producción de gonadotropinas, la espermatogénesis y la formación de los genitales internos (conductos deferentes, vesícula seminal y epidídimo) a partir del anclaje de los ductos Wolffianos. Mientras que la unión de DHT al AR regula la virilización de genitales externos en escroto, pene y uretra peneana (Wilson y cols., 1981; Wilson, 1999).

El efecto biológico de los andrógenos inicia después del transporte de la T (que se encuentra unida a la globulina transportadora de hormonas sexuales SHBG) al órgano blanco o tejidos periféricos (Fig. 2). Uno de los órganos blanco destacado en donde la T ejerce un papel importante en su desarrollo y crecimiento es la próstata. A nivel celular la T entra por difusión pasiva y puede ser metabolizada a DHT por la enzima 5α -reductasa tipo 2 (Vilchis y Chávez 2002).

En el citoplasma, los monómeros inactivos del AR están unidos a proteínas de choque térmico (HSP) o chaperonas que mantienen inactivo al AR e impiden que se lleve a cabo la actividad transcripcional. El AR unido a T o DHT presenta múltiples cambios conformacionales. Las HSP se disocian del AR y las histonas se acetilan. El AR es fosforilado y el complejo andrógeno-receptor se transloca al núcleo, donde se dimeriza y se une a secuencias específicas del DNA conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ERA) para llevar a cabo la transcripción y posterior síntesis de las proteínas (Gioeli y cols., 2002; Shang et al., 2002). Este complejo andrógeno-AR-ERA recluta proteínas correguladoras para modular la tasa de transcripción génica. A la fecha diversos coactivadores han sido identificados como amplificadores de la actividad transcripcional inducida por el ligando del AR.

La manera de interaccionar entre el coactivador y el AR es a través de la secuencia LXXLL del coactivador y la secuencia FXXLF ubicada en la región NH₂-terminal del AR. Esta secuencia LXXLL se ha observado que se encuentra altamente conservada en las proteínas coactivadoras que se unen a la superfamilia de receptores a hormonas esteroides. Los genes activados por el AR

son transcritos y el mRNA es procesado para su maduración. El mRNA es transportado al citoplasma donde se lleva a cabo la traducción de la secuencia de nucleótidos por los ribosomas para la síntesis de diversas proteínas (Hughes, 2001; Heinlein y Chang, 2002). Alteraciones génicas en la síntesis de andrógenos y/o el mecanismo de acción del AR han sido asociadas a desordenes en la diferenciación sexual masculina en individuos 46,XY; una anomalía congénita caracterizada por presentar infertilidad, hipospadias, ginecomastia o fenotipo completamente femenino (Vilchis et al., 2003; 2008; 2010; Chávez et al., 2014).

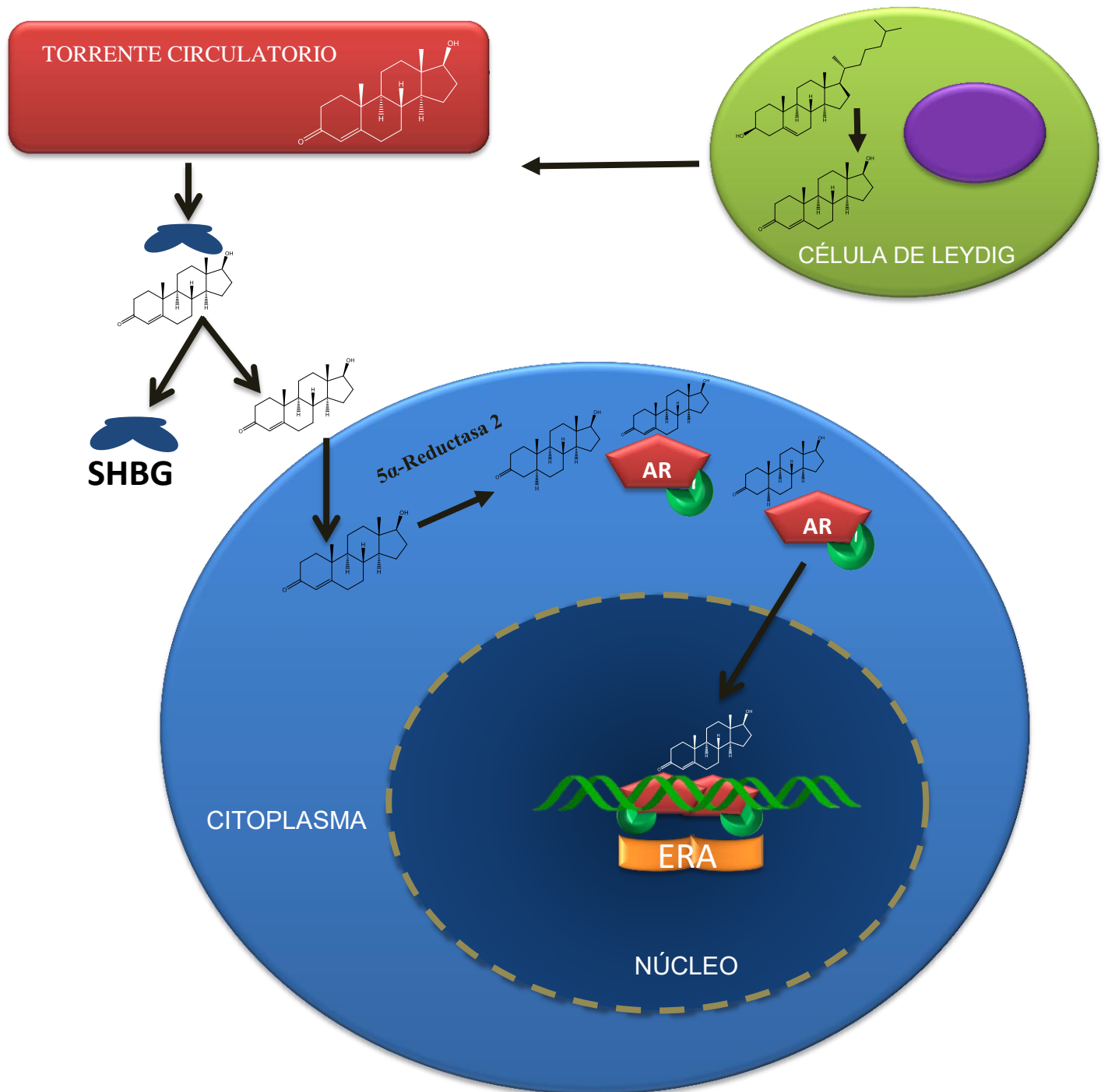


Fig. 2. La T es transportada a los tejidos periféricos a través de torrente circulatorio. A nivel celular la T entra por difusión pasiva y puede ser 5α-reducida a DHT. En el citoplasma, el AR está unido a HSP que lo mantienen inactivo. El AR unido a T o DHT presenta múltiples cambios conformacionales. El complejo andrógeno-AR es trasladado al núcleo y se une a ERA para llevar a cabo la transcripción y síntesis de las proteínas.

1.6 Esteroidogénesis

Las hormonas esteroides gonadales son bioreguladores químicos que presentan estructuras similares y que posteriormente se modifican según el tejido blanco. Esencialmente, existen tres tipos de esteroides sexuales gonadales: andrógenos, estrógenos o progestágenos. El precursor esencial de los esteroides sexuales es el colesterol de 27 átomos de carbono (C27), el cual es formado intracelularmente a partir de radicales acetato o es incorporado por las células y utilizado en las mitocondrias. La esteroidogénesis de estos bioreguladores sexuales se lleva a cabo primordialmente en las células de Leydig, de la teca interna y de la granulosa. Las células de Leydig aunque sintetizan colesterol a partir de acetil CoA, lo obtienen fundamentalmente del plasma. Otra fuente son las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales se introducen en la célula por endocitosis mediada por receptor. Independientemente de su origen el colesterol se almacena en forma de ésteres de colesterol.

El paso limitante en la síntesis de las hormonas esteroides es la transformación del colesterol en pregnenolona (Fig. 3). Esta reacción es controlada por la enzima que corta la cadena lateral del colesterol, denominada citocromo P-450_{scc}. La pregnenolona entra a la mitocondria y se traslada al retículo endoplasmático liso, donde se completa la esteroidogénesis (Hanukoglu, 1992). La síntesis de T en el testículo ocurre a través de dos rutas metabólicas. A partir de 17-hidroxipregnenolona, conocida como la ruta Δ^5 y otra a partir de 17-hidroxi-progesterona o Δ^4 . La importancia biológica de estas dos rutas varía según la especie; en el testículo humano la ruta más importante es la Δ^5 , mientras que en los roedores es la Δ^4 .

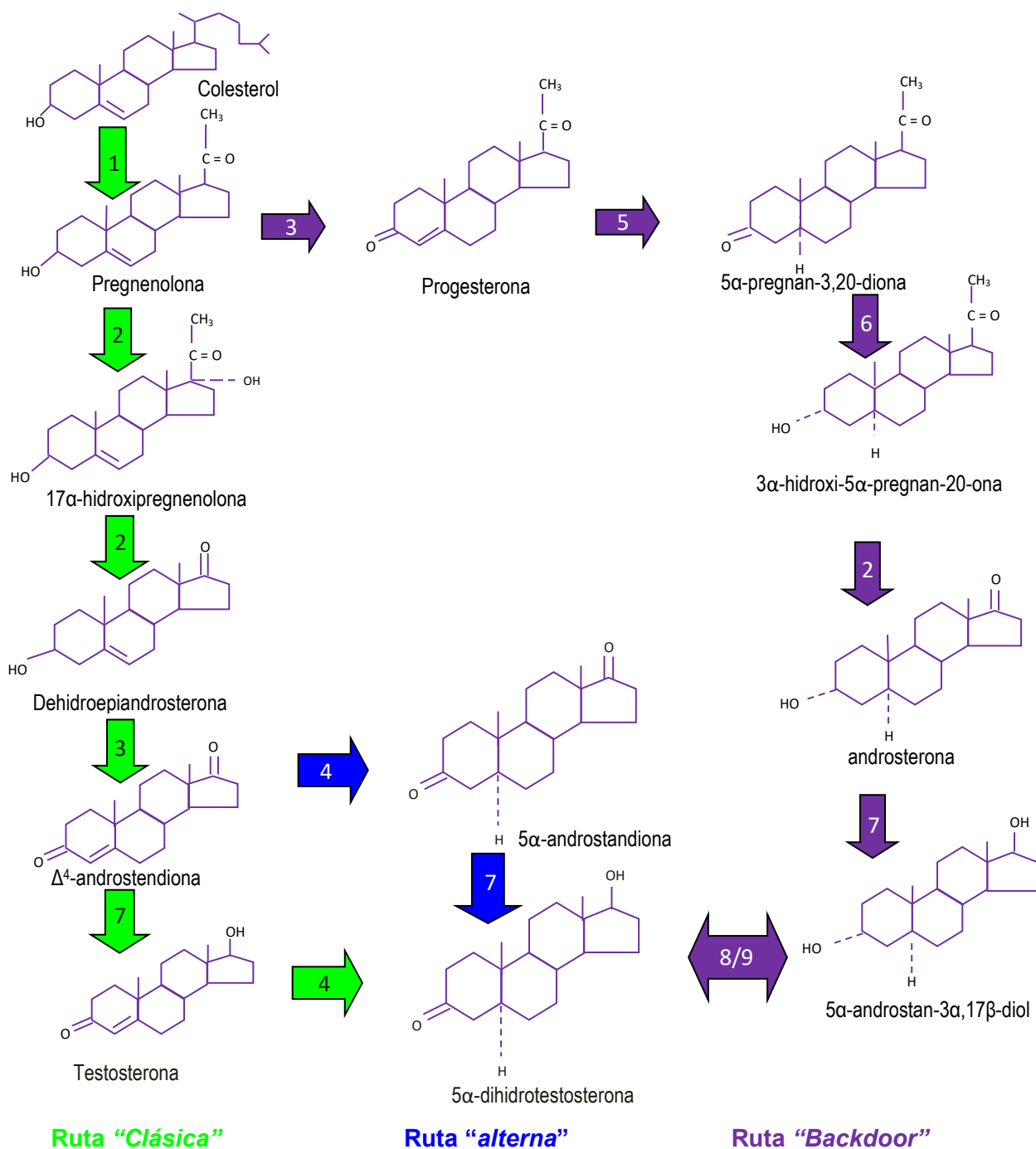


Fig. 3. Ruta "clásica" (flechas verdes), "backdoor" (flechas moradas) y "alterna" (flechas en azul) para la biosíntesis de DHT a través de precursores C₁₉ y C₂₁. **1.** CYP11A1, **2.** CYP17A1, **3.** 3 β -HSD2, **4.** 5 α -reductasa 2, **5.** 5 α -reductasa 1, **6.** AKR1C2/4, **7.** AKR1C3, **8.** AKR1C2/4, **9.** HSD17B6. Tomada del Departamento de Biología de la Reproducción, lab Bioquímica Hormonal. Primer Congreso Internacional de Biomedicina Molecular 2015, Ramos L et al.

La ruta “clásica” para la biosíntesis de andrógenos por las células de Leydig se lleva a cabo mediante la ruta Δ^5 , donde la pregnenolona se convierte en 17α -hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona, androstendiona y T, mediante la presencia de diferentes enzimas esenciales como *CYP11A1* (P450_{scc}, enzima que rompe la cadena lateral del colesterol), *HSD3B2* (3β HSD2, 3β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa tipo 2), *CYP17A1* (17α -hidroxilasa/ $17,20$ liasa), *HSD17B3* (17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3) para sintetizar T y 5α -reductasa 2 para sintetizar DHT en órganos blanco.

Múltiples líneas de investigación han demostrado que la alteración molecular y bioquímica en alguna de estas enzimas está asociada con Desordenes del Desarrollo Sexual 46,XY (DSD 46,XY). La deficiencia enzimática de 5α -reductasa 2 es un ejemplo clásico de esta patología clínica caracterizada por presentar hipospadias perineo escrotales con pseudovagina, micropene y testículos criptorquídicos (Vilchis et al., 1997a; 1997b; 2000). Sin embargo, los ensayos génicos realizados en genes candidatos para la ruta “clásica” no han logrado detectar por completo alteraciones asociadas a DSD y se ha sugerido que otros factores podrían estar vinculados a esta anomalía congénita. Una ruta alterna o “backdoor” de biosíntesis para formar DHT sin la necesidad de utilizar T como substrato ha sido descrita recientemente en marsupiales y roedores. No obstante esto, el potencial de esta ruta sobre la masculinización genital en el humano recientemente ha comenzado a estudiarse.

Los análisis genéticos actuales han demostrado que esta ruta podría presentar un potencial relevante en el desarrollo sexual masculino del humano (Flück et al., 2011).

Además de estos esteroides sexuales C19, se producen otros andrógenos como la androstendiona y la dehidroepiandrosterona, pero en menor cantidad dependiendo de la edad. Se ha observado que las células de Leydig secretan estradiol, pero la mayor parte de esta hormona se debe a la transformación periférica de la T y sólo el 10% es de origen testicular. En la gónada también se produce pregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona y sulfato de dehidroepiandrosterona pero en concentraciones muy bajas (Tian et al., 2009).

1.7 *AKR1C2* y *HSD17B6*

El gen *AKR1C2* codifica para una isoenzima que pertenece a la superfamilia de las aldo ceto reductasas (AKR) con más de 40 proteínas. Estas enzimas con actividad de 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasas (HSD) catalizan la conversión de aldehídos y cetonas a sus correspondientes alcoholes utilizando NADH y/o NADPH como cofactores. En el humano, se han determinado cuatro isoformas con un alto porcentaje de homología. Las enzimas 3 α -HSD tipo 1 (*AKR1C4*), 3 α (17 β)-HSD tipo 2 (*AKR1C3*), 3 α -HSD tipo 3 (*AKR1C2*) y 3 α (20 α)-HSD tipo 4 (*AKR1C4*) comparten un 84% de identidad en su secuencia de aa. El gen *AKR1C2* conjuntamente con *AKR1C1*, *AKR1C3* y *AKR1C4* fue mapeado en el cromosoma 10 p15-p14. La región codante del gen de 969 pb codifica para una proteína de 323 aa (Khanna et al., 1995; Penning et al., 2000).

Las 3 α -HSD de mamíferos en conjunto con las 5 α y 5 β -reductasas reducen 3-cetoesteroides y sintetizan 5 α ,3 α y 5 β ,3 α -tetrahydroesteroides. Las reacciones de reducción son importantes para la disposición metabólica en la mayoría de las hormonas esteroides. En próstata y glándula mamaria la expresión ha sido reportada para *AKR1C2* y *AKR1C3*; mientras que *AKR1C1* ha sido observada en el sistema nervioso central. Al respecto, en el cerebro la actividad de 3 α -HSD convierte esteroides 5 α -reducidos para formar tetrahydroesteroides, como 5 α -tetrahydroprogesterona que regulan el efecto del receptor del ácido γ -amino butírico (GABA_a) y ejerce propiedades ansiolíticas y anestésicas (Mellon SH 2007).

Recientemente, el papel del gen *AKR1C2* en la diferenciación sexual se observó por el hallazgo de un paciente 46,XY que presentaba genitales externos femeninos con testículos intraabdominales y al realizar los análisis de DNA genómico se observó que tenía un reordenamiento cromosómico en el locus *AKR1C* que resultó en ausencia enzimática funcional de *AKR1C2*. Por lo tanto la omisión de toda la actividad *AKR1C2* parece ser suficiente para interrumpir la síntesis testicular de DHT y causar desordenes del desarrollo sexual 46,XY. El gen *AKR1C2* actúa en la “ruta backdoor” para la biosíntesis de DHT. Esto podría indicar la posible participación de la ruta alterna en la síntesis de DHT y su importancia fisiológica en la diferenciación sexual masculina normal (Flück et al., 2011).

La enzima 17β -HSD6 también conocida como retinol deshidrogenasa (RoDH), 3α -hidroxiesteroide epimerasa (HSE) o 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa oxidativa pertenece a la familia de las hidroxiesteroide deshidrogenasas y presenta la habilidad de catalizar la epimerización de los 3α -hidroxiesteroides (Huang y Luu-The, 2000). La enzima requiere como cofactor NAD (H) y puede utilizar como sustrato androstandiol para sintetizar DHT. La actividad catalítica esencial es la oxidación de 3α -diol a DHT, aunque también puede convertir 3α -diol a androsterona.

La actividad biológica de esta enzima ha sido asociada al metabolismo de andrógenos y síntesis de neuroesteroides. El gen que codifica para la 17β -HSD6 es denominado *HSD17B6*, consta de un peso molecular de 35966 Da y se encuentra localizado en el cromosoma 12q13.3, cercano a los genes *RODH4* y

RODH5. 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-The, 2001). El cDNA que codifica para la 17β -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, bazo, próstata, glándula suprarrenal, cerebro, útero, glándula mamaria y placenta (Huang y Luu-The, 2000; Penning et al., 2000). La expresión de RoDH ha sido detectada en testículos fetales, lo cual sugiere que probablemente esta enzima cataliza la reacción oxidativa de 3α -HSD necesaria para completar la síntesis “backdoor” de DHT; aunque este proceso parece poco probable (Kamrath et al., 2012). A la fecha esta enzima no ha sido asociada a DSD.

1.8 Desordenes del desarrollo sexual

Los avances en la identificación génica sobre las anomalías en la diferenciación sexual masculina y femenina han sido reexaminados recientemente. Los términos “intersexo”, “pseudohermafroditismo”, “hermafroditismo” y “reversión sexual” han sido controversiales. Actualmente, se ha propuesto el término “desorden del desarrollo sexual” o DSD como una nueva clasificación (Tabla 2). Los DSD son anomalías congénitas en donde el desarrollo del sexo cromosómico, gonadal y anatómico es atípico (Houk et al., 2006; Lee et al., 2006).

Los criterios que sugieren DSD en neonatos incluyen ambigüedad genital; esto es genitales femeninos aparentes (clítoris agrandado, fusión labial posterior, masa inguino/labial); genitales masculinos aparentes (testículos no palpables, micropene, hipospadias perineal aisladas o hipospadias leves con testículos no descendidos); antecedentes familiares de DSD (por ejemplo, síndrome de insensibilidad androgénica completa [CAIS]) o discordancia genital y del cariotipo. Los DSD en personas adultas pueden incluir ambigüedad genital no identificada, hernia inguinal femenina, retraso o incompleto desarrollo de la pubertad, virilización femenina, amenorrea primaria, desarrollo de los senos masculinos y hematuria macroscópica en un varón.

La evaluación clínica incluye a la familia, historia prenatal y exploración física con una evaluación precisa y objetiva de los genitales y los rasgos dimórficos. Para reducir al mínimo los trastornos psicológicos, al paciente y a la familia se le debe informar exactamente lo que se hará y por qué. Las fotografías

médicas requieren sensibilidad y consentimiento por parte del paciente y de la familia (Houk et al., 2006; Lee et al., 2006).

Las alteraciones cromosómicas del DSD han sido las más comúnmente reportadas en la literatura. Síndrome de Turner, Síndrome de Klinefelter, quimeras e individuos mosaicos son algunos ejemplos en donde alguno de los cromosomas sexuales presenta una duplicación o ausencia del cromosoma X o Y.

Existe una gran variedad de genes que participan en la masculinización del embrión XY y como consecuencia la alteración molecular de cualquiera de estos genes causa patologías en la diferenciación sexual. Varios casos de DSD reportados tempranamente en humanos 46,XY han sido atribuidos a mutaciones en genes que participan en la vía de diferenciación testicular: por ejemplo una mutación que involucre la sustitución de una base nitrogenada en el dominio de unión al DNA de SF1, incluso en un estado heterocigoto, causa feminización en individuos XY (Ozisik et al., 2002). De forma similar la ausencia de función de WT1, el cual en forma normal codifica para varios factores de transcripción, causa falla en el desarrollo de la gónada y el riñón en homocigotos y reversión sexual 46,XY en heterocigotos. En humanos, duplicaciones o mutaciones en el gen SOX9 causan DSD 46,XY y defectos en el esqueleto (Morais da Silva et al., 1996; Hsiao et al., 2006).

La delección de un pequeño segmento del cromosoma 9 da un estatus hemocigoto para el locus *DMRT1*, causando falla en el desarrollo testicular y feminización de una variedad de tejidos no gonadales (Ottolenghi et al., 2000;

Zarkower, 2001). Fallas en la regulación de *DAX1* o *WNT4* (debido a la duplicación del segmento Xp que lleve el gen *DAX1* o a una mutación en el locus de *WNT4*) también causan DSD XY en humanos (Zanaria et al., 1994; Jordan et al., 2001; Sanlaville et al., 2004). Mutaciones en el marco de lectura abierto del gen *SRY*, con o sin ninguna influencia en la unión al DNA o la propiedad de doblamiento de su dominio del grupo de alta movilidad (HMG), es considerado para una alta proporción de disgenesias gonadales XY (Scherer, 2002). Mutaciones en genes involucrados en la biosíntesis y acción de los andrógenos han sido consideradas como causa de DSD 46,XY (Vilchis et al., 2003; 2008; 2010; Chávez et al., 2014).

En el grupo DSD 46,XX la hiperplasia suprarrenal congénita (CAH) representa la forma más común de diagnóstico clínico. Generalmente, no hay asignación de género en este grupo, excepto en casos de diagnóstico tardío e individuos 46,XX severamente masculinizados. Al nacimiento, el fenotipo genital de las pacientes 46,XX con CAH incluye un mayor desarrollo del tubérculo genital (GT), aumento de la longitud de la uretra y la apertura uretral por lo general se encuentra en la zona ventral del GT; aunque en casos muy graves de masculinización pueden desarrollar el aspecto de un falo normal. Estas características son similares a las de un paciente 46,XY hipospádico con testículos no palpables. En pacientes 46,XX con CAH, la cavidad vaginal se abre en la parte posterior de la pared de la uretra a una distancia variable del cuello de la vejiga. La altura de la confluencia uretro-vaginal no está relacionado con el grado de masculinización externa, al contrario de las sugerencias de la clasificación de

Prader. La fusión sagital de los pliegues genitales es variable, desde una vulva casi femenina a una completa apariencia escrotal. En todos los casos, las gónadas no son palpables en los pliegues genitales. La evidencia reciente sugiere que los pacientes con CAH clásico de sexo femenino no desean ser considerados como pacientes DSD (Mouriquand et al., 2016).

Tabla 2. Clasificación de los Desórdenes del Desarrollo Sexual (Hughes, 2007).

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

2. JUSTIFICACIÓN

En nuestro laboratorio, recientes ensayos moleculares en pacientes DSD con cariotipo 46,XY han reportado la presencia de mutaciones en genes esteroidogénicos de la ruta “clásica”. En la actualidad únicamente un grupo de investigación (Fluck et al., 2011) ha reportado mutaciones en la ruta alterna para la biosíntesis de DHT; estas observaciones indican una posible participación e importancia fisiológica en la diferenciación sexual masculina de esta ruta. Por lo tanto, en este trabajo se realizará una búsqueda bibliográfica de estos genes implicados en la determinación y diferenciación sexual. Asimismo, se buscará la presencia de múltiples genes involucrados en la diferenciación sexual.

3. OBJETIVOS

Localizar información biomédica y de ciencias de la vida asociada a diferenciación sexual.

Analizar los datos obtenidos sobre diferenciación sexual, genes y los desórdenes asociados en el humano.

Redactar la información a partir de los artículos científicos seleccionados

Demostrar la importancia de los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* en la diferenciación sexual.

4. METODOLOGÍA

Se realizó una investigación bibliográfica retrospectiva sobre la diferenciación sexual. Los criterios de inclusión fueron artículos científicos indexados que proporcionen información sobre la manera en que se diferencian los sexos a nivel celular, bioquímico y molecular, así como sus desordenes. La revisión bibliográfica abarcó del año 1995 al 2016, aunque se consideraron algunos trabajos clásicos por su relevancia en cuanto a diferenciación sexual. La literatura fue obtenida utilizando la base de datos del pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Se utilizó como posible criterio de exclusión el año de publicación para trabajos anteriores al año 1995.

5. DISCUSIÓN

La determinación del sexo es fundamental para la reproducción y ha sido considerado un proceso esencial para la variabilidad genética. Aunque existe una amplia variedad de mecanismos de determinación genética del sexo es interesante considerar que la diferenciación masculino/femenino está determinada por un reducido número de genes en las distintas especies. Los factores que determinan el sexo son tan variados en las especies que han tenido que evolucionar polifiléticamente para conseguir la presencia de dos sexos diferenciados.

En esta revisión bibliográfica resalto la ausencia de recopilaciones generales sobre la diferenciación sexual y los diferentes factores que la controlan en las diversas clases de vertebrados como aves, reptiles, anfibios y peces y que podrían ser utilizados como modelos biológicos para explicar la regulación génica y abrirían la posibilidad de poder describir nuevos mecanismos reguladores de la diferenciación sexual.

El sistema más común de determinación del sexo es el de individuos homogaméticos y heterogaméticos. En mamíferos, las hembras son homogaméticas XX y los machos heterogaméticos XY, por el contrario, en otras especies como las aves las hembras son heterogaméticas ZW y los machos homogaméticos ZZ. Interesantemente en reptiles, como tortugas y cocodrilos, la determinación del sexo es dependiente del medio ambiente (no genética), aunque en algunas especies como serpientes y lagartijas el mecanismo regulador es

basado en cromosomas sexuales XX/XY o ZZ/ZW. En estas especies los esteroides sexuales desempeñan un papel importante para la determinación del sexo y no existen genes determinantes del sexo. En anfibios los esteroides sexuales están involucrados en la diferenciación sexual y se han estudiado algunos genes determinantes del sexo como el *DM-W* un homólogo del *DMRT1*. En peces existe una amplia variabilidad de estrategias de determinación del sexo y mucha información no es clara.

El papel de las hormonas esteroides juega un papel distinto tanto en el desarrollo del macho como en el de la hembra, ya que mientras el testículo induce la diferenciación sexual masculina y el descenso testicular a través de los andrógenos T y DHT, en la hembra la diferenciación femenina de las estructuras sexuales (genitales internos y externos) es independiente de las hormonas gonadales independientemente de que existan o no ovarios. Por lo tanto, la gónada embrionaria indiferente se transformará en un ovario a menos que sea desviada por un gen organizador del testículo, el *SRY* localizado en el cromosoma Y, considerado el “*gen maestro*” de la masculinización.

Por otra parte, la diferenciación sexual del sistema nervioso central sí está regulado por la acción de las hormonas esteroideas en ambos sexos. Genes como *DAX1* han sido asociados al adecuado desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

En la revisión bibliográfica se demostró que existen una gran cantidad de genes responsables que controlan la diferenciación sexual en mamíferos. Para

machos, se encontró que los genes *SRY* *SOX9* son factores transcripcionales que desencadenan una cascada de eventos génicos responsables de la masculinización de la gónada indiferenciada en la que participan genes como *WT1*, responsable de la diferenciación del borde urogenital y posible regulador de *SRY*, *LIM1*, *SF1*, *GATA4*, *FOG2* y *AMH*.

Se ha revisado que *DAX1* es un gen que presenta una polémica importante al tener actividad sobre otros genes que son responsables tanto de masculinizar como de mantener el desarrollo femenino. La revisión de la bibliografía sobre este gen conocido como “antitesticular”, deja en claro que es un factor transcripcional represor del gen esteroideogénico *STAR* por lo que conociendo la relevancia de las hormonas esteroideas en el desarrollo de un fenotipo masculino se podría sugerir que por el contrario se daría lugar a un fenotipo femenino. Sin embargo Meeks et al., 2003 demostraron que el gen *NROB1* y *SRY* son necesarios para la formación testicular normal. Estas evidencias han puesto en conflicto la posible participación del gen *DAX1* en el desarrollo del ovario.

Ha sido evidente que se cuenta con información sobre la mayoría de los genes participantes en la diferenciación sexual masculina, sin embargo aún existen bastantes huecos en la información en cuanto a genes involucrados en la diferenciación del ovario equivalentes a *SRY*. *SOX9* se encuentra “apagado” durante el desarrollo femenino, al mismo tiempo *WNT4* actúa de forma negativa sobre *DAX1*. *SF1* se expresa en células de la teca, de la granulosa y en cuerpo lúteo regulando genes esteroideogénicos. *FOXL2* únicamente se expresa en ovarios (Cocquet et al., 2002) y favorece la diferenciación de las células de la

granulosa, además regula otros genes esteroidogénicos que catalizan la transformación de andrógenos a estrógenos. Por último, el papel de *RSPO1* no está bien definido aunque se conoce que su concentración aumenta o disminuye en proporción a *SOX9* y su ausencia produce que se de paso al programa de masculinización. Es importante continuar con las investigaciones a este respecto para poder evaluar la importancia de los genes responsables de la feminización en cuanto a DSD.

Como conclusión parcial se puede mencionar que los genes no actúan de forma independiente en el proceso de diferenciación sexual, por el contrario, están relacionados entre sí de manera que la expresión conjunta de determinados genes tiene función agonista o antagonista según sea el caso.

Con respecto a la diferenciación sexual gonadal, se observó que en la vía clásica de la esteroidogénesis existen bastantes genes estudiados y que representan un alto índice mutacional. Sin embargo, hay otros genes presentes en la vía “*backdoor*” poco estudiados y que sí podrían presentar actividad enzimática anormal debido a mutaciones en genes como *HSD17B6*, *AKR1C2* y *AKR1C3*.

A la fecha se están comenzando a publicar estudios sobre genes que hace tiempo eran ignorados sobre diferenciación sexual y podrían dar nuevas respuestas ya que del total de pacientes evaluados con DSD, sólo el 20% tienen explicación génica.

Se obtuvo información relevante en cuanto a los estudios realizados en los últimos años referente a la clasificación de los genes involucrados en los DSD cromosómicos, 46,XY y 46,XX y se pudo obtener mayor información sobre la evaluación clínica, asignación de género y asesoramiento genético. Se determinó que a la fecha no existe un algoritmo clínico para una evaluación bioquímica, molecular y genética en pacientes con genitales ambiguos. En lo que se refiere a los DSD, hay fenotipos que no se definen al cien por ciento como genitales masculinos o femeninos y se presenta una ambigüedad, además existe la posibilidad de que las propias gónadas no se encuentren completamente diferenciadas y ocupen un espacio anatómicamente inadecuado. Tal puede ser el caso de los testículos intraabdominales, los cuales no descienden a la bolsa escrotal y se mantienen a la altura en la que normalmente se deberían posicionar los ovarios. Una de las consecuencias de esta situación pueden ser la infertilidad o hasta la formación de cuerpos cancerígenos.

Otra polémica en el ámbito clínico ha sido la recomendación, en casos de identidad sexual indefinida, que las gónadas no sean extirpadas al menos hasta la etapa de la pubertad en donde se inicia el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. Sin embargo, se corre el riesgo de que la misma gónada provoque crecimiento celular cancerígeno al no encontrarse en su sitio natural. Lo anterior nos lleva a considerar la importancia de realizar un consenso general sobre el tratamiento de este tipo de padecimientos.

Múltiples genes asociados directamente en la ruta “clásica” de la esteroidogénesis están involucradas en numerosas anormalidades en el desarrollo

sexual embriológico (i.e. *StAR*, *NR5A1*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *HSD3B2*, *HSD17B3*, *SRD5A2*); sin embargo, los ensayos génicos realizados aún no han logrado descubrir por completo las alteraciones asociadas a DSD y se presume que otros factores podrían estar vinculados.

Al parecer, mutaciones en los genes que participan en la ruta “backdoor” presentarían mayor relevancia en este sentido. Los estudios realizados actualmente en marsupiales y roedores apoyarían esta hipótesis. Genes esteroidogénicos como *AKR1C2*, *AKR1C3* y *HSD17B6* están asociadas a la formación de uno de los andrógenos con mayor potencia biológica, DHT, catalizando reacciones que transforman metabolitos de la progesterona en andrógenos.

En conclusión, se pudo observar la importancia de descubrir nuevos genes y mecanismos involucrados en el desarrollo de la gónada; esto con la finalidad de obtener información sobre las estrategias de determinación del sexo, lo que podría implicar similitudes en la fisiología de la reproducción de las especies, al menos durante la etapa de desarrollo de la organogénesis *in utero*, asimismo obtener nuevos conceptos para clasificar los desórdenes génicos del desarrollo sexual e implementar nuevas y más eficientes estrategias terapéuticas en pacientes con genitales ambiguos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Akingbemi BT (2005) Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 51-64.
2. Almiñana C, Caballero I, Heath PR, Maleki-Dizaji S, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA, Holt WV & Fazeli A (2014) The battle of the sexes starts in the oviduct: modulation of oviductal transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa. *BMC Genomics* 15: 15-293.
3. Avner P & Heard E (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Genet* 2: 59-67.
4. Balaton BP & Brown CJ (2016) Escape Artists of the X Chromosome. *Trends Genet* 32: 348-359.
5. Bandiera R, Sacco S, Vidal VP, Chaboissier MC & Schedl A (2015) Steroidogenic organ development and homeostasis: A WT1-centric view. *Mol Cell Endocrinol* 408: 145-155.
6. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O & Camerino G (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 7: 497-501.
7. Bell DM, Leung KKH, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PPL & Cheah KSE (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nature Genet* 16: 174-178.

8. Bellott DW, Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG & Pyntikova T (2014) Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature* 508: 494-499.
9. Braun A, Kammerer S, Cleve H, Lohrs U, Schwarz H-P & Kuhnle U (1993) True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male gonadal sex-determining locus (SRY): molecular genetics and histological findings in a sporadic case. *Am J Hum Genet* 52: 578-585.
10. Burtis KC & Baker BS (1989) *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* 56: 997-1010.
11. Byskov AG, Høyer PE & Westergaard L (1985) Origin and differentiation of the endocrine cells of the ovary. *J Reprod Fertil* 75: 299-306.
12. Capel B (2000) The battle of the sexes. *Mech Dev* 92: 89-103.
13. Chassot AA, Gregoire EP, Magliano M, Lavery R & Chaboissier MC (2008) Genetics of ovarian differentiation: *Rspo1*, a major player. *Sex Dev* 2: 219-227.
14. Chávez B, Vilchis F, Zenteno JC, Larrea F & Kofman-Alfaro S (2001) Novel molecular defects in the androgen receptor gene of Mexican patients with androgen insensitivity. *Clin Genet* 59: 185-188.
15. 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 α -reductase type-2 (SRD5A2) gene. *Mol Genet Genomic Med* 2: 292-296.
16. Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, Servel N, Xia X, Pannetier M & Veitia R (2002) Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet* 39: 916–921.
17. Cohen-Haguenuer O, Picard JY, Mattei M-G, Serero S, Van Cong N, de Tand M-F, Guerrier D, Hors-Cayla M-C, Josso N & Frezal J (1987) Mapping of the gene for anti-mullerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 44: 2-6.
18. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ & Korach KS (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286: 2328-2331.
19. Coveney D, Shaw G & Renfree MB (2001) Estrogen-induced gonadal sex reversal in the tammar wallaby. *Biol Reprod* 65: 613-621.
20. Cox JJ, Willatt L, Homfray T & Woods CGA (2011) SOX9 duplication and familial 46,XX developmental testicular disorder. *New Eng J Med* 364: 91-93.
21. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P & Ristaldi MS (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27: 159-166.
22. Da Silva SM, Hacker A, Goodfellow P & Lovell-Badge R (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet.* 14: 62-68.

23. Deakin J (2015) Implications of monotreme and marsupial chromosome evolution on sex determination and differentiation. *Gen Comp Endocrinol* doi:10.1016/j.ygcen.2015.09.029.
24. Delbridge ML & Graves JAM (1999) Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific functions of Y chromosome-borne genes. *Rev Rep* 4:101-109.
25. di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N & Cate R (1994) Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol* 8:1006-1020.
26. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P & Mark M (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127: 4277-4291.
27. Eggers S, Ohnesorg T & Sinclair A (2014) Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat Rev Endocrinol* 10: 673-683.
28. Elbrecht A & Smith RG (1992) Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255: 467-470.
29. Fadem BH & Tesoriero JV (1986) Inhibition of testicular development and feminization of the male genitalia by neonatal estrogen treatment in a marsupial. *Biol Reprod* 34: 771-776.
30. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF & Simpson ER (1998) Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6965-6970.

31. Flück CE, Meyer-Böni M, Pandey AV, Kempná P, Miller WL, Schoenle EJ & Bignon-Laubert 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.
32. Foster JW, Domínguez-Steglich MA, Guiolo S, Kowk G, Weller PA, Stevanović M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD & Schafer AJ (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY related gene. *Nature* 372: 525-530.
33. Führer D (2002) Lessons from studies of complex genetic disorders: identification of FOXL2--a novel transcription factor on the wing to fertility. *Eur J Endocrinol* 146: 15-18.
34. George F-P, Poutanen M, Wilbertz J & Huhtaniemi I (2001) Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 15:172-183.
35. George FW, Catt CJ, Neaves WB & Wilson JD (1978) Studies on the regulation of testosterone synthesis in the fetal rabbit testis. *Endocrinology* 102:665-673.
36. Gessler M, König A & Bruns GAP (1992) The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics* 12: 807-813.
37. Ginalski K, Rychlewski L, Baker D & Grishin NV (2004) Protein structure prediction for the male-specific region of the human Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2305-10.

38. Gioeli D, Ficarro SB, Kwiek JJ, Aaronson D, Hancock M, Catling AD, White FM, Christian RE, Settlege RE, Shabanowitz J, Hunt DF & Weber MJ (2002) Androgen receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 29304-29314.
39. Goodfellow PN (1993) SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 27: 71-92.
40. Govoroun MS, Pannetier M, Pailhoux E, Cocquet J, Brillard JP, Couty I & Cotinot C (2004) Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev Dynamics* 231: 859-870.
41. Graves JAM (1996) Mammals that break the rules: Genetics of marsupials and monotremes. *Annu Rev Genet* 30: 233-260.
42. Grumbach MM & Conte FA Disorders of sex differentiation. En: Wilson, J. D.; Foster, D.W. & Larsen, P. R., eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, W. B. Saunders, 1998. pp 1303-425.
43. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow PN & Lovell-Badge R (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.
44. Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, McMeel OM, Martin SA & Fostier A (1999) Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol Reprod Dev* 54: 154-162.
45. Hanley NA, Hagan DM, Clement Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas Cortés L, McElreave K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H & Wilson DI (2000)

- SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 91: 403-407.
46. Hanukoglu I (1992) Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 43:779-804.
47. Harper PS (2011) Mary Lyon and the hypothesis of random X chromosome inactivation. *Hum Genet* 130:169–174.
48. Hasegawa T, Zhao L, Caron KM, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, Sasano H & Parker KL (2000) Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol Endocrinol* 14: 1462-1471.
49. Heinlein CA & Chang C (2002) Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23: 175-200.
50. Helena A & Morris BJ (2007) The Human Pseudoautosomal Region (PAR): origin, function and future. *Curr Genomics* 8: 129-36.
51. Hiort O & Holterhus P-M (2000) The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* 142: 101-110.
52. Hohenstein P & Hastie ND (2006) The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* 15(suppl 2): R196-R201.
53. Hossain A & Saunders GF (2001) The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* 276: 16817-16823.
54. Houk CP, Hughes IA, Ahmed SF & Lee PA (2006) Writing Committee for the International Intersex Consensus Conference Participants. Summary of

- consensus statement on intersex disorders and their management. International Intersex Consensus Conference. *Pediatrics* 118: 753-7.
55. Hsiao HP, Tsai LP, Chao MC, Tseng HI & Chang YC (2006) Novel SOX9 gene mutation in campomelic dysplasia with autosomal sex reversal. *J Formos Med Assoc.* 105: 1013-1016.
56. Huang W-Y, Cukerman E & Liew C-C (1995) Identification of a GATA motif in the cardiac alpha-myosin heavy-chain-encoding gene and isolation of a human GATA-4 cDNA. *Gene* 155: 219-223.
57. Huang W-Y, Heng HHQ & Liew C-C (1996) Assignment of the human GATA4 gene to 8p23.1-p22 using fluorescence in situ hybridization analysis. *Cytogenet Cell Genet* 72: 217-218.
58. Huang X-F & Luu-The V (2000) Molecular characterization of a first human 3(alpha-to-beta)-hydroxysteroid epimerase. *J Biol Chem* 275: 29452-29457.
59. Huang X-F & Luu-The V (2001) Gene structure, chromosomal localization and analysis of 3-ketosteroid reductase activity of the human 3(alpha-to-beta)-hydroxysteroid epimerase. *Biochim Biophys Acta* 1520: 124-130.
60. Hudson QJ, Smith CA & Sinclair AH (2005) Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. *Dev Dynamics* 233: 1052-1055.
61. Hughes IA (2001) Minireview: Sex Differentiation. *Endocrinology* 142: 3281-3287.
62. Hughes IA (2007) Female Development-All by Default? *N Engl J Med* 351: 748-750.

63. Jangravi Z, Alikhani M, Arefnezhad B, Sharifi Tabar M & Taleahmad S (2013) A fresh look at the male-specific region of the human Y chromosome. *J Proteome Res* 12: 6-22.
64. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR & Vilain E (2001) Up regulation of WNT 4 signaling and dosage sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet.* 68: 1102-1109.
65. Josso N, Lamarre I & Picard J-Y (1993) Anti-Müllerian hormone in early human development. *Early. Hum. Dev.* 33:91-99.
66. Jost A (1953) Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 8: 379-418.
67. Kamrath C, Hochberg Z, Hartmann MF, Remer T & Wudy SA (2012) Increased activation of the alternative "backdoor" pathway in patients with 21-hydroxylase deficiency: evidence from urinary steroid hormone analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 97: E367-75.
68. Khanna M, Qin K-N, Klisak I, Belkin S, Sparkes RS & Cheng K-C (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.
69. Kobayashi A, Shawlot W, Kania A & Behringer RR (2004) Requirement of Lim1 for femal reproductive tract development. *Development* 131: 539-49.
70. Kreidberg J, Sariola H, Loring J, Maeda M & Pelletier J (1993) WT-1 is required for earl kidney development. *Cell* 174: 679-691.

71. Krisfalusi M & Cloud JG (1999) Gonadal sex reversal in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Zool* 284: 466-472.
72. Lahn BT & Page DC (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278: 675-80.
73. Lahn BT & Page DC (1999) Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286: 964-7.
74. Lahn BT, Pearson NM & Jegalian K (2001) The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Genet* 2: 207-216.
75. Lawrence WD, Whitaker D, Sugimura H, Cunha GR, Dickersin GR & Robboy SJ (1992) An ultrastructural study of the developing urogenital tract in early human fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 167:185-193.
76. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF & Hughes IA (2006) Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. *Pediatrics* 118: e488-500.
77. Liu L, Rajareddy S, Reddy P, Du C, Jagarlamudi K, Shen Y & Liu K (2007) Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of *Foxo3a*. *Development*, 134: 199-209.
78. Loffler KA, Zarkower D & Koopman P (2003) Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* 144: 3237-3243.

79. Lourenco D, Brauner R, Rybczynska M, Nihoul-Fekete C, McElreavey K & Bashamboo A (2011) Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proc Nat Acad Sci* 108: 1597-1602.
80. Luo X, Ikeda Y & Parker KL (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77: 481-490.
81. Maier E M, Leitner C, Lohrs U & Kuhnle U (2003) True hermaphroditism in an XY individual due to a familial point mutation of the SRY gene. *J Pediatr Endocr Metab* 16: 575-580.
82. Mauléon P, Bézard J & Terqui M (1977) Very early and transient 17-estradiol secretion by fetal sheep ovary. In vitro study. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 17: 399–401.
83. Meeks JJ, Weiss J & Jameson JL (2003) Dax1 is required for testis determination. *Nat Genet* 34: 32-33.
84. Mellon SH (2007) Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther* 116: 107-24.
85. Misrahi M, Beau I, Meduri G, Bouvattier C, Atger M, Loosfelt H, Ghinea N, Hai MV, Bougnères PF & Milgrom E (1998) Gonadotropin receptors and the control of gonadal steroidogenesis: physiology and pathology. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 12: 35–66.
86. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW & Viger RS (2008) A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex. *BMC Mol Biol* 9: 44.

87. Moindrot B & Brockdorff N (2016) RNA binding proteins implicated in Xist-mediated chromosome silencing. *Semin Cell Dev Biol.* Jan 24. pii: S1084-9521(16)30029-5. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.029. [Epub ahead of print].
88. Morohashi K (1999) Gonadal and extragonadal functions of Ad4BP/SF-1: developmental aspects. *Trends Endocr Metab* 10: 169-173.
89. Mouriquand PD, Gorduza DB, Gay CL, Meyer-Bahlburg HF, Baker L, Baskin LS, Bouvattier C, Braga LH, Caldamone AC, Duranteau L, El Ghoneimi A, Hensle TW, Hoebeke P, Kaefer M, Kalfa N, Kolon TF, Manzoni G, Mure PY, Nordenskjöld A, Pippi Salle JL, Poppas DP, Ransley PG, Rink RC, Rodrigo R, Sann L, Schober J, Sibai H, Wisniewski A, Wolffenbuttel KP & Lee P (2016) Surgery in disorders of sex development (DSD) with a gender issue: If (why), when, and how?. *J Pediatr Urol* 12:139-149.
90. Murakami S, Kan M, McKeehan WL & de Crombrughe B (2000) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Nat Acad Sci* 97: 1113-1118.
91. Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, Schwarz HP, Kaplan J.-C, Camerino G, Meitinger T & Monaco AP (1994) Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372: 672-676.

92. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD & Ingraham HA (1998) Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93: 445-454.
93. Neil J, MacLuski N & Naftolin F (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294-1302.
94. Niakan KK & McCabe ERB (2005) DAX1 origin, function, and novel role. *Mol Genet Metab* 86: 70-83.
95. Nishida H, Miyagawa S, Vieux-Rochas M, Morini M, Ogino Y, Suzuki K, Nakagata N, Choi HS, Levi G & Yamada G (2008) Positive regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression through the interaction between Dlx and GATA-4 for testicular steroidogenesis. *Endocrinology* 149: 2090-2097.
96. O WS, Short RV, Renfree MB & Shaw G (1988) Primary genetic control of somatic sexual differentiation in a mammal. *Nature* 331: 716-717.
97. Oba K, Yanase T, Nomura M, Morohashi K, Takayanagi R & Nawata H (1996) Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 261-267.
98. Ono M & Harley V (2013) Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nat Rev Endocrinol* 9: 79-91.
99. Ottolenghi C, Veitia R, Quintana Murci L, Torchard D, Scapoli L, Souleyreau Therville N, Beckmann J, Fellous M & McElreavey K (2000) The region on 9p associated with 46,XY sex reversal contains several transcripts expressed in the urogenital system and a novel doublesex related domain. *Genomics* 64: 170-178.

100. Ottolenghi C, Pelosi E, Tran J, Colombino M, Douglass E, Nedorezov T & Schlessinger D (2007) Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet* 16: 2795-2804.
101. Ozisik G, Achermann JC & Jameson JL (2002) The role of SF1 in adrenal and reproductive function: insight from naturally occurring mutations in humans. *Mol Genet Metab.* 76: 85-91.
102. Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas NE & Fellous M (1989) Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342: 937-939.
103. Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pepin B, Cotinot C, Veitia R & Pailhoux E (2006) FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol* 36: 399–413.
104. Payer B (2016) Developmental regulation of X-chromosome inactivation. *Semin Cell Dev Biol.* Apr 22. pii: S1084-9521(16)30109-4. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.04.014. [Epub ahead of print].
105. Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N & Ratnam K (2000) Human 3 α -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.
106. Pieau C, Dorizzi M & Richard-Mercier N (1999) Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci* 55: 887-900.

107. Pinter SF (2016) A Tale of Two Cities: How Xist and its partners localize to and silence the bicompartmental X. *Semin Cell Dev Biol.* Apr 9. pii: S1084-9521(16)30084-2. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.03.023. [Epub ahead of print].
108. Quirke LD, Juengel JL, Tisdall DJ, Lun S, Heath DA & McNatty KP (2001) Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biol Reprod* 65: 216-228.
109. Ramos L, Chávez B, Cesáreo K, Mares L & Vilchis F (2015) "Análisis de mutaciones de AKR1C2 y HSD17B6 en individuos con desorden de desarrollo sexual (DSD 46,XY) asociado a hipospadias". Primer Congreso Internacional de Biomedicina Molecular 25-28 de Noviembre. Mazatlán, Sinaloa. México.
110. Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J & Zarkower D (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391: 691-695.
111. Rose EA, Glaser T, Jones C, Smith CL, Lewis WH, Call KM, Minden M, Champagne E, Bonetta L, Yeger H & Housman DE (1990) Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell* 60: 405-508.
112. Sanlaville D, Vialard F, Thépot F, Vue Droy L, Ardalan A, Nizard P, Corré A, Devauchelle B, Martin Denavit T, Nouchy M, Malan V, Taillemite JL & Portnoï MF (2004) 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* 128: 325-330.
113. Scheib D (1983) Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* 23 (Suppl.) S87-S92.

114. Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC & Treier M (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131: 933-942.
115. Scherer G, Held M, Erdel M, Meschede D, Horst J, Lesniewicz R, Midro AT (1998) Three novel SRY mutations in XY gonadal dysgenesis and the enigma of XY gonadal dysgenesis cases without SRY mutations. *Cytogenet Cell Genet* 80: 188-92.
116. Sekido R & Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453: 930-934.
117. Shang Y, Myers M & Brown M (2002) Formation of the Androgen Receptor Transcription Complex. *Mol Cell* 9: 601-610.
118. Shemesh M (1980) Estradiol-17 beta biosynthesis by the early bovine fetal ovary during the active and refractory phases. *Biol Reprod* 23: 577-582.
119. Shemesh M, Allenberg M, Milaguir F, Ayalon N & Hansel W (1978) Hormone secretion by cultured bovine pre- and postimplantation gonads. *Biol Reprod* 19: 761-767.
120. Shen MM & Hodgkin J (1988) Mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell* 54: 1019-1031.
121. Shen W-H, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL & Ingraham HA (1994) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77: 651-661.

122. Sinclair AH, Berta P, Palmer S, Hawkins R, Griffiths BL, Smith M, Foster JW, Frischauf A-M, Lovell-Badge R & Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-245.
123. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS & Hillier L (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423: 825-37.
124. Su H & Lau Y-F (1993) Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet* 52: 24-38.
125. Swain A & Lovell-Badge R (1999) Mammalian sex determination: a molecular drama. *Gen Dev* 13: 755-767.
126. Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G & Lovell-Badge R (1998) Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391: 761-767.
127. Taketo M, Parker KL, Howard TA, Tsukiyama T, Wong M, Niwa O, Morton CC, Miron PM & Seldin MF (1995) Homologs of *Drosophila* fushi-tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. *Genomics* 25: 565-567.
128. Tevosian S, Albrech K, Crispino J, Fujiwara Y, Eicher E & Orkin S (2002) Gonada differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 y FOG2. *Development* 129: 4627-4634.

129. Teixeira J y Donahoe P (1996) Molecular Biology of MIS and its receptor. *J Androl* **17**: 336-341.
130. Themmen APN & Huhtaniemi IT (2000) Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* **21**: 551–583.
131. Tian Q, Yao F, Sha G, Huang S, Tseng H & Schindler AE (2009) Genotyping of a Chinese family with 46,XX and 46,XY 17-hydroxylase deficiency. *Gynecol Endocrinol* **25**: 485-490.
132. Tommerup N, Schempp W, Meinecke P, Pedersen S, Bolund L, Brandt C, Goodpasture C, Guldberg P, Held K, Reinwein H, Saugstad OD, Scherer G, Skjeldal O, Toder R, Westvik J, van der Hagen CB & Wolf U (1993) Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat Genet* **4**: 170-174.
133. Tremblay JJ & Viger RS (2003) A mutated form of steroidogenic factor 1 (SF-1 G35E) that causes sex reversal in humans fails to synergize with transcription factor GATA-4. *J Biol Chem* **278**: 42637-42642.
134. Tremblay JJ & Viger RS (2003) Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**: 291-298.
135. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W & Pilia, G (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human molecular genetics*. **13**: 1171-1181.
136. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N & McMahon AP (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **397**: 405-409.

137. Veitia R, Ion A, Barbaux S, Jobling MA, Souleyreau N, Ennis K, Ostrer H, Tosi M, Meo T, Chibani J, Fellous M & McElreavey K (1997) Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet* 99: 648-52.
138. Veitia R, Nunes M, Brauner R, Doco-Fenzy M, Joanny-Flinois O, Jaubert F & McElreavey K (1997) Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23 3p24.1. *Genomics* 41: 271-274.
139. Viger RS, Guittot SM, Anttonen M, Wilson DB & Heikinheimo M (2008) Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. *Mol Endocrinol* 22: 781-798.
140. Vilchis F, Hernández D, Canto P, Méndez JP & Chávez B (1997a) Codon 89 polymorphism of the human 5 alpha-steroid reductase type 2 gene. *Clin Genet* 51: 399-402.
141. Vilchis F, Canto P, Chávez B, Ulloa-Aguirre A & Méndez JP (1997b) Molecular analysis of the 5 alpha-steroid reductase type 2 gene in a family with deficiency of the enzyme. *Am J Med Genet* 69: 69-72.
142. Vilchis F, Méndez JP, Canto P & Lieberman E (2000) Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *Clin Endocrinol* 52: 383-387.
143. Vilchis F & Chávez B (2002) Steroid Reductases. In: *Encyclopedia of molecular medicine*. John Wiley & Sons Inc., pp 3008-3011.

144. Vilchis F, Ramos L, Kofman-Alfaro S, Zenteno JC, Méndez JP & Chávez B (2003) Extreme androgen resistance in a kindred with a novel insertion/deletion mutation in exón 5 of the androgen receptor gene. *J Hum Genet* 48: 346-351.
145. 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.
146. Vilchis F, Ramos L, Mendez JP, 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 5alpha-reductase-2 may constitute an ancestral founder mutation in Mexican patients. *J Androl* 31: 358-364.
147. Wade J & Arnold AP (1996) Functional testicular tissue does not masculinize development of the zebra finch song system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5264-5268.
148. Wilhelm D, Palmer S & Koopman P (2007) Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87: 1-28.
149. Wilson JD, George FW & Griffin JE (1981) The hormonal control of sexual development. *Science* 211: 1278-1284.
150. Wilson JD (1999) The role of androgens in male gender role behavior. *Endocr Rev* 20: 726-737.
151. Wong M, Ramayya MS, Chrousos GP, Driggers PH & Parker KL (1996) Cloning and sequence analysis of the human gene encoding steroidogenic factor 1. *J Mol Endocr* 17: 139-147.

152. Yang MY & Fortune JE (2008) The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod* 78: 1153-1161.
153. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP & McCabe ER (1994) An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X linked adrenal hypoplasia congenital. *Nature* 372: 635-641.
154. Zarkower D (2001) Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev* 2: 175-185.
155. Zarkower D (2013) DMRT genes in vertebrate gametogenesis. *Curr Top Dev Biol* 102: 327-356.
156. Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM & Sassone-Corsi P (1997) DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390: 311-315.