

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**



**ESTUDIO MOLECULAR EN PACIENTES CON
ANOMALIAS EN EL DESARROLLO DE LOS
CONDUCTOS MULLERIANOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MEDICAS
P R E S E N T A
JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ

TUTOR: DRA. SUSANA KOFMAN-ALFARO

MEXICO, D.F.

2004



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 AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Doctorado en Ciencias Médicas
Sede Centro

ESTUDIO MOLECULAR EN
PACIENTES CON ANOMALIAS EN EL
DESARROLLO DE LOS CONDUCTOS
MULLERIANOS

Alumno: M en C. Juan Carlos Zenteno Ruiz
Depto. de Genética, Hospital General de México

Tutor: Dra. Susana Kofman-Alfaro
Jefe del Depto. de Genética, Hospital General de México; Profesor titular C, U.N.A.M
Investigador SNI III

México, D.F, Febrero de 2004

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité Académico de las Ciencias Médicas del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, según acuerdo AA16(CM/SCA/SO44/03) acordó designar y se formaliza por el Comité Académico del Programa, el jurado para el examen de grado de **Doctor en Ciencias**, (Plan 5006) del C. **Juan Carlos Zenteno Ruiz**, quien defenderá la tesis denominada **“Estudio Molecular en Pacientes con Anomalías en el desarrollo de los Conductos Müllerianos”**.

PRESIDENTE	DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO
SECRETARIO	DR. FABIO ABDIEL SALAMANCA GÓMEZ
VOCAL	DRA. SUSANA HELENA KOFMAN EPSTEIN
VOCAL	DR. JUAN PABLO MÉNDEZ BLANCO
VOCAL	DR. JOSÉ VICENTE DÍAZ SÁNCHEZ
SUPLENTE	DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA
SUPLENTE	DRA. NIEVES CONCEPCIÓN PEDRÓN NUEVO

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, D. F., a 4 de noviembre de 2003.


DR. LUIS FELIPE ABREU H.
El Coordinador

NOTA: Por acuerdo del Subcomité Académico, la formalización de este Jurado de Examen de Grado, tiene una vigencia de 6 (seis) meses a partir de la fecha de aprobación del mismo. Excedido el tiempo, el alumno deberá someter a consideración del Subcomité Académico una nueva propuesta de jurado.

INDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	6
ANTECEDENTES	
Fases de diferenciación sexual normal.....	8
Diferenciación gonadal.....	9
Tipos celulares de las gónadas.....	11
Genes en la formación de la gónada bipotencial.....	16
Diferenciación testicular y gen SRY.....	17
Diferenciación sexual fenotípica.....	19
Desarrollo de los conductos genitales internos.....	24
Regresión de los conductos Mullerianos.....	28
Descubrimiento de la HIM.....	30
La HIM.....	31
El gen de la HIM.....	33
Regulación de la producción de HIM en la vida fetal....	34
Receptor tipo II de la HIM (AMHR-II).....	36
Receptor tipo I de la HIM.....	39
Ontogenia de la producción de HIM.....	41
Otras acciones de la HIM.....	43
Síndrome de persistencia de Mullerianos.....	46
Síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser.....	50
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	54
OBJETIVOS	55

SUJETOS Y METODOS.....	56
RESULTADOS.....	66
DISCUSION.....	75
REFERENCIAS.....	83

RESUMEN

Una etapa crítica del desarrollo sexual fenotípico en los mamíferos es el establecimiento de conductos reproductivos internos sexualmente dimórficos a partir de los conductos Mullerianos y Wolffianos. En las hembras, los conductos Mullerianos se transformarán en útero, trompas de Falopio y tercio superior de la vagina. La agenesia de Mullerianos, también conocida como síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (SMRKH) o aplasia vaginal, es la segunda causa más común de amenorrea primaria y se presenta en 1 de cada 4000-5000 mujeres. La enfermedad está caracterizada por la ausencia congénita de útero, trompas de Falopio y tercio interno de la vagina en un individuo 46,XX con feminización externa normal. La mayoría de los casos de SMRKH son de herencia esporádica aunque existen varios agregados familiares e individuos con translocaciones cromosómicas que sugieren una etiología monogénica. Sin embargo, a la fecha no ha podido identificarse la etiología de ningún caso de la enfermedad. Una probabilidad no estudiada es la presencia de mutaciones activantes de la hormona inhibidora de Mullerianos (HIM) o de su receptor tipo II (AMHR-II) que podrían ocasionar el encendido de la vía de regresión Mulleriana durante la vida intrauterina en sujetos femeninos, traduciéndose en aplasia de Mullerianos. Además, existen resultados contradictorios acerca de la asociación entre el polimorfismo N314D de la enzima galactosa fosfato

uridil transferasa 1 (GALT) y la enfermedad. En este estudio se realizó el análisis mutacional de los genes de la HIM y del AMHR-II, así como la determinación de la frecuencia del polimorfismo N314D en 15 mujeres Mexicanas con SMRKH, incluyendo un caso familiar con 2 hermanas. Los resultados fueron comparados con un grupo control de 25 mujeres sanas con fertilidad comprobada. Se realizó extracción de DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica, amplificación por PCR de todos los exones y uniones exón/intrón de los genes HIM y AMHR-II y del exón 10 del gen GALT y secuenciación de los productos de PCR. No se detectaron mutaciones deletereas en los genes HIM o AMHR-II en ninguna de las pacientes; se identificaron 5 polimorfismos no descritos previamente: 3 en el exón 5 del gen de la HIM y 2 en el intrón 6 del gen del AMHR-II. Sin embargo, cuando las frecuencias de cada alelo en el grupo de enfermas fueron comparadas con las frecuencias en el grupo de 50 alelos control, ninguna de las variantes mostró diferencias significativas. La variante que codifica el polimorfismo N314D en la GALT fue observada en 1 solo alelo de 30 en el grupo de enfermas y en ninguno de los 50 alelos control. Nuestros resultados permiten descartar la participación de los genes HIM y AMHR-II en la etiología del SMRKH en pacientes Mexicanas y excluyen una asociación entre la variante N314D de la enzima GALT y la aplasia de Mullerianos.

ABSTRACT

A critical step during mammalian phenotypic development is the generation of sexually dimorphic reproductive tracts from the Müllerian and Wolffian ducts. In females, the Müllerian ducts develop into the Fallopian tubes, uterus, and upper third of the vagina. Müllerian agenesis, also named the Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (MRKHS) or vaginal aplasia, is the second most common cause of primary amenorrhea occurring in 1 in every 4000-5000 females. It is characterized by the congenital absence of the Müllerian structures including the Fallopian tubes, the uterus, and the internal portion of the vagina in an otherwise normally feminized 46,XX subject. Associated somatic abnormalities are frequent, mainly renal (30%) and skeletal (12%). Most cases are sporadic in inheritance, but the occurrence of some patients with chromosomal translocations or even familial aggregates suggest a genetic basis for the disease, although the etiology of the disease is still unknown. It has been suggested that activating mutations in the anti-Müllerian hormone (AMH) or in its receptor (AMHR2) are potential sources for the defect. In this study we describe the molecular analysis of both the AMH and AMHR2 genes in a group of 15 Mexican patients with Müllerian agenesis (including two sisters) and in a control group of 25 normal women. In addition we also investigated the prevalence of a previously identified polymorphism (N314D) in the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) enzyme.

Methods: DNA extraction from blood leukocytes; PCR amplification of all exons and exon/intron junctions of the AMH and AMHR11 genes and PCR amplification of exon 10 of GALT gene; direct automated sequencing of PCR products. Results: No deleterious mutations were detected in the AMH or AMHR11 genes in any of the patients. We identified 5 previously undescribed polymorphisms: two in intron 6 of the AMHR11 gene (including one located at position -3 of the acceptor splice site) and three in exon 5 of the AMH gene (two of them changing the encoded amino acid). However, when compared with 50 control alleles, any of these variants showed a significant difference between patients and normal subjects. The N314D GALT variant, previously associated with the disease, was observed only in one of 30 alleles from patients. These results indicate that mutations at the AMH or AMHR11 genes are not a common cause of MRKHS.

ANTECEDENTES

Fases de diferenciación sexual normal: La diferenciación sexual (DS) es uno de los fenómenos de mayor trascendencia biológica ya que permite la perpetuación de las especies con reproducción sexuada. Este proceso es considerado además un paradigma de la embriogénesis debido a que las mutaciones en los genes que intervienen en él no son letales y sólo conducen a alteraciones del fenotipo sexual. Por esta razón, el desarrollo sexual normal y patológico constituyen modelos biológicos excelentes para estudiar procesos de diferenciación celular y organogénesis. En los últimos años se han reconocido en el humano varios genes que intervienen en el proceso de la DS y el análisis de sus mutaciones y anomalías fenotípicas que resultan de éstas, ha permitido establecer un modelo de los acontecimientos genéticos que conducen al dimorfismo sexual (Scherer, 2002).

El proceso de DS en el humano se lleva a cabo en 3 etapas secuenciales: 1.- establecimiento del sexo cromosómico o sexo genético (XX ó XY); 2.- desarrollo de testículo u ovario a partir de la gónada bipotencial o indiferenciada de acuerdo al complemento cromosómico del individuo (sexo gonadal); 3.- diferenciación de los genitales internos y externos de acuerdo al tipo de gónada presente (sexo fenotípico).

La diferenciación cromosómica se establece al momento de la fertilización, cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza a un óvulo que siempre aporta un cromosoma X. De esta forma, se logra el dimorfismo de los cromosomas sexuales que caracteriza a los mamíferos, en los cuales la hembra presenta un complemento cromosómico sexual 46,XX y el macho 46,XY. El desarrollo gonadal subsecuente a partir de la gónada indiferenciada o bipotencial dependerá exclusivamente del complemento cromosómico (Charlesworth, 2002).

Diferenciación Gonadal: En el humano, el dimorfismo sexual gonadal se hace evidente durante la sexta semana de vida intrauterina. La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X existentes en el genoma de un individuo (Ford et al., 1959; Jacobs y Strong, 1959). El evento inicial en el desarrollo gonadal en machos y hembras es la formación de un primordio gonadal. En vertebrados, las gónadas aparecen como estructuras pareadas dentro del mesodermo intermedio que está situado a cada lado del embrión y dentro de la cavidad celómica. Dentro de esta región pueden reconocerse 3 regiones que conforman la cresta urogenital: (1) el pronefros, que incluye el primordio suprarrenal; (2) el mesonefros, que constituye la parte central de la cresta y de la que se originará la gónada, y (3) el metanefros, en la región posterior y que dará origen al riñón. La sub-región de

la cresta urogenital a partir de la cual se originará la gónada se denomina cresta genital (**Figura 1**) (Pinsky et al. 1999).

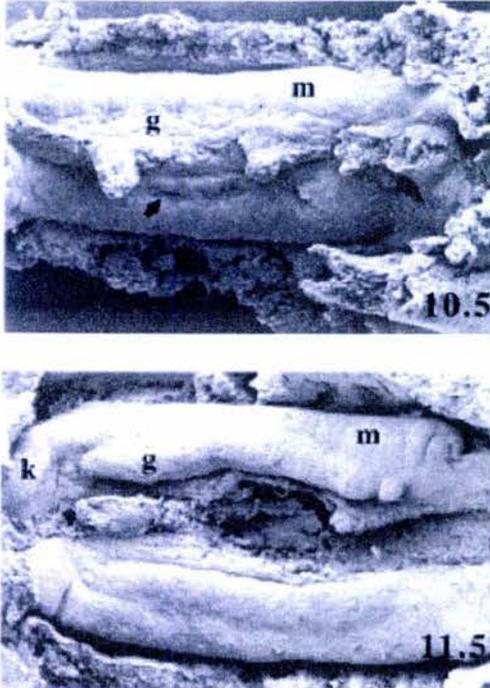


Figura 1.- Micrografía electrónica de la cresta urogenital a los 10.5 días pc en el ratón (panel superior). M: mesonefros; g: región de la cresta genital; a los 11.5 dpc (panel inferior) la gónada (g) se distingue claramente del resto del mesonefros (m) y del metanefros donde se inicia la formación del riñón (k). En este estadio no existe dimorfismo sexual aparente entre productos XX y XY. (Tomado de Capel B. Mech Dev. 92:89-103, 2000).

La gónada no diferenciada está formada por un tejido mesenquimal laxo cubierto por una capa de epitelio celómico y apoyado por el tejido mesonéfrico en desarrollo (**Figura 2**) (Byskov, 1986). En el ratón, las gónadas emergen en la superficie ventro-medial del mesonefros por el engrosamiento del epitelio celómico de esta región y se observa tanto en machos como hembras entre los días 10.5 y 11.5 dpc. Esto ocurre parcialmente por proliferación de las células del epitelio celómico (Schmahl et al. 2000). Durante el desarrollo temprano

de la gónada, el epitelio celómico sirve como una fuente de múltiples líneas celulares que se separan y trasladan desde la superficie celómica hacia el interior de la gónada en embriones XX y XY. En este estadio, el primordio gonadal semeja un epitelio estratificado en la superficie del mesonefros (Byskov AG y Hoyer PE, 1994).

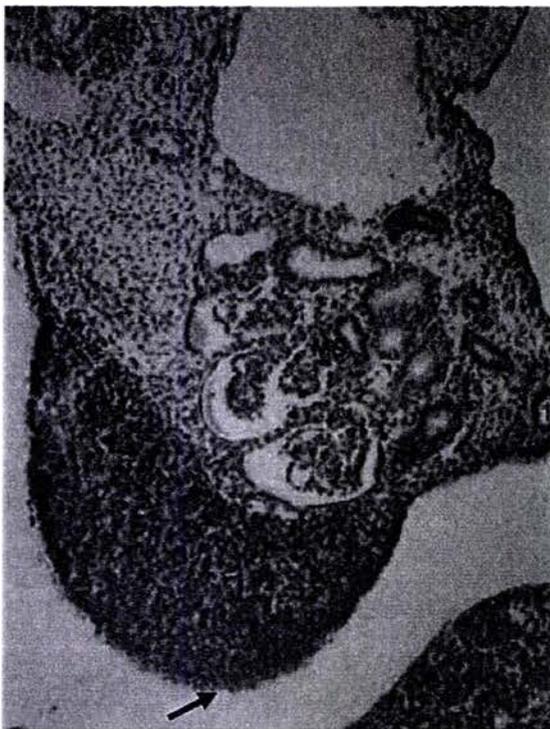


Figura 2. Sección transversal del primordio gonadal que muestra la relación entre el mesonefros (MS) y la gónada bipotencial (G). La flecha señala el epitelio que cubre a la gónada denominado epitelio celómico, región altamente proliferativa en los estadios tempranos de la gonadogénesis.

Tipos celulares de las gónadas: La evidencia disponible indica que las células en las gónadas XX y XY son bipotenciales y capaces de diferenciarse hacia la vía femenina o hacia la vía masculina. Hasta el día 11.5 pc, las gónadas en ratones XX y XY son idénticas y tienen la capacidad de formar ya sea testículos u ovarios. Sin embargo, para el día 12.5 pc se observa la

formación de cordones testiculares en las gónadas XY mientras que en la gónada XX no se aprecian cambios aparentes. La gónada XY es más grande en esta etapa y adquiere un patrón de vasculatura característico (Swain y Lovell-Badge, 1999).

El desarrollo gonadal en los mamíferos requiere 4 líneas celulares diferentes: **1.-** células germinales primordiales (CGP), precursoras de los gametos; **2.-** células precursoras de las células de soporte, las cuales darán lugar a las células de Sertoli en el macho y a las células foliculares (de la granulosa) en la hembra; **3.-** precursores de las células productoras de esteroides, que originan las células de Leydig en el macho y las de la teca en la hembra, y **4.-** células del tejido conectivo que darán lugar al tejido vascular, la túnica y las células mioideas peritubulares en el testículo y a las células de la túnica y del estroma en el ovario (Swain y Lovell-Badge, 1999). Las CGP son los precursores embrionarios de los gametos en el adulto y se derivan de células localizadas en la parte más proximal del epiblasto (ectodermo primario). En el ratón las CGP son detectadas por primera vez a los 7.2 dpc como un grupo de 45 células que expresan fosfatasa alcalina en la base del alantoides. Estas CGP migran subsecuentemente (día 8.5) a través del endodermo que dará origen al intestino posterior, se distribuyen a lo largo del intestino posterior y finalmente se dirigen hacia las crestas gonadales a través del mesenterio dorsal (Anderson et al. 2000; Tsang et al. 2001). En contraste, las células somáticas de la gónada se originan tanto

del mesonefros como del epitelio celómico que recubre a la gónada en formación (Byskov, 1986; Karl y Capel, 1998).

En ratones XX y XY, las CGP se forman a los 7.5 dpc en la base del alantoides desde donde migran a través del mesenterio intestinal y colonizan la cresta genital en el día 9.5 pc. Independientemente del complemento cromosómico (XX o XY), las CGP entran simultáneamente a meiosis en el día 13.5 pc en el ratón. En el ovario, las CGP se detienen en la primera profase de la meiosis I hasta que ocurran los ciclos ovulatorios (McLaren, 2000). Varios estudios han demostrado que las CGP son requeridas para la formación de los folículos ya que en su ausencia no se establecen (Huang et al. 1993; Bedell et al. 1995). En contraste, la diferenciación de las células de Sertoli y la formación de los cordones testiculares no son dependientes de las CGP. En ausencia de CGP los cordones testiculares se forman normalmente, lo que indica que las señales necesarias para la formación de estos elementos provienen de estirpes gonadales somáticas.

La expresión del gen determinante de testículo *Sry* en el primordio gonadal origina que los precursores de las células somáticas de soporte se diferencien en células de Sertoli. En ausencia de *Sry*, los precursores somáticos siguen la vía ovárica y se transforman en células foliculares (Hacker, 1995).

La diferenciación de las células de Sertoli en la gónada origina que las CGP sean cercadas dentro del testículo y que se impida el inicio de la meiosis antes del día 13.5 pc (McLaren y

Southee, 1997). Las células de Sertoli son el primer tipo celular en diferenciarse en la gónada masculina y son consideradas un centro organizador del testículo al dirigir a las otras estirpes celulares hacia sus respectivos linajes. Experimentos con ratones quiméricos XX/XY revelaron que el único tipo celular con un importante sesgo para la presencia de cromosoma Y era la célula de Sertoli (Palmer y Burgoyne, 1991). En las gónadas quimeras (XX/XY) que se transformaron en testículos, 90% de las células de Sertoli eran XY mientras que solo 10% eran XX. Todos los demás tipos celulares somáticos mostraron una distribución 50/50 XX:XY. A partir de estos resultados se concluyó que las células de Sertoli que expresaban Sry eran capaces de iniciar la diferenciación de los otros tipos celulares dentro del testículo. Estos experimentos también revelaron que Sry no es indispensable para la diferenciación de las células de Sertoli ya que 10% de las células eran XX. Por lo tanto, es probable que las células somáticas que expresan Sry sean capaces de reclutar al linaje de células de Sertoli a otras células somáticas que no expresan Sry (Capel, 2000). Las células de Sertoli y probablemente los precursores de las células foliculares derivan del epitelio celómico antes del día 11.5 pc. Estudios de expresión de Sry han demostrado que las células pre-Sertoli encienden la expresión de Sry y de otros genes requeridos para la diferenciación de las células de Sertoli después de que estas

se delaminan del epitelio celómico y entran a la gónada (Capel et al. 1999).

Una función central de las células de Sertoli es el sostén de las células germinales durante el desarrollo y posteriormente durante la espermatogénesis. Esta actividad se lleva a cabo mediante la formación de contactos célula-célula y proporcionando los factores necesarios para el crecimiento y la diferenciación (Tillman y Capel, 2002). Un factor implicado en estas interacciones célula-célula es *Desert hedgehog (Dhh)*, un miembro de la familia *hedgehog* de moléculas de señalización. Los estudios de expresión han demostrado que la proteína Dhh está presente en las gónadas masculinas en el día 11.5 pc pero no se observa en las gónadas femeninas. En etapas más tardías de desarrollo testicular, esta proteína está asociada con las células de Sertoli y modula la morfología tubular (Bitgood et al. 1996; Clark et al. 2000).

Las células de Leydig de las gónadas XY se requieren para la producción de testosterona, hormona necesaria para iniciar el desarrollo del tracto reproductivo masculino e inducir el desarrollo de las características sexuales secundarias. Los datos disponibles indican que estas células se originan a partir del mesonefros antes del día 11.5 pc (Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 1998). La contraparte de las células de Leydig en el ovario son las células de la teca y aunque el origen de los precursores de éstas no se identifica tempranamente en el ovario, se estima que es similar al de las células de Leydig.

El otro tipo celular conocido en la gónada XY incluye las células mioides peritubulares y las células endoteliales. Las células mioides son un linaje de músculo liso que colabora con las células de Sertoli para establecer la estructura de los túbulos en el testículo (Skinner et al. 1985). En el adulto, estas células generan una acción peristáltica para bombear el esperma a través de los túbulos. Las células mioides no tienen análogas en los ovarios. Por su parte, las células endoteliales están presentes en gónadas XX y XY, sin embargo para el día 12.5 pc la vasculatura de la gónada XY sufre cambios estructurales importantes entre los que destaca la formación de un gran vaso en la superficie celómica (Martineau, 1998).

Genes requeridos para la formación de la gónada primitiva:

Evidencias disponibles a partir de modelos murinos y de fenotipos asociados a mutaciones específicas en sujetos con falla en la organogénesis testicular han permitido reconocer que el desarrollo normal de la gónada bipotencial en mamíferos requiere la participación de al menos cinco genes. En ratones con delección homocigota del gen tumor supresor ***Wt1***, el epitelio celómico no experimenta engrosamiento, la gónada involuciona tempranamente en el día 14.5 dpc y el desarrollo del riñón se detiene (Kriedberg et al., 1993). En ratones knockout para ***Emx2***, un homólogo en mamíferos de un gen homeótico en *Drosophila*, se observa falta de expansión del epitelio celómico en la superficie de la cresta genital y la gónada no se forma

(Miyamoto et al. 1997). Del mismo modo, ratones con delección homocigota de **Sf1**, que codifica para un factor de transcripción expresado tempranamente en el epitelio celómico de la cresta genital (Ikeda et al. 1994) demuestran regresión por apoptosis del primordio gonadal en el día 12.5 pc y además se detiene el desarrollo suprarrenal (Luo et al., 1994). Finalmente, la ausencia de gónadas en ratones sin copias funcionales de **Lim1** (Shawlot Y Behringer, 1995) y **Lhx9** (Birk et al. 2000) indica que los factores de transcripción codificados por estos genes son también indispensables para los estadios iniciales de desarrollo gonadal.

Diferenciación testicular y gen SRY: En los mamíferos, el desarrollo testicular a partir de la gónada bipotencial está dirigido por la expresión del factor de determinación testicular localizado en el brazo corto del cromosoma Y, denominado **SRY** (*Sex determining Region on the Y-chromosome*) (Sinclair et al. 1990; Goodfellow y Lovell-Badge, 1993). SRY es un gen de un solo exón, codifica un factor de transcripción de 204 aminoácidos con capacidad de unirse al DNA que ocasiona cambios conformacionales en secuencias específicas a través de un dominio conservado de 80 residuos denominado caja HMG (por *High Mobility Group*). La proteína SRY activa la expresión de diversos factores moleculares aún no identificados en una cascada génica que culmina con la diferenciación testicular (Capel et al. 1999). A excepción de la caja HMG, la secuencia

de SRY varía notablemente entre los mamíferos (Whitfield et al. 1993) y se ha observado que este gen ha evolucionado rápidamente en mamíferos por divergencia de secuencia y por cambios estructurales como inserción intrónica, amplificación génica y delección génica (O'Neill et al. 1999). No se ha encontrado un homólogo a SRY fuera de los mamíferos pero el hecho de que ciertos roedores no tienen Sry (Koopman, 1999) ha permitido establecer que SRY fue involucrado en la determinación sexual solo durante los últimos 130 millones de años (Koopman et al. 1999).

En el ratón, la expresión de Sry en el primordio gonadal es breve y ocurre entre los días 10.5 a 12 pc. Sry induce la diferenciación de las células de Sertoli a partir de uno de los linajes somáticos de la gónada bipotencial (Hacker et al. 1995). En humanos, la gónada expresa SRY coincidentemente con la formación de los cordones sexuales y persiste hasta la semana 18 como una proteína localizada dentro del núcleo de las células de Sertoli (Hanley et al. 2000). Como se ha mencionado previamente, una vez que las células de Sertoli se han especificado, inducen la diferenciación de los demás tipos celulares dentro del testículo (McLaren, 2000).

En los casos en que SRY no se expresa (como sucede normalmente en los productos 46,XX), la gónada indiferenciada se transformará en ovario. Por esta razón y por el hecho de que aún no se han logrado identificar genes promotores de ovario, la diferenciación de la gónada femenina es considerada un

proceso pasivo secundario a la ausencia de *SRY* (Koopman, 2001). Después de la expresión de *SRY* la gónada aumenta su tamaño y las células se reorganizan en estructuras semejantes a cordones (Koopman, 1995). Por el contrario, en ausencia de *SRY* se observan pocos cambios en la organización estructural de la gónada.

A pesar de que *SRY* es considerado el "switch" para el inicio de la diferenciación testicular en mamíferos, en los últimos años se han identificado diversos genes que son indispensables para el desarrollo testicular y que actúan río arriba de *SRY* en una intrincada red molecular que comienza a ser dilucidada. La integridad y expresión espacio-temporal apropiada de genes como *SOX9*, *DAX1*, *DMRT1* y *WNT4* es necesaria para la formación normal del testículo (revisado en: Chan y Rennert, 2002 y en Lovell-Badge et al. 2002).

Diferenciación sexual fenotípica: La formación del fenotipo masculino o femenino está determinada por la acción de las hormonas sintetizadas por el testículo fetal o por la ausencia de síntesis ovárica de estas hormonas (Nef y Parada, 2000). El mecanismo responsable del dimorfismo fenotípico en los mamíferos fue descrito originalmente por Alfred Jost (1947; 1953), quien demostró que cuando la gónada primitiva se diferencia a testículo, la producción hormonal de este órgano induce el desarrollo del fenotipo masculino. En cambio, si la diferenciación gonadal se establece hacia ovario, el fenotipo

será femenino, aparentemente de manera pasiva. La ausencia temprana de gónadas fetales también induce un fenotipo femenino, lo cual apoya el concepto de inactividad endócrina del ovario fetal (Grumbach y Conte, 1992). Durante el período bipotencial del desarrollo sexual (antes de la semana 8 de vida intrauterina), los fetos XX y XY presentan dos pares de conductos genitales internos asociados con el mesonefros y con la gónada primitiva: los conductos Mullerianos o paramesonéfricos, que tienen el potencial para diferenciarse en los órganos genitales internos de la mujer y los conductos de Wolff o mesonéfricos que originarán el tracto genital interno del varón (Byskov y Hoyer, 1994) (**Figura 3**).

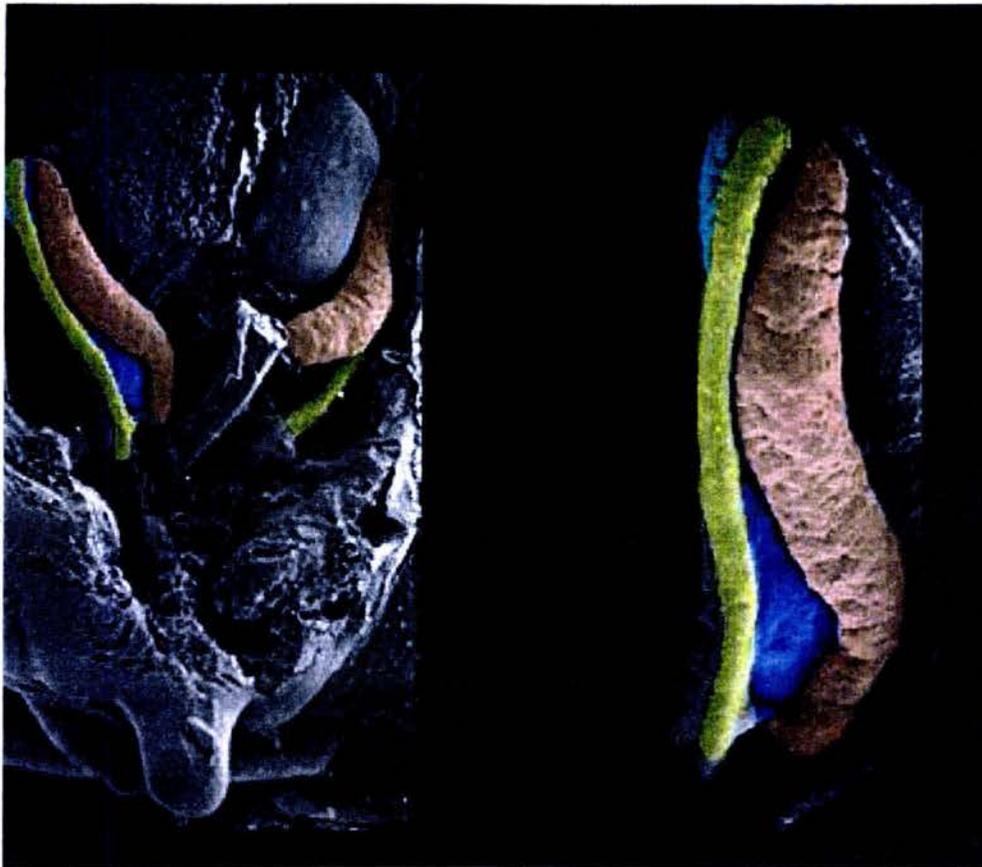


Figura 3.- Relación anatómica entre la gónada en desarrollo (rosa) y los conductos Wolffianos o mesonéfricos (verde) y Mullerianos o paramesonéfricos (amarillo) en el embrión humano a las 7 semanas de desarrollo. El mesonefros se observa de color azul en la región posterior y el riñón se localiza por arriba del polo superior de la gónada (panel de la izquierda).

La diferenciación masculina extragonadal resulta de la acción de 2 hormonas secretadas por el testículo fetal: la hormona inhibidora de estructuras Mullerianas (HIM) y la testosterona (Nef y Parada, 2000). A partir de la 8ª semana, la HIM producida por las células de Sertoli inducirá la involución de los conductos Mullerianos, precursores de las trompas de Falopio, del útero y del tercio superior de la vagina. Por su parte, las

células de Leydig producen el andrógeno testosterona que promoverá la maduración del epidídimo, los conductos deferentes y las vesículas seminales a partir de los conductos Wolffianos. La conversión local de testosterona a dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa dirige la formación de los genitales externos (pene y escroto) así como de la próstata (Hughes, 2001). En la mujer, la ausencia de HIM permitirá que los conductos Mullerianos se diferencien en trompas, útero y tercio superior de vagina, la ausencia de testosterona ocasionará la atrofia de los conductos Wolffianos y la falta de dihidrotestosterona mantendrá la feminización de los genitales externos. De este modo, se considera que SRY, la HIM y la testosterona imponen un patrón de diferenciación masculina a un programa que es inherentemente femenino (Quigley, 2001) (**Figura 4**).

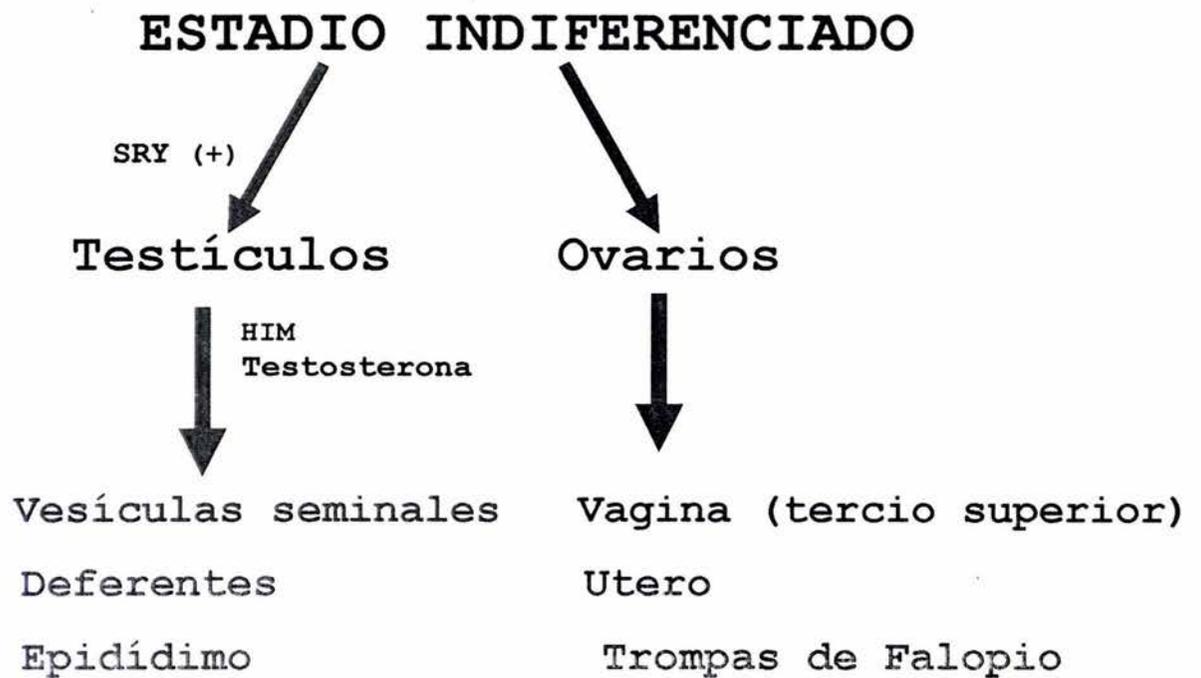
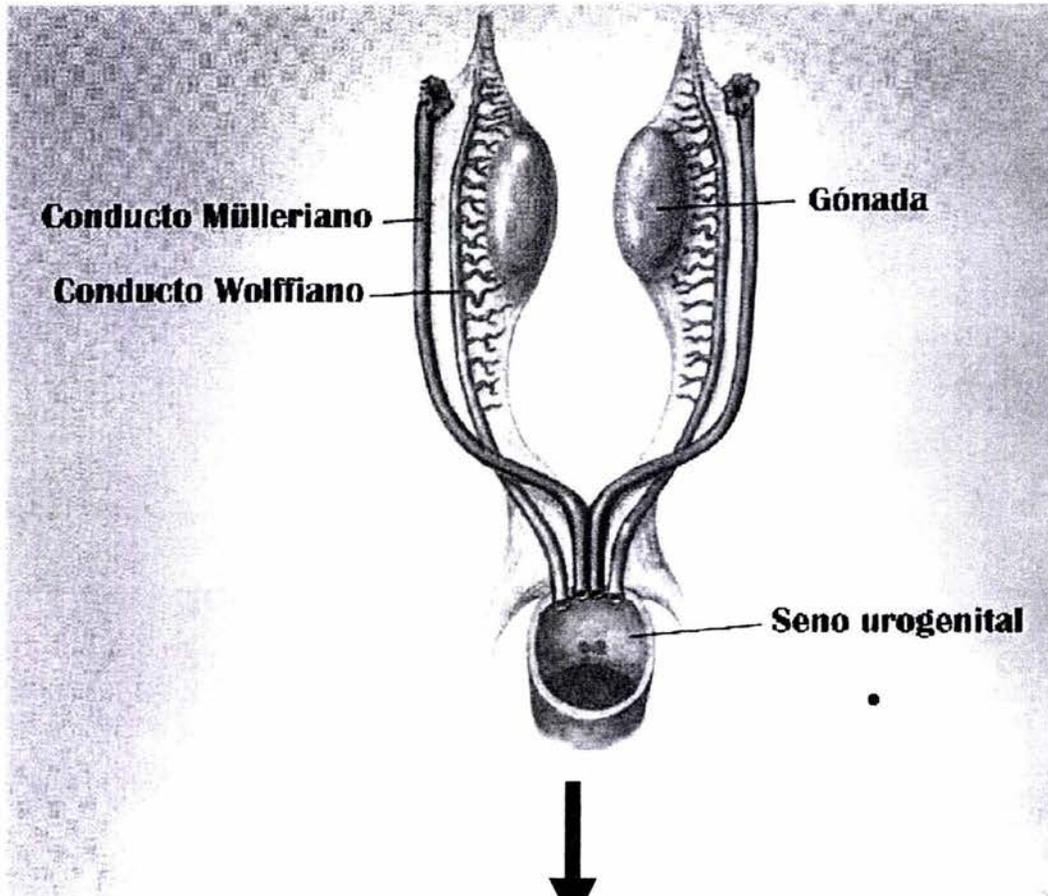


Figura 4.- Desarrollo de los genitales internos en el varón (en rojo) y la hembra (en azul) a partir de los conductos Wolffianos y Mullerianos, respectivamente.

Desarrollo de los conductos genitales internos: A diferencia de la gónada, la diferenciación de los conductos reproductivos internos masculinos (Wolffianos) y femeninos (Mullerianos) se inicia muy tempranamente después de su formación y la decisión del desarrollo de estructuras reproductivas funcionales femeninas o masculinas depende totalmente del sexo gonadal (Byskov y Hoyer, 1994). Ambos conductos se originan de una invaginación del epitelio celómico lateral a cada mesonefros.

Los conductos Mullerianos y Wolffianos no se originan simultáneamente. El conducto Wolffiano es el conducto excretorio del mesonefros y puede ser reconocido incluso antes de la formación de las gónadas. Por el contrario, el conducto Mulleriano (paramesonéfrico) se desarrolla en dirección cráneo-caudal en una etapa más tardía que coincide con la formación de las gónadas. Se ha sugerido que el conducto Wolffiano funciona como guía para el desarrollo temprano del conducto Mulleriano (Dohr, 1984). Otros estudios indican sin embargo que el conducto Wolffiano libera células epiteliales que contribuyen a la formación del conducto Mulleriano (Grunwald, 1941). En estadios tempranos de desarrollo, ambos conductos son simplemente túbulos rectos recubiertos de un epitelio simple de células cilíndricas pero a medida que se desarrollan los conductos este epitelio se vuelve más elevado. La diferenciación subsecuente de los conductos depende de interacciones mesenquimatosas-epiteliales, en las que el

mesénquima es probablemente el mediador o blanco de la acción morfogénica de hormonas y otras sustancias (Cunha, 1981).

En la mujer la parte craneal de los conductos Mullerianos se transforma en las trompas de Falopio, la parte media en el útero y la parte caudal contribuye al tercio superior de la vagina. En algunas especies de roedores los conductos Mullerianos permanecen separados en el período postnatal como úteros pareados mientras que en otras se fusionan para formar un tipo simple de útero (O'Rahilly, 1973). El oviducto se diferencia tempranamente en tres segmentos: el ampulla, el infundíbulo y el istmo. La unión entre el útero y el oviducto se reconoce tempranamente por el aumento abrupto del diámetro uterino mientras que la demarcación entre el útero y la vagina será evidente más tardíamente (Patten, 1953). En el feto humano, el útero empieza a diferenciarse a las 9 ½ semanas en una porción superior (el cuerpo) y una parte inferior (el cervix). Inicialmente ambas estructuras son de la misma longitud pero el cervix alcanza gradualmente dos tercios de la longitud total del útero.

El desarrollo y crecimiento temprano del conducto Mulleriano se consideran autónomos ya que aparentemente no se requiere estimulación hormonal para la diferenciación del tracto genital femenino. Esto ha sido demostrado en experimentos en los que ni la decapitación ni la castración de fetos de conejo femeninos impide el crecimiento de los conductos Mullerianos y sus derivados (Jost, 1953). Esto indica

que las gonadotropinas y la presencia del ovario son dispensables para la diferenciación del tracto genital femenino. También se ha observado desarrollo normal del tracto genital de ratas hembra cultivado en un medio libre de esteroides (Picon, 1969).

Durante el desarrollo femenino normal, los conductos Wolffianos degeneran invariablemente debido a la ausencia de andrógenos; esta degeneración inicia poco después de la diferenciación gonadal y finaliza generalmente al inicio del tercer trimestre (Josso, 1981). Sin embargo, antes de que la degeneración se complete la parte caudal del conducto Wolffiano da origen a la yema uretérica y también contribuirá a la formación de la vejiga y de la uretra. En el varón, la parte craneal de los conductos Wolffianos se transformará en el epidídimo, la parte central se convertirá en los conductos deferentes y la porción caudal formará los conductos eyaculadores y la vesícula seminal. Algunos de los túbulos mesonéfricos craneales, que están conectados con el *rete testis*, son conservados como ductos eferentes del epidídimo. Durante la diferenciación del epidídimo, los conductos Wolffianos crecen en longitud, se vuelven notoriamente contorneados y desarrollan un epitelio columnar que en el humano inicia actividad secretora en el tercer trimestre de desarrollo (Zondek, 1965). El conducto epididimario se rodea de células mesenquimatosas dispuestas concéntricamente, las cuales se diferencian en una capa delgada de células musculares lisas.

Las vesículas seminales primitivas se originan por una distensión de la parte caudal del conducto Wolffiano y están cubiertas por un epitelio columnar alto no-secretorio, asociado a una membrana basal bien definida. Durante su diferenciación, la luz de la vesícula seminal adquiere gradualmente su forma contorneada característica (Byskov y Hoyer, 1994).

El crecimiento y la diferenciación de los conductos Wolffianos están controlados por la testosterona, aunque existen evidencias de que la dihidrotestosterona puede ser también importante para el desarrollo del epidídimo (Tsuji et al. 1991). El mecanismo por el cual la testosterona induce la diferenciación de los conductos Wolffianos masculinos no se ha identificado completamente. Proteínas como la prostaglandina E2 son capaces de inducir el desarrollo Wolffiano en ausencia de testosterona, mientras que inhibidores de fosfolipasa A2 (cortisona y dexametasona) e inhibidores de la ciclooxigenasa (aspirina e indometacina) bloquean su diferenciación; tales efectos son reversibles cuando se suplementa prostaglandina E (Gupta, 1992). Estos experimentos indican que la diferenciación de los conductos Wolffianos dependiente de testosterona requiere la síntesis de prostaglandinas dentro del tracto reproductivo. Por otra parte, existe evidencia de que el factor de crecimiento fibroblástico básico es necesario para el crecimiento y diferenciación del aparato genital interno masculino (Alarid et al. 1991).

Regresión de los conductos Mullerianos: En 1965 Hamilton y Teng describieron la regresión de los conductos Mullerianos como un proceso clásico de apoptosis en la remodelación de tejido durante la organogénesis (Hayashi et al. 1982). Este proceso es también observado durante la reabsorción de los espacios interdigitales en la formación de los dedos y en la morfogénesis por ramificación de las glándulas salivales y el pulmón.

Los análisis con microscopía electrónica y con marcadores para proteínas específicas de membrana han demostrado que la ruptura de la membrana basal es uno de los signos morfológicos más tempranos de la regresión de los mullerianos (Hayashi et al. 1982; Trelstad et al. 1982). La fragmentación se acompaña de pérdida de tinción de fibronectina y desprendimiento de las células epiteliales, que migran hacia fuera del compartimiento epitelial para contribuir a un doblez mesenquimal alrededor de la membrana basal rota (Dyche, 1979). Algunas de las células que experimentan transformación epitelial-mesenquimal migran profundamente dentro del mesénquima (Allard et al. 2000) y se sitúan progresivamente en el mesonefros, el cual también es reabsorbido poco después (Hutson et al. 1984).

Desde las primeras investigaciones del proceso se reconoció que debe existir diálogo entre las capas mesenquimatosas y epitelial de los conductos mullerianos para que ocurra la regresión (Hutson et al. 1984; Tsuji et al. 1992). Esta aseveración fue reforzada por la observación de la expresión de

los receptores de HIM en el mesenquima que rodea al conducto. Los análisis más recientes han confirmado que la HIM puede inducir apoptosis en las células epiteliales del conducto Mulleriano vía un mecanismo parácrino de señales derivadas del mesénquima que expresa el receptor de HIM tipo II (Roberts et al. 1999) y que la apoptosis es progresiva desde la región cefálica o craneal hacia la región caudal e implica señalización de beta-catenina (Allard, et al. 2000). La porción craneal del conducto Mulleriano, que se convertirá en trompa de Falopio, es la más sensible a la HIM (Hutson et al. 1983).

Los conductos paramesonéfricos o de Müller se desarrollan en los fetos masculinos y femeninos, a ambos lados de la línea media, a partir de la 5^a. semana. Crecen caudalmente dando origen a los esbozos de las trompas de Falopio y se unen en la línea media para formar el esbozo del conducto útero-vaginal. En el feto masculino, la regresión de los conductos de Müller ocurre en sentido céfalo-caudal entre la 9^a. y la 11^a. semanas y se completa aproximadamente en la 12^a. semana (Taguchi et al. 1984). La acción de la HIM que genera el proceso de regresión debe ocurrir durante la 8^a. semana, período crítico durante el cual los conductos de Müller son sensibles a la hormona (Taguchi et al. 1984). La exposición de los conductos de Müller a la HIM después del período crítico no impide el desarrollo del útero, las trompas y el tercio superior de la vagina; del mismo modo, aunque cese la producción de la HIM después de la 8^a. semana la regresión de los conductos de Müller se

completará (Josso et al. 1977). Estas observaciones dan cuenta de la extrema importancia que tiene la ontogenia de expresión de la HIM y su receptor durante la vida fetal.

Descubrimiento de la HIM: El anatomista y fisiólogo alemán Johannes Muller (1801-1858) realizó la primera descripción de las estructuras que luego serían conocidas como conductos de Müller. Los conductos Wolffianos, llamados así por el anatomista alemán Caspar F. Wolf (1733-1794), son la contraparte masculina de los conductos de Muller. En 1916, se reportó por primera vez el fenómeno de freemartinismo, el producto de gemelos bovinos heterosexuales con una misma placenta (Lillie, 1916). Este fenómeno, reconocido también como un ejemplo de quimerismo inmunológico, es de gran importancia para la comprensión de la biología reproductiva ya que la hembra del par de gemelos presentaba regresión de los conductos Mullerianos y masculinización de genitales externos, presumiblemente debido a factores solubles producidos por las gónadas masculinas del gemelo macho. Ahora se sabe que esos factores son la HIM y la testosterona.

Alfred Jost (1947) realizó experimentos embrionarios *in vivo* que demostraron la existencia de lo que el llamó "hormona inhibitricea" o "inhibidor mulleriano". Usando fragmentos de testículo embrionario implantados en embriones femeninos de conejo antes de la etapa de diferenciación sexual, encontró, como en el ternero freemartin, que los animales presentaban

virilización externa y mostraban estimulación de los conductos wolffianos y regresión de los conductos Mullerianos. Cuando reemplazó los implantes testiculares con botones que contenían testosterona, los embriones femeninos se masculinizaron, pero no mostraron regresión de los conductos Mullerianos. Estos experimentos le llevaron a proponer la existencia de otro producto testicular (Jost, 1953) además de la testosterona; Este factor se conoce ahora como HIM. Tales observaciones le permitieron explicar las diferencias fenotípicas en pacientes con anomalías intersexuales debidas a hiperplasia suprarrenal congénita en los que el exceso de testosterona de origen suprarrenal masculinizaba los genitales externos en sujetos femeninos pero no afectaban el desarrollo de los conductos Mullerianos; también en los síndromes de insensibilidad androgénica sugirió que los testículos producen HIM funcional que originaba la regresión normal de los derivados Mullerianos.

La hormona inhibidora de Mullerianos (HIM): La hormona, de naturaleza glucoproteica, recibe otros nombres alternativos en la literatura internacional como *Anti-Müllerian Hormone* (AMH) y *Müllerian Inhibiting Substance* (MIS). La HIM fue purificada inicialmente de testículos bovinos fetales y neonatales (Josso, 1972), a partir de donde se describieron sus características bioquímicas (Picard y Josso, 1984). Desde entonces, la HIM de diferentes especies -incluida la humana- ha sido caracterizada (Josso, 1993). La HIM humana es un dímero glucoproteico de 140

kD, formado por dos monómeros de 70 kD unidos por puentes disulfuro, perteneciente -junto con las inhibinas, activinas y las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP, por sus siglas en inglés), entre otras- a la familia de factores de crecimiento del factor de crecimiento transformante (TGF- β , por sus siglas en inglés) (Cate et al. 1986). La traducción del RNA mensajero de la HIM produce un propéptido de 560 aminoácidos del que es removida una secuencia líder de 24 aminoácidos (MacLaughlin et al. 1992). La hormona de 140 kD sufre cambios post traduccionales y es cortada a nivel del órgano blanco, dando origen a un fragmento C-terminal activo de 25 kD (MacLaughlin et al. 1992) y a un fragmento N-terminal de 110 kD (Nachtigall et al. 1996). Este último, de escasa actividad intrínseca, es necesario para mejorar la actividad del fragmento C-terminal (Wilson et al. 1993), que es el motivo con actividad biológica y tiene 20 a 40% de homología a nivel de aminoácidos con miembros de la superfamilia del TGF- β (Cate et al. 1986). Además de inhibir el desarrollo de los conductos Mullerianos, la HIM ha sido implicada en procesos como antiproliferación (Donahoe et al., 1981), retardo de la meiosis en oocitos (Takahasi et al. 1986), descenso testicular (Yamanaka et al. 1991) y maduración pulmonar fetal (Catlin et al. 1990).

El gen de la HIM: El gen de la HIM humana fue clonado simultáneamente en 1986 por los grupos de Richard Cate y Patricia Donahoe en Boston (Cate et al. 1986) y de Nathalie Josso en París (Picard et al. 1986). Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 19, banda p13.3 (Cohen-Haguenauer et al. 1987), es relativamente pequeño, de 2,7 kb divididos en 5 exones y con un alto porcentaje de guaninas (G) y citosinas (C). El exón 5, que codifica el extremo N-terminal, contiene una proporción de bases GC de hasta 80% (Cate et al. 1986; Lane y Donahoe, 1998). Se ha identificado un sitio principal de inicio de transcripción a -10 pares de bases del codón de inicio y 3 sitios menores a -24, -34 y -44 (Guerrier et al. 1990).

El promotor del gen de la HIM no tiene una caja TATA característica; en cambio, presenta una región a la cual se une TFII-I, un factor que reemplaza al clásico TFII-A en la iniciación de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II (Morikawa et al. 2000). También se han hallado diversos elementos de respuesta a factores de transcripción en la porción proximal flanqueadora 5'; por ejemplo, existen 2 sitios de unión para SF-1 (*steroidogenic factor-1*) (Watanabe et al. 2000), 3 sitios GATA (Nicaud et al. observaciones no publicadas) y un sitio de unión para SOX9 y SRY (Arango et al. 1999). Otra particularidad del gen de la HIM es la presencia, 762 pb antes del sitio de inicio de la transcripción, del gen SAP62, que codifica para una proteína implicada en el proceso

de "splicing" (Dresser et al. 1995). El significado funcional de la presencia de SAP62, activo constitutivamente en todas las células del organismo, a tan corta distancia del gen de la HIM, permanece aún desconocido.

Regulación de la producción de HIM en la vida fetal: La HIM debe ser producida sólo por la gónada fetal masculina en un período crítico para que su acción durante la diferenciación sexual sea adecuada. Ello supone un estricto control temporal y espacial de su expresión. El primer factor propuesto como regulador de la expresión de HIM fue el gen determinante testicular SRY, puesto que se expresa específicamente en el mismo tipo celular que la HIM, no se expresa en el sexo femenino (Münsterberg et al. 1991) y además porque existe en el promotor de la HIM una secuencia capaz de responder a SRY (Haaq et al. 1993; Haaq et al. 1994). Sin embargo, transcurren demasiadas horas entre el pico de expresión de SRY y el inicio de la transcripción de la HIM (Morais da Silva et al. 1991), lo que permite descartar a SRY como un regulador directo del gen de la HIM.

Resumiendo una serie de trabajos realizados durante los últimos años utilizando manipulaciones genéticas en ratones, ha sido posible demostrar la participación de moléculas como SOX9, GATA-4, DAX-1 y WT-1 en la regulación de la transcripción de la HIM. En el promotor proximal de la HIM existen sitios de unión para SOX9 (el mismo al que se une SRY), GATA-4 y SF-1 (Watanabe

et al. 2000). Experimentos de transfección en células en cultivo han demostrado que SF-1 (Shen et al. 1994) y SOX9 (De Santa Barbara et al. 1998) son activadores transcripcionales directos del gen de la HIM, mientras que WT-1 y DAX-1 modulan la expresión del gen al interactuar con SF-1 (Nachtigal et al. 1998; Tremblay et al. 2001a). El factor GATA-4 podría actuar tanto directamente sobre el promotor de la HIM (Tremblay et al. 2001b) como indirectamente mediante una interacción proteína-proteína con SF-1 (Tremblay et al. 1999). Modelos de ratones transgénicos han permitido demostrar *in vivo* varios de los mecanismos de regulación propuestos (Giulli et al. 1997; Arango et al. 1999); SOX9 parece ser el principal responsable de la iniciación de la producción de HIM en el feto, mientras que SF-1 intensifica los niveles de expresión mas tardíamente (Arango et al. 1999). Sin embargo, este tipo de regulación no parece ser universal: en aves y reptiles, la expresión de SOX9 sólo aparece después de la de la HIM (Oreal et al. 1998; Western et al. 1999). Por otro lado, dada la existencia de más de un elemento de respuesta a SF-1 y GATA-4, la mutación de uno de ellos resultaría solo en una inhibición parcial de la producción de HIM por la célula de Sertoli (Watanabe et al. 2000).

Receptor tipo II de HIM (AMHR-II): Los miembros de la familia del TGF- β actúan por intermedio de dos tipos de receptores. El receptor que une al ligando se denomina receptor tipo II y presenta un solo dominio de transmembrana con actividad de serina treonina quinasa. Este receptor no es capaz, por sí mismo, de transducir la señal al interior de la célula; para ello, necesita reclutar otra serina treonina quinasa de transmembrana, el receptor tipo I, al que fosforila. Este, a su vez, fosforila proteínas citoplásmicas de la familia Smad, responsables de llevar la información hacia el núcleo (Massague, 1998).

El primer receptor de la HIM identificado fue el tipo II, así llamado por su homología con el receptor tipo II de TGF- β (di Clemente et al. 1994; Baarends et al. 1994). El gen humano del receptor tipo II de la HIM (denominado AMHR-II) está compuesto por aproximadamente 8 kb dispuestos en 11 exones y está localizado en el brazo largo del cromosoma 12, banda 12q13 (Imbeaud et al. 1995; Visser et al. 1995). Los exones 2 y 3 codifican la porción del dominio extracelular del receptor a la cual se une la HIM, mientras que el exón 4 codifica el dominio transmembranal (Imbeaud et al. 1995). El dominio intracelular presenta capacidad de autofosforilarse a nivel de residuos de serina y treonina, como así también de fosforilar al receptor tipo I.

El receptor AMHR-II se expresa en las células mesenquimáticas que rodean al epitelio de los conductos de

Müller de fetos masculinos y femeninos (Roberts et al. 1999), siguiendo un patrón témporo-espacial definido. Al principio está presente en mayor cantidad en el extremo cefálico de los conductos de Müller y luego su expresión se va desplazando caudalmente (Allard et al. 2000). Esto probablemente explica porqué la regresión de los conductos de Müller ocurre progresivamente en sentido céfalo-caudal (**Figura 5**).

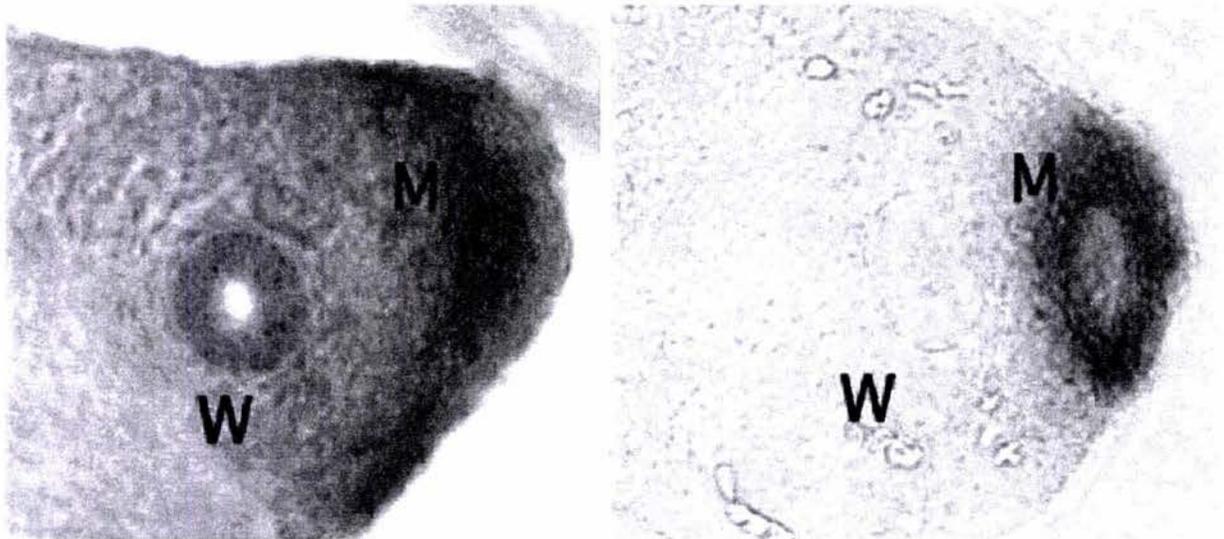


Figura 5.- Análisis por hibridización in situ que demuestra la co-expresión de la proteína de uno de los candidatos a receptor tipo de la HIM (panel de la izquierda) y de la proteína del receptor tipo II (derecha). La expresión de ambas proteínas se circunscribe al mesénquima que rodea a los conductos Mullerianos (M) durante la etapa de regresión; W, conductos Wolffianos (Tomado de: Teixeira et al. *Endocr Rev* 22:657-674,2001).

AMHR-II también se expresa en ciertos tipos celulares de las gónadas. En el testículo AMHR-II está presente en las células de Sertoli fetales; su expresión durante la vida posnatal

parece variar según las especies: en el conejo desaparece después de la pubertad, pero persiste en la rata adoptando un patrón característico que depende del estadio del ciclo del epitelio seminífero en el testículo adulto (Baarends et al. 1995). Las células de Leydig y sus precursores mesenquimáticos también expresan el receptor II de HIM en su superficie (Racine et al. 1998; Lee et al. 1999). En el ovario, varios grupos han demostrado que AMHR-II se expresa en las células de la granulosa (Baarends et al. 1995; Dutertre et al. 2001). Además existe evidencia que sugiere que AMHR-II está también presente en el epitelio superficial del ovario (Ha et al. 2000), en el útero adulto (Wang et al. 1994) y en la glándula mamaria (Segev et al. 2000), lo que es de gran interés diagnóstico y terapéutico en los carcinomas ovárico, cervico-uterino y mamario.

Poco se conoce sobre los factores que regulan la expresión de AMHR-II. El único factor cuya función como transactivador de AMHR-II ha sido fehacientemente comprobada es SF-1 (de Santa Barbara et al. 1998; Teixeira et al. 1999). Sin embargo, también se han identificado en el promotor del gen sitios de unión para factores de transcripción sintetizados por las células de soporte gonadales tales como SOX9, GATA y Sp1 (Josso y di Clemente, 2003). Finalmente, es interesante la observación de que los ratones "knockout" para el gen Wnt-7a pierden completamente la expresión de AMHR-II (Parr et al. 1998). Sin

embargo, hasta el momento no se conoce el mecanismo por el cual Wnt-7a podría regular al receptor tipo II de HIM.

Receptor tipo I de la HIM: Los receptores tipo I de la familia del TGF- β , también conocidos como ALK (*Activin receptor-like kinase*), son proteínas con un dominio transmembranal, que son activados cuando el receptor tipo II respectivo lo fosforila en su dominio GS -rico en glicina y serina- intracelular (Massagué et al. 1998). Algunos de estos receptores tipo I no son específicos y pueden formar heterodímeros con diferentes receptores tipo II de la familia del TGF- β . Trabajos recientes parecen indicar que existen por los menos dos receptores tipo I no específicos involucrados en la transducción de la señal de la HIM. El receptor **ALK6**, también conocido como BMPR-IB (receptor tipo IB de *Bone Morphogenetic Protein*), forma un heterodímero con AMHR-II. Tal como ocurre cuando es activado por el receptor tipo II de BMP, cuando es fosforilado por AMHR-II, ALK6 activa la proteína Smad1; ésta se une con Smad4 y el dímero es translocado al núcleo donde actúa como factor transcripcional luego de fijarse a elementos de respuesta específicos en el promotor de los genes blanco (**Figura 6**) (Gouédard et al. 2000). Por otra parte, otro receptor tipo I llamado **ALK2** o ActR-IA (receptor tipo IA de Activina) también es activado por AMHR-II y transduce su señal vía Smad1 (Visser et al. 2001). Tanto ALK2 como ALK6 muestran una expresión ubicua en el organismo, lo cual indica que la especificidad de

la acción de la HIM está dada por la existencia del receptor tipo II, AMHR-II (Visser et al. 2001). Finalmente, basándose en estudios en modelos murinos otro grupo publicó recientemente que el receptor **ALK3**, también conocido como BMPR1B, es el receptor tipo I requerido para la inducción de la regresión de Mullerianos mediada por HIM (Jamin et al. 2002).

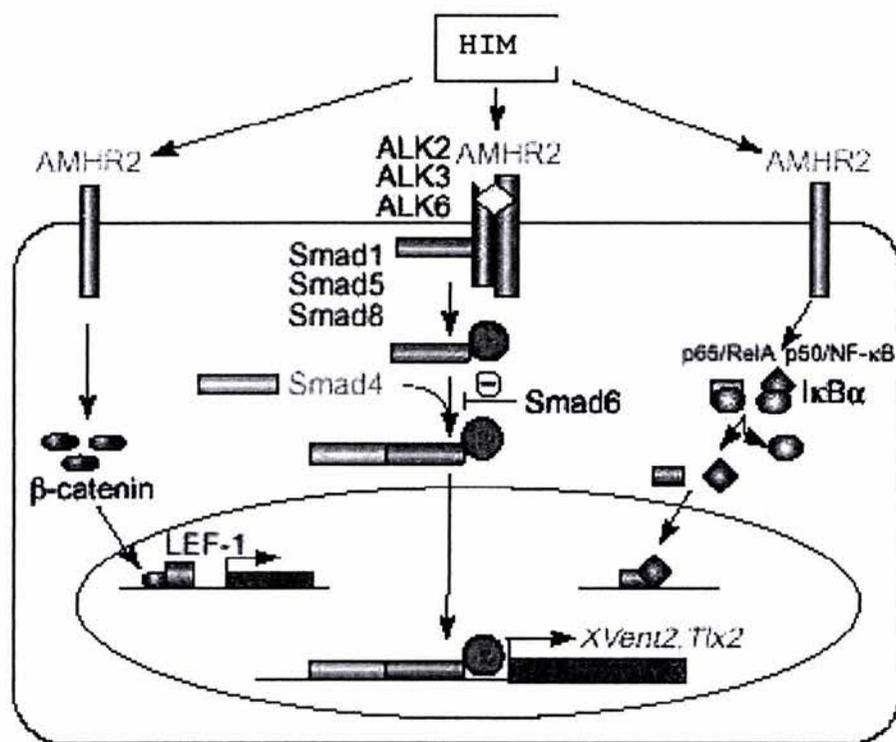


Figura 6.- Vía de señalización propuesta para la HIM. La unión de la hormona a su receptor de membrana tipo 2 (AMHR-II) dispara la formación de un complejo entre AMHR-II y uno o varios receptores tipo I candidatos (ALK2, ALK3 o ALK6). El receptor tipo I activado fosforila moléculas Smad 1, 5 u 8 que se unen a Smad 4 y entran al núcleo para activar genes blanco. Vías de señalización accesorias implican la unión de β -catenina a LEF-1 (*linfoid enhancer protein-1*) (Tomado de: Josso y di Clemente. Trends Endoc Metab. 14:91-97,2003)

Ontogenia de la producción de HIM: En el sexo masculino, la HIM es producida exclusivamente por las células de Sertoli del tubo seminífero (Tran et al. 1977), como ha podido comprobarse en individuos anórquidos o con disgenesia gonadal (Lee et al. 1997; Rey et al. 1999). Las células de Sertoli comienzan a expresar el gen de la HIM apenas se inicia la diferenciación testicular fetal, a fines de la 7^a. semana (a partir de la fecha de última menstruación, lo cual equivale aproximadamente a 5 semanas de desarrollo embrionario), produciendo altas cantidades de HIM durante casi toda la vida fetal. En las últimas semanas, los niveles de HIM disminuyen y se mantienen relativamente bajos hasta 1-2 semanas después del nacimiento (Lee et al. 1996; Schwindt et al., 1997); a partir de entonces, la secreción testicular de HIM vuelve a niveles elevados, manteniéndose así hasta el inicio del desarrollo puberal (Lee et al. 1996). Durante la pubertad, la producción testicular de HIM disminuye progresivamente (Rey et al. 1993). En el adulto, la expresión de HIM es indetectable mediante inmunohistoquímica (Rajpert-De Meyts et al. 1999) y sólo pueden identificarse niveles bajos en suero o en plasma seminal, usando ensayos inmunoenzimáticos de alta sensibilidad (Fallat et al. 1996; Fénichel et al. 1999) (**Figura 7**).

La HIM es también producida en el sexo femenino; sin embargo, existen claras diferencias entre los sexos: el ovario produce muy bajas cantidades de HIM, sólo a partir de la 36^a.

semana de vida intrauterina (Rajpert-De-Meyts et al. 1999) y hasta el inicio de la menopausia (Rey et al. 1996). En el ovario, la HIM es sintetizada por las células de la granulosa de folículos primarios, secundarios y antrales; los folículos primordiales y atrésicos y el cuerpo lúteo no producen la hormona (Whitman et al. 1991; Rey et al. 2000).

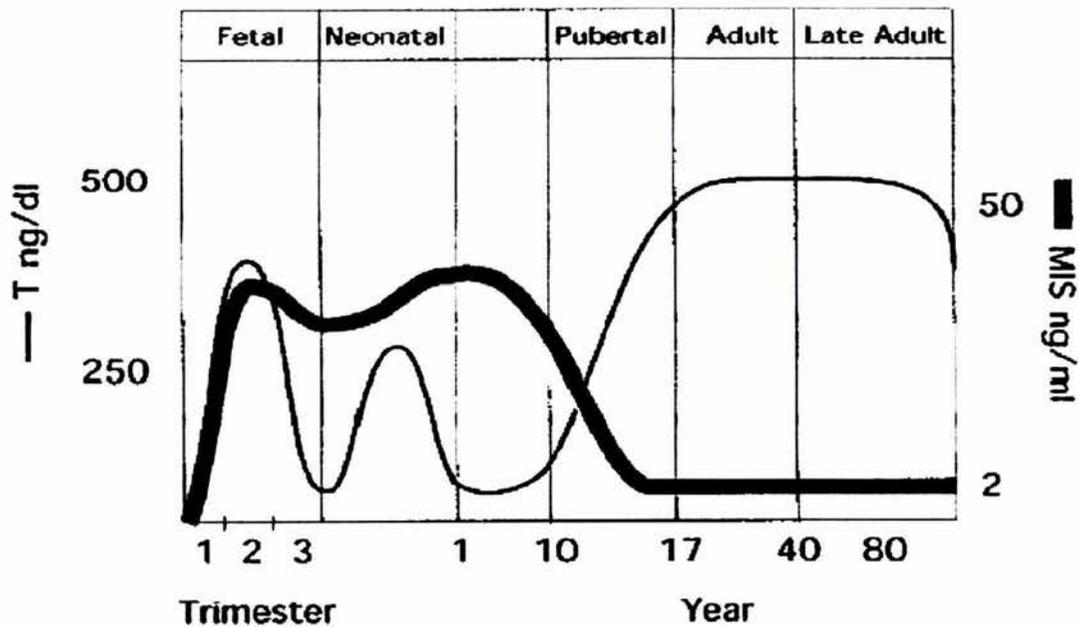


Figura 7.- Niveles de T (línea delgada) y de HIM (línea gruesa) en diferentes etapas de la vida en el varón (tomado de: Teixeira et al. Endocr Rev 22:657-674,2001) .

OTRAS ACCIONES DE LA HIM.

En las gónadas: La coincidencia de expresión de la HIM y de su receptor en las células de Sertoli del testículo sugirió la posibilidad de que existiesen mecanismos autocrinos de regulación. La HIM es capaz de inhibir la aromatización de testosterona a estradiol en células de Sertoli en cultivo (Rouiller-fabre, 1998) pero la importancia fisiológica de esta actividad no ha sido aún esclarecida. En cambio, el efecto de la HIM sobre las células de Leydig del intersticio testicular ha sido investigado en profundidad. En ratones transgénicos con una sobreexpresión de HIM se observa hipoplasia de células de Leydig e hipoandrogenismo (Behringer et al. 1990; Lyet et al. 1995), mientras que ratones "knockout" para la HIM o para el AMHR-II presentan hiperplasia de células de Leydig (Behringer et al. 1994; Mishina et al. 1996). Estudios histológicos cuantitativos y moleculares demostraron que la HIM se fija sobre su receptor en los precursores de las células de Leydig, bloqueando su diferenciación y la expresión de enzimas esteroidogénicas (Teixeira et al. 1999; Trbovich et al. 2001).

Si bien los niveles de HIM producidos en el sexo femenino son bajos (Rey et al. 1996), las células de la granulosa secretan HIM y expresan el receptor AMHR-II, lo cual hizo pensar en un rol de la HIM en la regulación local de la gónada femenina. En fetos bovinos *freemartins* (productos de preñez gemelar con un feto masculino y otro femenino), los niveles

elevados de HIM provenientes del feto masculino inhiben la aromatasa en el feto femenino, pudiendo llegar hasta provocar una depleción de las células germinales y una "masculinización" del ovario (Vigier et al. 1989). Estas observaciones fueron confirmadas experimentalmente usando modelos "in vitro" (di Clemente et al. 1992) o ratones hembra que sobreexpresan HIM (Behringer et al. 1990). Un modelo útil son los ratones hembra con knockouts de los genes de HIM o del AMHR-II. Los primeros estudios demostraron que tales hembras son fértiles y sugirieron que la HIM no es imprescindible para el funcionamiento normal del ovario (Behringer et al. 1994; Mishina et al. 1996). Sin embargo, estudios detallados han demostrado que en estos animales el reclutamiento folicular está acelerado, llevando a una depleción precoz de folículos primordiales (Durlinger et al. 1999).

En el descenso testicular: Algunos autores han propuesto que la HIM juega un papel en el descenso testicular basados en observaciones realizadas en pacientes con mutaciones en el gen de la HIM quienes presentan testículos no descendidos. Estos datos implicarían a la HIM como un factor estimulador del gubernaculum testicular (Hutson et al. 1994; Hutson et al. 1997). Sin embargo, otros grupos sostienen que la criptorquidia observada en estos pacientes se debe a mecanismos anatómicos ya que la estrecha relación entre los testículos y los conductos Müllerianos persistentes impide el descenso testicular normal (Hutson et al. 1997).

En la evaluación de pacientes con desórdenes de la diferenciación sexual: Al menos dos grupos han encontrado que la medición de MIS sérica es muy útil en el diagnóstico diferencial de pacientes con estados intersexuales y es también un marcador altamente confiable de la presencia o ausencia de tejido testicular cuando se evalúan desórdenes como insensibilidad androgénica, defectos en la esteroidogénesis o anorquia, particularmente en sujetos prepuberales en quienes los niveles normalmente fluctuantes y bajos de T no pueden ser detectados a menos que se realice estimulación con hCG (Lee et al. 1997; Rey, 2003)

**Anomalías de la diferenciación sexual por defectos en la HIM o
en su receptor**

El síndrome de persistencia de los conductos de Müller (SPCM):

Las fallas en la vía de acción de la HIM durante la diferenciación sexual del feto XY originan un tipo muy poco frecuente de pseudohermafroditismo masculino llamado síndrome de persistencia de los conductos de Müller (SPCM) o "varón con útero". Se han descrito aproximadamente 150 casos de la enfermedad, algunos de tipo familiar (Armendares et al. 1973; Beheshti et al. 1994; Sloan y Walsh, 1973; Naguib et al. 1989; Guerrier et al. 1989; Imbeaud et al. 1994). Los pacientes con esta enfermedad de herencia autosómica recesiva presentan genitales externos masculinos normales, aunque consultan generalmente por criptorquidia bilateral y/o hernia inguinal. Durante la corrección quirúrgica de estas anomalías se encuentra inesperadamente la presencia de útero y trompas de Falopio. Los testículos pueden hallarse en posición ovárica, firmemente unidos a los genitales internos femeninos persistentes. En otros casos, una de las gónadas ingresa al canal inguinal arrastrando a la trompa homolateral, al útero y a la trompa y la gónada contralaterales. Esta presentación se conoce como "hernia uterina inguinal" o "ectopia testicular transversa" (Josso et al. 1993; Thompson et al. 1994; Belville et al. 1999)

Los estudios genéticos en estos pacientes han identificado dos posibles causas: por un lado, mutaciones del gen de la HIM resultan en una falta completa de producción de la hormona (Guerrier et al. 1989) que se manifiesta por una inmunohistoquímica negativa (Rey et al. 1996) y valores indetectables de HIM en suero. Este cuadro se denomina SPCM HIM (-) (Josso et al. 1997; Belville et al. 1999) y las mutaciones que lo originan pueden presentarse en cualquiera de los 5 exones del gen de la HIM y explican alrededor de 45% de los casos de PMDS descritos (Imbeaud et al., 1994; Knebelmann et al. 1991; Carré-Eusebe, 1991; Belville et al., 1999). Por otro lado, el cuadro puede resultar de una mutación en el receptor AMHR-II que provoca insensibilidad a la hormona en los órganos blanco (Imbeaud et al. 1995). Estos pacientes, que representan cerca de 40 % de los casos de SPCM, tienen valores séricos normales o elevados de HIM, por lo que se los conoce como SPCM HIM(+). Se han detectado mutaciones en casi todos los exones del gen AMHR-II, pero una delección de 27 pb en el exón 10 está presente en aproximadamente la mitad de los pacientes con SPCM HIM(+) (Imbeaud et al. 1995; Imbeaud et al. 1996; Belville et al. 1999). Todas las mutaciones descritas en la HIM o en el AMHR-II son de tipo inactivante, se transmiten de modo autosómico recesivo y se manifiestan fenotípicamente en el homocigoto o en el doble heterocigoto (heterocigoto compuesto). En contraste, aproximadamente 15% de los casos de SPCM no presentan mutaciones en el gen de la HIM ni en el gen de su

receptor tipo II (Belville et al. 1999). Mutaciones en regiones reguladoras de estos genes, en un receptor tipo I o en otras proteínas de la vía de su transducción, o bien en la enzima responsable del corte de la HIM son posibilidades que explicarían estos casos.

Los modelos murinos knockout para los genes de la HIM o de su receptor tipo II han demostrado, como era de esperarse, persistencia de los conductos de Müller en los fetos masculinos (Behringer et al. 1990; Behringer et al. 1994). Asimismo, observaciones más detalladas permitieron observar una hiperplasia de células de Leydig (Behringer et al. 1994). No existen hasta el momento series de pacientes PSCM con seguimiento suficiente para determinar si presentan un riesgo aumentado de desarrollo de hiperplasia o tumores de células de Leydig.

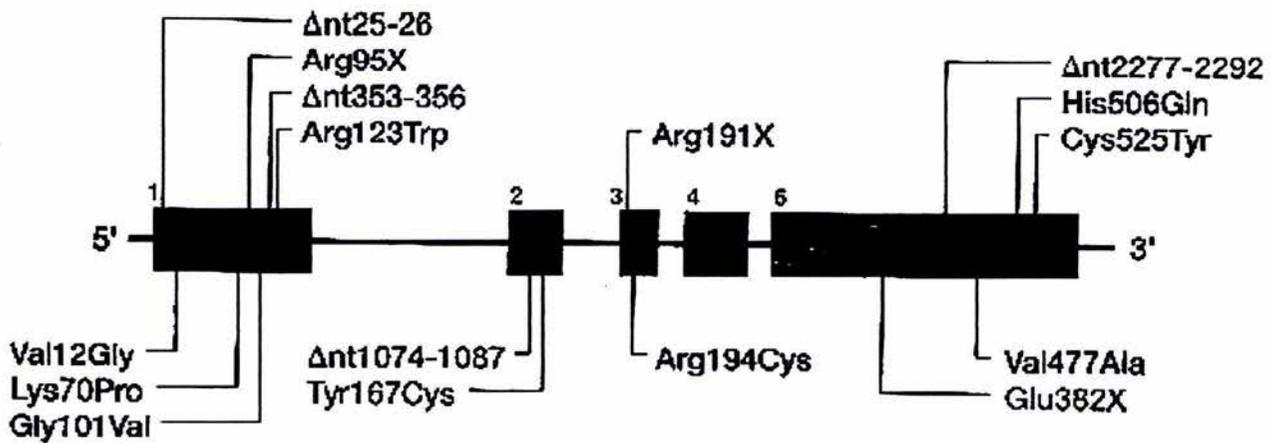


Figura 8.- Diagrama de los 5 exones que constituyen el gen de la HIM indicando la localización de las mutaciones descritas en pacientes con síndrome de persistencia de conductos Mullerianos.



Figura 9.- Diagrama de los 11 exones que constituyen el gen del AMHR-II indicando la localización de las mutaciones descritas en pacientes con síndrome de persistencia de conductos Mullerianos. La delección de 27 nucleótidos en el exón 10 representa casi 50% de todas las mutaciones descritas en este gen.

Anomalías del desarrollo de Mullerianos en el sexo femenino

Síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser: Un fenotipo "en espejo" con respecto a la persistencia de conductos Mullerianos en el varón es la agenesia de útero, trompas y porción superior de vagina en la mujer, entidad conocida como síndrome de Mayer-Rokistansky-Kuster-Hauser o aplasia de Mullerianos (Carson, 1983; Altchek, 1991; Aittomaki et al. 2001). En ciertos casos el grado de regresión de las estructuras Mullerianas es variable y pueden observarse remanentes del útero o de las trompas (Ludwig, 1998) (**figura 10**). La enfermedad es diagnosticada generalmente en la adolescencia cuando las pacientes acuden a consulta por amenorrea primaria. La función ovárica está conservada, por lo que el desarrollo sexual secundario es normal. En la mayoría de las afectadas se encuentra un saco vaginal de 1-2 cm (Sarto y Simpson, 1978; Ludwig, 1998). El desarrollo del vello axilar y púbico es normal, lo que permite realizar el diagnóstico diferencial con el síndrome de insensibilidad completa a la acción de los andrógenos. En un tercio de los casos de la enfermedad pueden presentarse anomalías renales asociadas, tales como agenesia renal, riñón ectópico y malrotación renal (Carson, 1983; Pavanello, 1988), mientras que en 12% de las afectadas se identifican alteraciones esqueléticas, particularmente a nivel

vertebral y costal (Griffin et al., 1976). Los niveles plasmáticos de estradiol y gonadotropinas son normales.

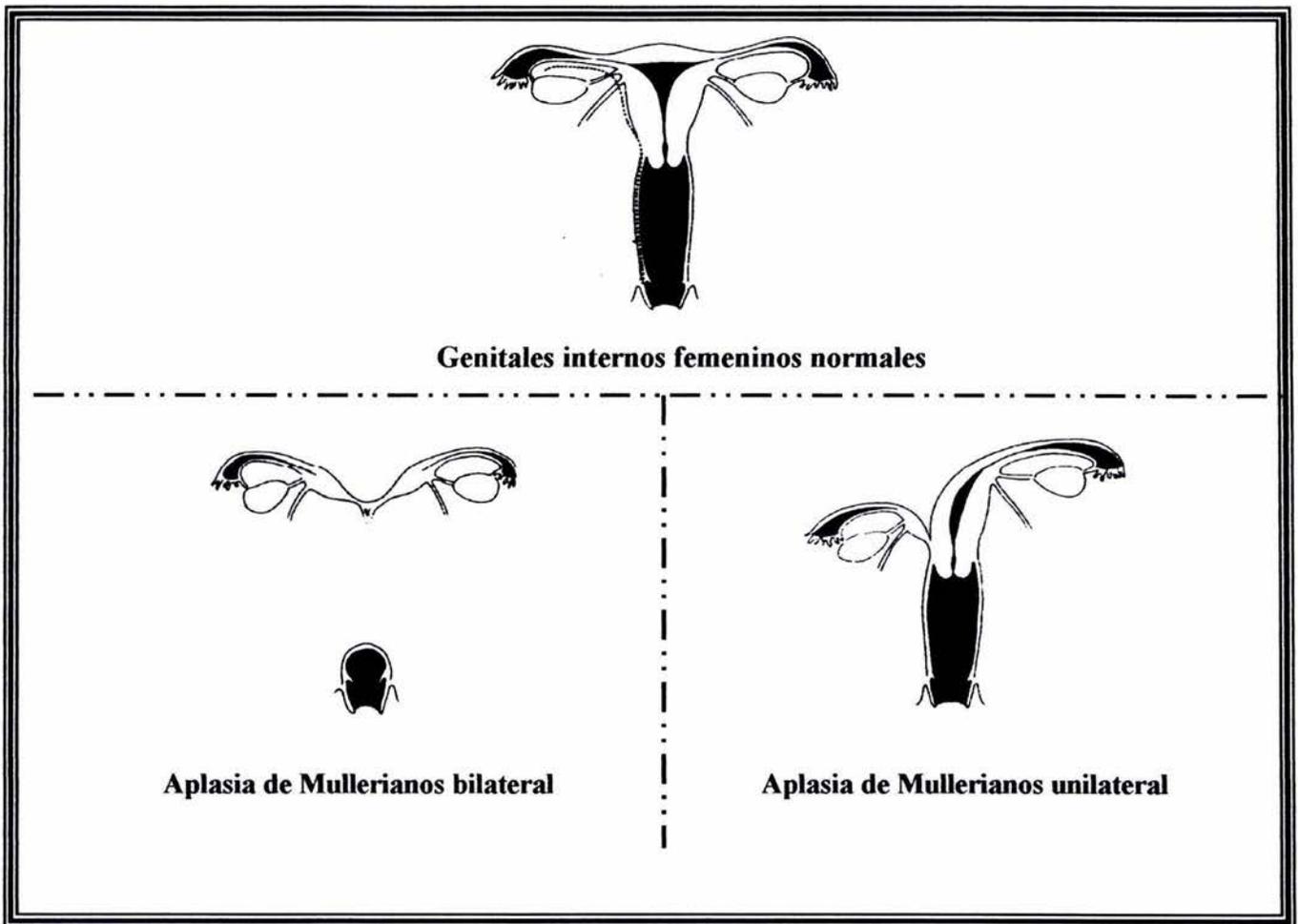


Figura 10.- Esquema de los genitales internos femeninos y de los dos tipos generales de aplasia de Mullerianos: bilateral (izquierda) y unilateral (derecha). (Modificado de Ludwig KS. Arch Gynecol Obstet. 1998)

La enfermedad tiene una frecuencia estimada de 1 en 4,000 a 5,000 recién nacidas vivas (Griffin et al., 1976; Aittomaki et al., 2001), es responsable de 15-20% de los casos de amenorrea primaria (Simpson et al., 1993) y se considera la segunda causa más común de amenorrea primaria, solamente después de la disgenesia gonadal (Reindollar et al. 1981). Aunque la mayoría

de los casos de aplasia de Mullerianos son esporádicos, se han descrito algunos casos familiares que sugieren herencia autosómica dominante o recesiva (Carson, 1983; Jones y Mermut, 1972; Lischke et al., 1973 Shokeir, 1978). Sin embargo, hasta el momento no se han podido detectar defectos moleculares específicos en pacientes con la enfermedad y el análisis minucioso de genes como WT1 (van Lingen et al. 1998a) y PAX2 (van Lingen et al. 1998b), cuya deficiencia en ratones hembras origina ausencia de Mullerianos, no ha sido fructífero. Una hipótesis atractiva postulada recientemente para explicar la etiología de la agenesia de Mullerianos es la presencia de mutaciones activadoras, ya sea en el gen de la HIM o en el gen del receptor de la HIM, que podrían ocasionar que la hormona sea producida durante el desarrollo de un feto 46,XX o que el receptor funcionara como si estuviera unido a la hormona (en ausencia de ésta) promoviendo la involución de los conductos Mullerianos en un producto genéticamente femenino (Lindenman, 1997). Además, aunque el cariotipo en la mayoría de las pacientes es 46,XX, se han descrito algunos casos con translocaciones recíprocas que afectan al brazo largo del cromosoma 12 (Kucheria et al., 1988), región donde se localiza el gen del RHIM-II. Sin embargo, la posibilidad de mutaciones en genes de la HIM o del AMHR-II en pacientes con ausencia congénita de Mullerianos no ha sido investigada hasta el momento.

Por otra parte, en un estudio reciente se encontró una frecuencia elevada de un cambio en la secuencia del gen que codifica la enzima uridil transferasa de galactosa-1-fosfato (GALT), localizado en 9p13, en pacientes con la enfermedad. Este cambio, denominado "mutación N314D", se observó en 6 de 13 (46%) mujeres con agenesia de Müllerianos y en 16 de 113 (14%) mujeres control sanas. Los investigadores concluyeron que esta alteración molecular está asociada a algunos casos de agenesia de Müllerianos (Cramer et al. 1996). Sin embargo, otro grupo no identificó tal asociación (Bhagavath et al. 1998a) por lo que los resultados a este respecto son contradictorios.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se han identificado diversas mutaciones en genes que regulan el desarrollo sexual embrionario que causan numerosas anomalías de la diferenciación sexual en el humano. El fenotipo de algunas de estas anomalías tiene su contraparte o fenotipo "en espejo" que por analogía puede atribuirse a mutaciones en el mismo gen o genes, pero con efecto inverso (p. ej, ganancia de función vs. pérdida de función). La enfermedad denominada síndrome de persistencia de los conductos mullerianos (SPCM) se caracteriza por el desarrollo de útero, trompas de Falopio y porción superior de vagina en individuos genética y fenotípicamente varones. Se ha demostrado que la causa de esta alteración son mutaciones inactivantes en el gen de la HIM o en el gen de su receptor tipo II que impiden el proceso normal de involución Mulleriana durante la embriogénesis. Un fenotipo en espejo del SPCM es el síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (mujeres con aplasia de derivados Mullerianos), trastorno para el que aún no se ha demostrado defectos moleculares específicos. Recientemente se sugirió que algunos casos de esta enfermedad podrían deberse a mutaciones activantes en el gen de la HIM o en el gen de su receptor tipo II que ocasionen el encendido de la vía de regresión Mulleriana en productos femeninos, lo que se manifestaría en la vida post-natal por ausencia de útero, trompas y tercio superior de vagina (aplasia de derivados Mullerianos).

OBJETIVOS

Analizar los genes de la HIM y del AMHR-II en pacientes mexicanas con con síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (agenesia de derivados Mullerianos) para identificar la presencia de mutaciones o polimorfismos génicos asociados a la enfermedad.

Identificar la frecuencia de la mutación N314D en el gen GALT en mujeres mexicanas con síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (agenesia de derivados Mullerianos) y compararla con la frecuencia en un grupo control.

SUJETOS Y METODOS

Sujetos

Previo otorgamiento y firma del consentimiento informado, se incluyeron en el estudio a 15 pacientes post-puberales con diagnóstico de síndrome de agenesia de conductos Mullerianos (síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser) definido por los siguientes criterios: **1.-** Amenorrea primaria; **2.-** Desarrollo sexual secundario normal; **3.-** Cariotipo 46,XX normal (al menos 25 metafases analizadas en cada caso); **4.-** Niveles plasmáticos normales de LH, FSH y estradiol; **5.-** agenesia o hipoplasia severa de derivados Mullerianos documentada por USG, RMN o endoscopia.

Trece pacientes fueron casos esporádicos mientras que las 2 restantes fueron hermanas. En ninguno de los casos se identificó consanguinidad en el árbol genealógico o el antecedente familiar de otras anomalías del desarrollo sexual. Todas las pacientes fueron de origen Mexicano y con por lo menos 3 generaciones de ancestros también originarias del país. En 3 pacientes se demostraron anomalías renales concomitantes: 2 casos con malrotación renal y 1 caso con agenesia renal unilateral; Además, 3 pacientes presentaron escoliosis toracolumbar. En ninguna paciente se reconoció el antecedente de hipoacusia. El grupo control incluyó 25 mujeres mexicanas originarias de diversos estados del país, con historia de fertilidad comprobada, sin antecedentes de defectos congénitos

del tracto urogenital y con por lo menos 3 generaciones de ancestros originarios de nuestro país.

Métodos: En la figura 11 se muestra un esquema general de la metodología que fue utilizada en el presente estudio.

METODOLOGIA GENERAL

Muestra de
sangre periférica

Determinación de concentración
y pureza del DNA

Extracción de DNA
genómico

Amplificación por PCR de los
genes HIM, AMHR-II y exón 10 de GALT

Análisis de electroforesis en gel
de agarosa (1.2%) de los productos
amplificados por PCR

Purificación y cuantificación de los productos
de amplificación

secuenciación automatizada de
DNA (Big Dye Terminator)

Comparación de las secuencias obtenidas (casos/controles)
con las publicadas en el *GenBank*

Figura 11.- Esquema de la metodología utilizada para el estudio de los genes HIM, AMRH-II y GALT.

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE SANGRE PERIFÉRICA

Después de obtener el consentimiento informado de las pacientes y de los sujetos controles se extrajeron por punción venosa 3 ml de sangre periférica en cada uno de los individuos. Una vez obtenida la muestra se procedió a extraer el DNA genómico a partir de los leucocitos utilizando el reactivo DNAzol BD (GIBCO). Se transfirieron 500 μ l de sangre total a un microtubo eppendorf de 2 ml, se mezcló con 1ml del reactivo DNAzol BD y se agitó la preparación durante 30 segundos. Inmediatamente se agregaron 400 μ l de alcohol isopropílico y nuevamente se agitó la mezcla, esta vez por 1 minuto. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y después se centrifugó a 6000 rpm por 6 minutos y se decantó el sobrenadante con cuidado; el botón residual en el tubo fue lavado añadiendo 500 μ l de DNAzol BD y se agitó el tubo hasta disolver el botón. Se centrifugó la muestra a 6000 rpm, esta vez por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 ml de etanol al 75%, agitando el tubo hasta disolver el botón y homogeneizar. La muestra fue centrifugada de nuevo a 6000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se retiró el exceso de alcohol con pipeta. Se procedió a añadir 200 μ l de hidróxido de sodio (NaOH) 8mM y se incubó el botón por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el DNA disuelto en el NaOH se transfirió a tubos eppendorf limpios de 0.5 ml.

ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE DNA

En todas las muestras obtenidas se llevó a cabo un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm. La concentración de DNA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$[\text{DNA}], (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260})(\text{dilución}^{-1})(0.05\mu\text{g}/\mu\text{l})$, en donde $0.05\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA = 1 D.O₂₆₀

La relación 260/280 indica la pureza del DNA obtenido. Se consideraron que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O₂₆₀ son las óptimas. Para determinar la calidad de cada una de las muestras de DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio al 0.0002% (Sambrook, 1989).

AMPLIFICACION POR PCR DE LOS 5 EXONES DEL GEN DE LA HIM Y DE LOS 11 EXONES DEL GEN DEL AMHR-II.

En todos los pacientes se realizó amplificación por PCR de los 5 exones del gen HIM y de los 11 exones del gen AMHR-II. En todos los casos, las uniones exón/intrón fueron también incluidas en los productos de amplificación. Se utilizaron 16 pares de oligonucleótidos específicos que se adquirieron en una casa comercial (Accesolab) y cuya secuencia se muestra a continuación. Cada uno de los oligonucleótidos fue llevado a una concentración de 100 μM .

Oligonucleótidos

Para la amplificación de los 5 exones del gen de la HIM se usaron los siguientes oligonucleótidos:

1S.- 5' CTT AAG GCA GGC AGC CCA GC -3'
 1A.- 5' TCC TAG GAA CAA GAC CAC AGC CT -3'
 2S.- 5' TCC CCT GCA CAG TGG CCA GAG C -3'
 3S.- 5' TAC CTG GTG TTA GCG GTG GAC CG -3'
 3A.- 5' AGC CGG CCA GCG CGT CCG GAT CCA G -3'
 4S.- 5' ACC CCT TCC TGG AGA CGC TCA CG -3'
 4A/7A.- 5' CCC TGC AGC GCC TTC AGG AGC AGC A -3'
 5A.-5'- GCT TGG GGT CCG AAT AAA TAT 3'
 7A.- 5'- TCC GAG CCC GCG CCG CTG CCT GCG CAC -3'

Para la amplificación de los 11 exones del gen del receptor de la HIM se usaron los siguientes oligonucleótidos:

1S.- 5'- AGG TCA GGG AAG GGC AAA GA -3'
 1A.- 5'- GTG GGA AGT AAT GCC CAA AG -3'
 2S.- 5'- TCT GCT GCT GCC ATC CTC CA -3'
 2A.- 5'-GCA GAT GGC TGT AAT TGG CAT -3'
 3S.- 5'- GAT TTA CCC TCT GTT TCC ACA -3'
 3A.- 5'- GGA ATC AGG CTA TAG AGA TC -3'
 4S.- 5'- GTA CTA ATC CAC CCC ATC CCT -3'
 4A.- 5'- CAT GAC CTC CTT CCC GGA TTA -3'
 5S.- 5'- GAA GGG CTC CTC TGG GCA CTC -3'
 5A.- 5' AGT CCT GGG ATT ACA GGT GTG -3'
 6S.- 5'- GGA TCA GCC GTC TCC AGC TT -3'
 6A.- 5'- CAA ACT AAG GCA GAA TCA CA -3'
 7S.- 5'- GGA GGA AGA AAA TCC ATG TT -3'
 7A.- 5'- GCA ATG GTC CAT GCA ATA TC -3'
 8S.- 5'- TGT CAA CAG TTG TAG CAA TA -3'

8A.- 5' - GTG CCT ACC ATG TAG AAA GG -3'
9S.- 5' - CAA CCT GAC CTG GCC TGA GA -3'
9A.- 5' - TTC CAG CTG AGC ATG AAC CA -3'
10S.- 5' - CAC TCA AGA TCC TAG GGT CA -3'
10A.- 5' - ATC GCC ATA TTT ATG TTG GC -3'

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Gen de la HIM y del AMHR-II

Por medio de la técnica de PCR (Sambrook, 1989) se amplificaron los 5 exones del gen de la HIM y los 11 del gen del receptor AMHR-II. En todos los casos se preparó una reacción estándar a un volumen final de 50 µl y que contenía: 0.5-1.0 µg de DNA, amortiguador de amplificación 10X (Tris-HCl/KCl/) a una concentración final de 1X, Mg₂Cl entre 3.35 y 6.7 mM, mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) a una concentración final de 20 µM, los oligonucleótidos a concentraciones finales de 80 pmol, 2 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer) y agua bidestilada estéril. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). El programa de temperaturas usado incluyó un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (95°C por 45 segundos), alineamiento (60°C por 45 segundos) y extensión (72°C por 75 segundos), seguidos de un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de cada reacción de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio al 0.0002%. En todos los casos se incluyó un marcador de

peso molecular para comparar el tamaño de los productos amplificados.

GEN GALT

La amplificación por PCR de un fragmento correspondiente al exón 10 del gen GALT (que incluye el codón polimórfico 314), se realizó utilizando el siguiente par de oligonucleótidos:

GALT-F 5'-AGG TGC TAA CCT GGA TAA-3'

GALT-R 5'-CAC ATA CTG CAT GTG AGA-3'.

La reacción de PCR para amplificar este exón incluyó: buffer PCR 1x, 80 pmol de cada oligonucleótido, 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM de cada dNTP, 2 U Taq DNA polimerasa y 500 ng de DNA en un volumen final de 50 µl. El programa de temperaturas incluyó 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos.

Los productos de cada reacción de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio al 0.0002%. En todos los casos se incluyó un marcador de peso molecular para comparar el tamaño de los productos amplificados.

Purificación de los Productos de PCR

Para llevar a cabo la purificación de los productos de PCR se utilizó el kit QIAEXII (Qiagene), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se recortó la banda del gel de agarosa y se disolvió con un Buffer (QXI) a una temperatura de 50°C y en presencia de una resina que se une al DNA. Posteriormente, el botón

se lavó de 2-3 veces con una solución de alcoholes y finalmente el producto de PCR purificado se resuspendió en 20 μ l de agua bidestilada estéril.

CUANTIFICACIÓN DEL DNA PURIFICADO

La cuantificación del producto de PCR purificado (templado) se realizó mediante comparación con un estándar (DNA Low Mass Ladder, Gibco) en un gel de agarosa al 1.5%. Se mezclaron 4 μ l del producto de PCR purificado con 1 μ l de colorante y se colocó en cada pozo del gel para llevar a cabo la electroforesis. La estimación de la concentración de DNA en cada muestra se realizó por comparación de la intensidad de las bandas de los productos purificados con el estándar mencionado.

SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Cada templado correspondiente a exones individuales de los genes HIM y AMHR-II se sometió a una nueva reacción de PCR en la que se utilizó el kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems) que contiene dideoxinucleótidos marcados por fluorescencia (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl₂ y ampliTaQ polimerasa. Para este proceso se preparó una reacción de 20 μ l que contenía ~20 ng del DNA purificado de cada exón, 4 μ l del kit Big Dye Terminator, 1 μ l del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 μ M y agua bidestilada para un volumen final de 20 μ l. Esta mezcla se sometió a un programa de termociclaje que incluyó :

25 ciclos de: desnaturalización a 97 °C por 30 segundos

alineamiento a 50 °C por 15 segundos

extensión a 60 °C por 4 minutos

Después de esta reacción de PCR se llevó a cabo la purificación de los productos de extensión con el fin de eliminar el exceso de ddNTPs marcados por fluorescencia. Este procedimiento fue realizado con columnas Centri Sep (Applied Biosystems) hidratadas por un período mínimo de 2 horas con 800 µl de agua destilada. Las columnas fueron centrifugadas después por 3 minutos a 3000 rpm para eliminar el exceso de agua. A continuación las columnas fueron colocadas en tubos de 500 µl y sobre el centro de la columna se añadieron los 20 µl del producto de PCR de secuencia. Las columnas fueron colocadas en un tubo receptor y centrifugadas por 3 minutos a 3000 rpm. Finalmente, las muestras que se obtuvieron en cada tubo receptor fueron desecadas en una centrífuga de vacío. Posteriormente, cada muestra fue resuspendida en 25 µl de amortiguador de carga TSR (*Template supression reagent*, Applied Biosystems) y se procedió a desnaturalizar las muestras a 95°C por 5 minutos en un termociclador. Finalmente, las muestras se colocaron en un secuenciador automatizado *Genetic Analyzer 310* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del equipo. Las secuencias obtenidas de los 5 exones del gen de la HIM, de los 11 exones del gen del AMHR-II y del exón 10 del gen GALT en los pacientes fueron comparadas con las secuencias normales publicadas en la base de datos GeneBank (secuencias No. **A18521**; **U29700**; y **L46712**, respectivamente)

RESULTADOS

En todos los sujetos estudiados, el análisis espectrofotométrico del DNA obtenido indicó que la concentración y la calidad de las muestras fueron satisfactorias. En los 6 sujetos se observó la amplificación normal de los 16 exones del gen p63. El tamaño de los productos de PCR obtenidos coincidió con lo esperado al compararlos con los marcadores estándar de peso molecular. Estos hallazgos descartaron la presencia de rearrreglos importantes en la secuencia codificante del gen, como deleciones totales o parciales ó inserciones (**figuras 12 y 13**).

La purificación de cada uno de los productos de PCR a partir del gel de agarosa fue adecuada en todos los casos ya que se obtuvieron templados con concentraciones de entre 5 y 10 ng de DNA por μl .

Después de realizar la secuenciación nucleotídica automatizada de todos los exones y de las uniones exón/intrón de los genes de la HIM y del AMHR2 se detectaron 5 cambios de bases con respecto a las secuencias de la base de datos GenBank (**figuras 14-17 y Tablas 1 y 2**).

Tres de estas variantes de secuencia fueron identificadas en el exón 5 del gen HIM: una transición C a T en el nucleótido 1986 que originó el cambio de arginina hacia cisteína en el residuo 312; una transversión C a G en la base 2108 que cambia la prolina del residuo 386 a alanina; y una transición A a G en la posición nucleotídica 2778, que no altera el ácido glutámico en la posición 542 de la proteína HIM.

En el gen del AMHR11 se identificaron dos cambios en el intrón 6: una transición C a T en la posición nucleotídica 2115 y una transversión A a C en la posición -3 con respecto al sitio aceptor del "splicing" (corte y empalme).

Como se muestra en las tablas 3 y 4 la frecuencia de los cambios nucleotídicos entre el grupo de pacientes y el grupo control fue muy similar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de estos cambios entre ambos grupos al compararse con la prueba exacta de Fisher. Estos resultados permitieron concluir que los cambios detectados corresponden a polimorfismos génicos sin relación aparente al estado de enfermedad o de control sano.

Por otro lado, de los 30 alelos de pacientes estudiados, en 29 (97%) se observó el codón 314 silvestre (AAC) en el exón 10 del gen GALT mientras que en el alelo restante se documentó el codón polimórfico (GAC) (**figura 18**). El triplete polimórfico (que codifica para la variante N314D) no fue observado en ninguno de los 50 alelos de individuos controles.

RESULTADOS

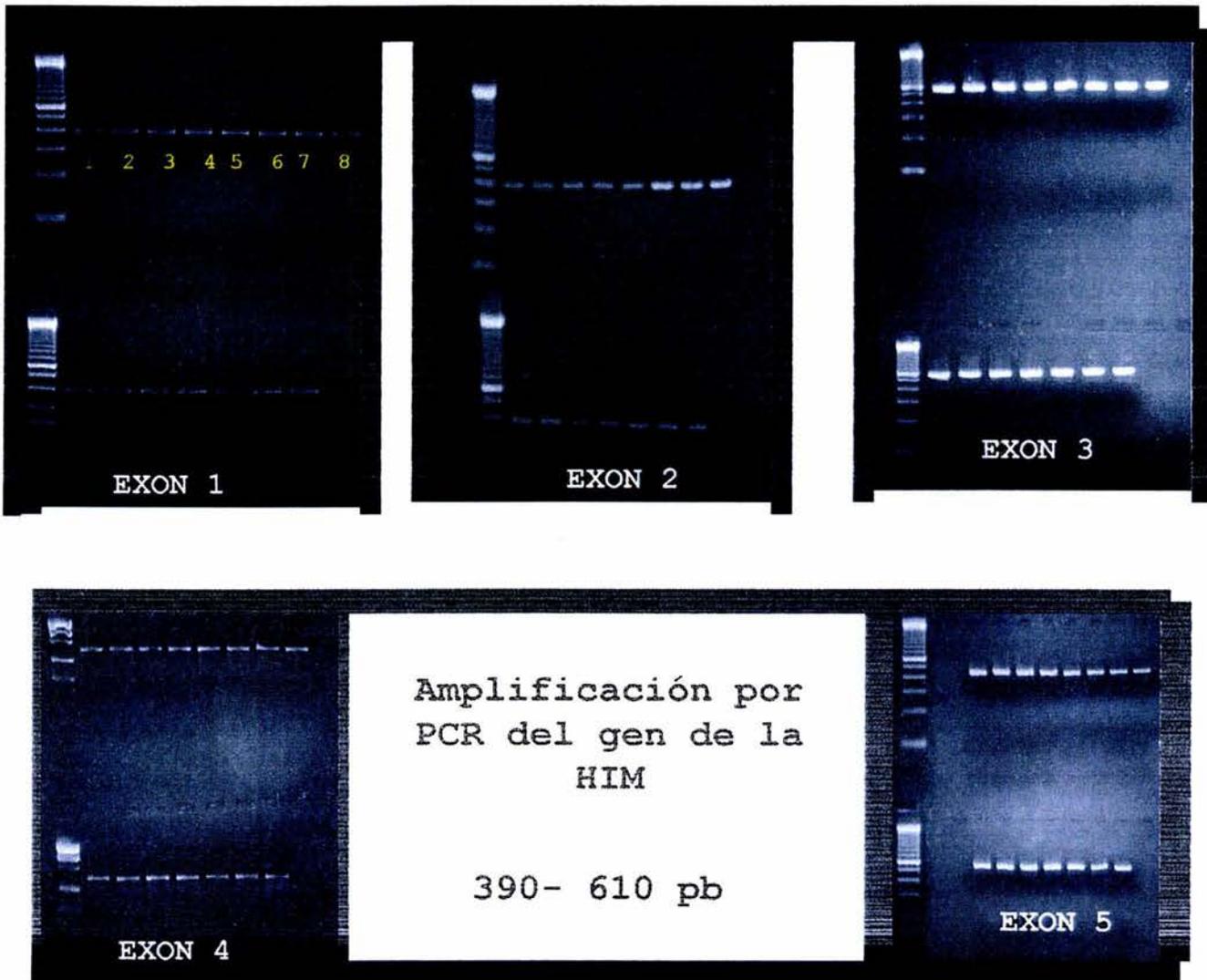


Figura 12.- Análisis por PCR de los 5 exones del gen HIM en los 15 pacientes (1-15). En todos los casos, los tamaños de los productos amplificados coincidieron con los esperados (390-610 pb).

RESULTADOS

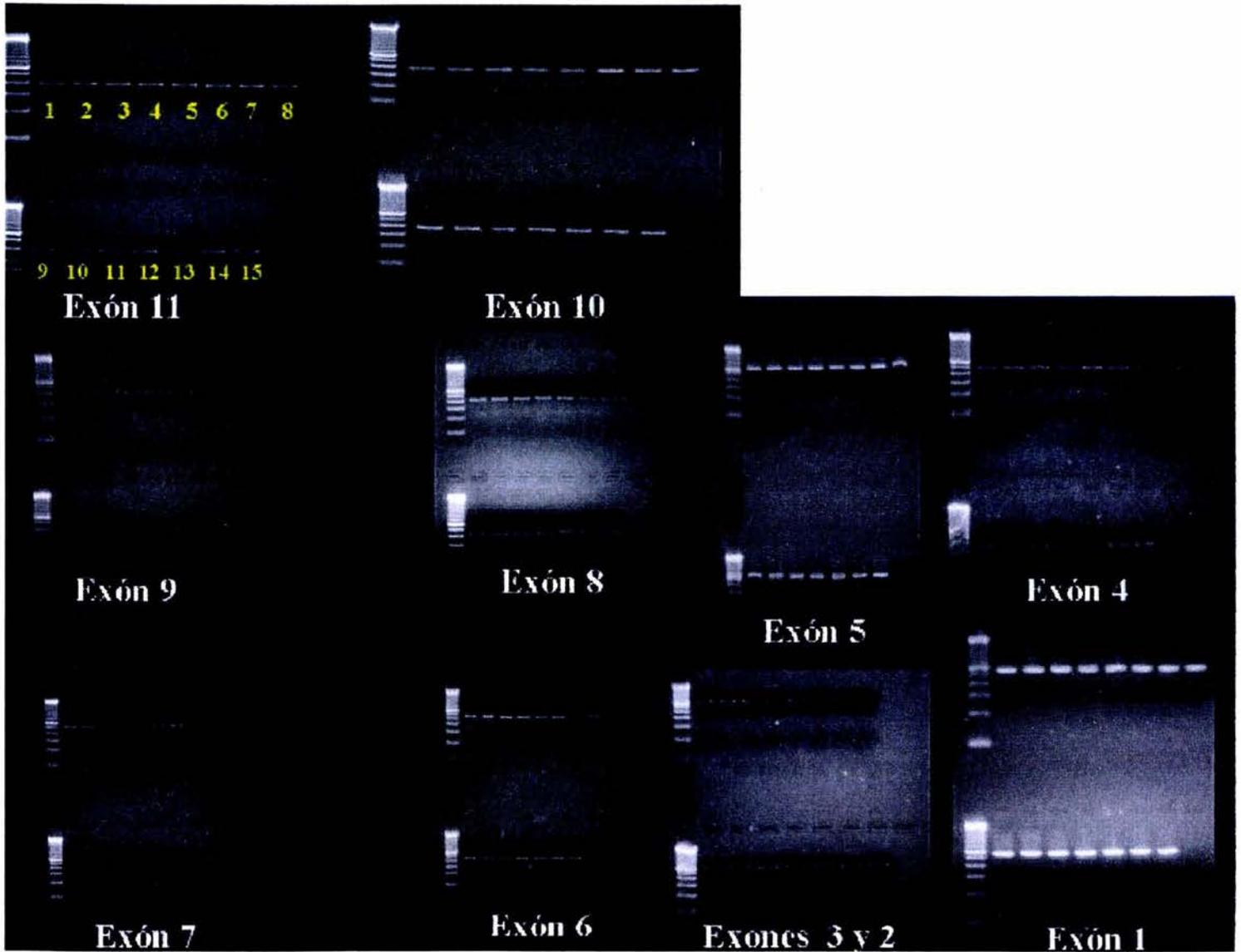


Figura 13.- Análisis por PCR de los 11 exones del gen AMHR-II en los 15 pacientes (1-15). En todos los casos los tamaños de los productos amplificados coincidieron con los esperados (300-550 pb)

RESULTADOS

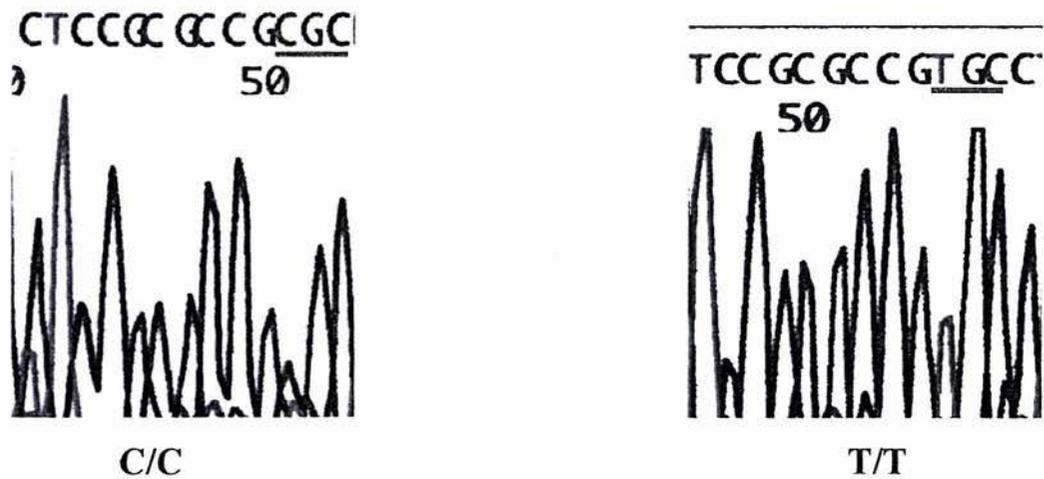


Figura 14.- Secuenciación nucleotídica parcial del exón 5 del gen HIM que muestra el polimorfismo C--T identificado en la base 1876 y que origina una mutación de sentido equivocado de arginina (CGC) a cisteína (TGC) en la posición 312. El codón polimórfico está subrayado en ambas secuencias.

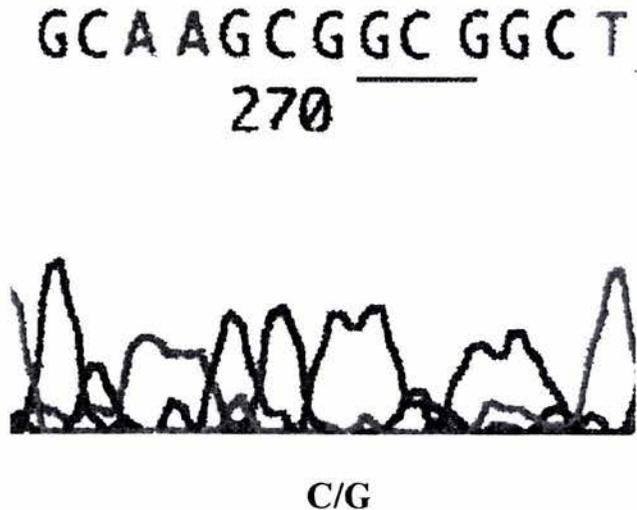


Figura 15.- Secuenciación nucleotídica parcial del exón 5 del gen de la HIM que muestra el polimorfismo C-G identificado en la base 2098 y que origina una mutación de sentido equivocado de prolina (CCG) a alanina (GCG). El codón polimórfico está subrayado.

RESULTADOS

CACCTTTATACATA
90 100

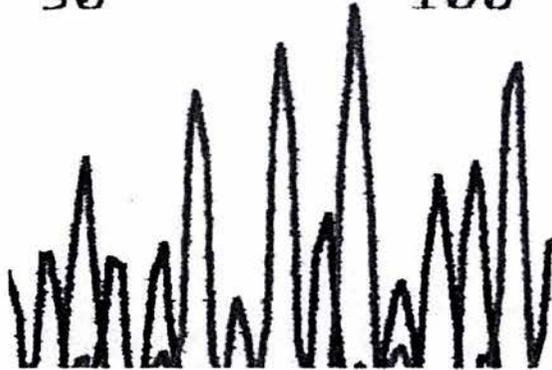


Figura 16.- Secuencia parcial del intrón 6 del gen AMHR-II que muestra el polimorfismo C-T identificado en la base número 2115. La base polimórfica está subrayada.

TTCCCCAGGGCTCCCTGT

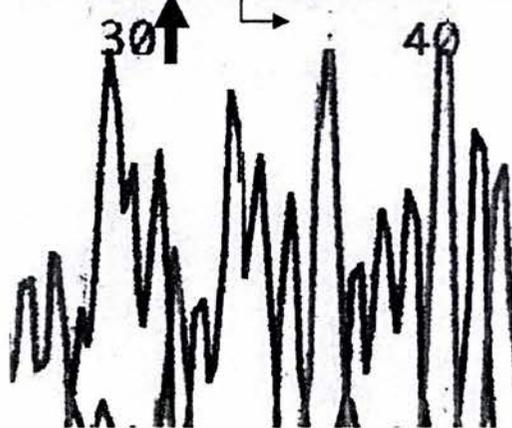


Figura 17.- Secuencia parcial del intrón 6 del gen AMHR-II que muestra el polimorfismo A-C identificado en la base número 5037. La base polimórfica está señalada con una flecha gruesa. La flecha delgada indica el inicio del exón 7.

TABLA 1
POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA HIM (A,B,C)

Cambio de base	Posición	Cambio de codón	Cambio de aminoacido	Residuo
A) 1876C>T	Exon 5	CGC → TGC	Arginina a Cisteina	312
B) 2098C>G	Exon 5	CCG → GCG	Prolina a Alanina	386
C) 2568A>G	Exon 5	GAA → GAG	Acido Glutámico (silente)	542

Tabla 1.- Descripción de los polimorfismos en el gen de la HIM identificados en este estudio. Los nucleótidos se numeran a partir del codón ATG inicial del gen (número de acceso de Genbank A18521).

TABLA 2
POLIMORFISMOS DEL GEN AMHR-II (A,B)

Cambio de Base	Posición	Cambio de codón	Cambio de aminoacido	Residuo
A) 2115C>T	Intron 6	-----	-----	-----
B) 5037A>C	Intron 6	-3 del sitio aceptor de splicing		

Tabla 2.- Descripción de los polimorfismos en el gen del AMHR-II identificados en este estudio. Los nucleótidos se numeran a partir del codón ATG inicial del gen (número de acceso de Genbank U29700).

TABLA 3
FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS
EN EL GEN DE LA HIM

Alelo	Cromosomas de pacientes	Cromosomas de controles
A	20/30 (67%)	34/50 (68%)
W	10/30 (33%)	16/50 (32%)
B	30/30 (100%)	50/50 (100%)
W	0/30 (0%)	0/50 (0%)
C	28/30 (93%)	47/50 (94%)
W	2/30 (7%)	3/50 (6%)

Tabla 3.- Frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen de la HIM en las pacientes con síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser y en sujetos control. A, B y C corresponden a los polimorfismos descritos en la Tabla 1; W: alelos silvestres.

TABLA 4
FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS EN
EL GEN DEL AMRH-II

Alelo	Cromosomas de pacientes	Cromosomas de controles
A	28/30 (93%)	41/50 (82%)
W	2/30 (7%)	9/50 (18%)
B	14/30 (47%)	23/50 (46%)
W	16/30 (53%)	27/50 (54%)

Tabla 4.- Frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen del AMRH-II en las pacientes con síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser y en sujetos control. A y B corresponden a los polimorfismos descritos en la Tabla 2; W: alelos silvestres.

MUTACIÓN N314D GALT

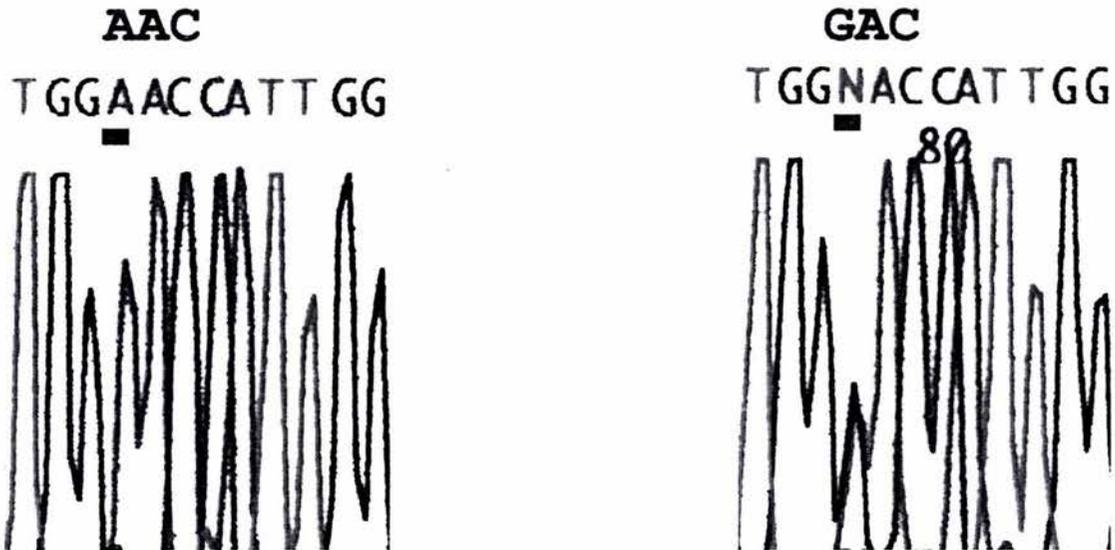


Figura 18.- Secuencia nucleotídica parcial del exón 10 del gen GALT en la que se muestra un cambio heterocigoto A--G (derecha). Este polimorfismo, que origina cambio del codón AAC a uno GAC (N314D), se detectó solamente en 1 alelo de 30 de sujetos con la enfermedad. El nucleótido polimórfico se muestra subrayado.

DISCUSION

Una fase crítica de la diferenciación sexual en los humanos es el establecimiento y diferenciación del tracto genital interno. Durante el desarrollo embrionario en mujeres, los conductos Mullerianos o paramesonéfricos se diferencian en útero, las trompas de Falopio y el tercio superior de la vagina. Sin embargo, en ciertas ocasiones, individuos genética y fenotípicamente femeninos no desarrollan estas estructuras originándose el síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (SMRKH) o aplasia de Mullerianos (Ludwig, 1998). Este síndrome es considerado en frecuencia la segunda causa de amenorrea primaria (después de la disgenesia gonadal) y aunque la mayoría de los casos ocurren de manera esporádica, la observación de varias afectadas en una misma familia y de pacientes con rearrreglos cromosómicos ha sugerido una posible etiología genética (Lindenman et al. 1997). Motivado por fenotipos de defectos en el desarrollo de Mullerianos en ratones mutantes, en los últimos años se ha realizado el análisis de genes candidatos como WT1 y PAX2 sin resultados positivos en humanos con aplasia de derivados Mullerianos (van Lingén et al. 1998a; 1998b). Recientemente se sugirió que algunos casos de esta enfermedad podrían deberse a mutaciones activantes en el gen de la HIM o en el gen de su receptor tipo II que ocasionarían el encendido de la vía de regresión Mulleriana en productos femeninos y manifestándose post natalmente por ausencia de útero, trompas y

tercio superior de vagina (aplasia de derivados Mullerianos) (Lindenman et al. 1997).

Esta posibilidad fue investigada en el presente trabajo en un grupo de 15 pacientes Mexicanas con SMRKH, 13 de ocurrencia esporádica y 2 hermanas. El diagnóstico de SMRKH fue comprobado en todas la pacientes por estudios de imagen y en algunos casos por endoscopía. Los hallazgos concomitantes a la enfermedad descritos en la literatura, tambien fueron observados en nuestras pacientes al detectarse en 3 casos alteraciones renales y 3 pacientes con anomalías vertebrales. La hipoacusia, que es un hallazgo reportado con frecuencia en mujeres con aplasia de Mullerianos, no fue documentada en ninguno de nuestros casos.

La amplificación normal por PCR de los 5 exones del gen del AMHR-II y de los 5 exones del gen de HIM en las 15 pacientes descartó la posibilidad de rearrreglos intragénicos como deleciones o inserciones importantes. La secuenciación nucleotídica de la totalidad de los exones y de las uniones exón/intrón en ambos genes permitió demostrar la presencia de 5 variantes de secuencia tanto en el grupo de enfermas como en el grupo control. Tres de estas variantes se observaron en el exón 5 del gen de HIM mientras que las dos restantes se localizaron en el intrón 6 del gen AMHR-II. Sin embargo el análisis de las frecuencias observadas para cada polimorfismo descartó asociación de alguno(s) de ellos con el estado de enfermedad. Ninguno de estos polimorfismos había sido descrito en estudios previos de los genes HIM y AMHR-II y sus frecuencias indican que son polimorfismos comunes en población mexicana; incluso, la frecuencia de algunos de ellos es mayor que

la frecuencia del alelo silvestre. Estos resultados permiten afirmar que el exón 5 del gen HIM es polimórfico en población mexicana aunque estas variantes parecerían no tener efecto en la función de la hormona ya que el grupo control presentó frecuencias similares.

Un aspecto interesante de este estudio fue la identificación del polimorfismo 5037 A-C en la posición -3 del sitio aceptor de corte y empalme del intrón 6 en el gen AMHR-II. A pesar de que el dinucleótido invariable AG está respetado, se han descrito algunos casos en que la sustitución de la base -3 del sitio aceptor ocasiona una alteración del proceso de splicing e inestabilidad del RNAm (Teng et al. 2001). Sin embargo, nuevamente, la observación de que este polimorfismo se presentó con frecuencias similares en ambos grupos de estudio descarta la posibilidad de que tenga algún efecto en el RNAm o en la proteína madura del receptor de HIM.

Poco después del inicio de esta investigación se publicó un estudio de en el que se analizó un grupo de 22 pacientes con SMRKH para identificar posibles defectos moleculares en los genes HIM o AMHR-II. La metodología utilizada se basó en el uso de RMFPs (*Restriction Melting Fragment Polymorphisms*) en electroforesis en gel de gradiente desnaturizante. Esta técnica se fundamenta en el corte por enzimas de restricción del DNA de interés y la observación de su patrón de migración en geles de poliacrilamida en los que diferencias en la secuencia entre los fragmentos de los pacientes y de individuos control se detectarían como patrones distintos de migración. Después de realizar el análisis, estos

investigadores no identificaron mutaciones en la región codificante de ninguno de los dos genes (Resendes et al. 2001). Estos resultados, sumados a los que se obtuvieron en nuestro estudio, permiten afirmar que defectos moleculares en el gen de HIM o en el de AMHR-II no son una causa común de SMRKH. Es interesante que en el estudio mencionado no se detectaran los cambios polimórficos descritos en nuestra investigación. Será necesaria la descripción de otras poblaciones para determinar si tales variantes son exclusivas de población mexicana.

Aunque podría postularse que mutaciones activantes en regiones regulatorias o intrónicas del gen de la HIM o del AMHR-II, que no fueron analizadas en este estudio, pueden ocasionar el SMRKH, algunos datos experimentales no apoyan esta hipótesis. En primer lugar, los ratones transgénicos que sobreexpresan HIM carecen de todos los derivados Mullerianos, incluyendo trompas de Falopio (Behringer et al. 1990) mientras que hasta 85% de pacientes con SMRKH presentan trompas de Falopio normales (Stelling et al. 1997; Ludwig 1998); en segundo lugar, la expresión crónica de HIM en hembras ocasiona detención de la meiosis y pérdida acelerada de oocitos (Behringer et al. 1990), mientras que las pacientes con aplasia de Mullerianos presentan una función ovulatoria normal.

Por otra parte, la variante N314D del gen GALT había mostrado asociación positiva con la ocurrencia de SMRKH en un estudio previo ya que se identificó en 6 de 13 (46%) mujeres con agenesia de Müllerianos y en 16 de 113 (14%) mujeres control sanas. En este estudio la variante fue identificada por análisis con enzimas de

restricción y secuenciación de DNA y los investigadores concluyeron que la variante N314D de GALT se asocia a algunos casos de agenesia de Müllerianos (Cramer et al. 1996). (Cramer et al. 1996) pero falta de asociación en otros (Bhagavath et al. 1998a), por lo que su participación en la etiología de la enfermedad aún es sujeto de debate. En nuestra investigación se encontró un solo alelo N314D de 30 alelos de pacientes; de los 50 alelos de sujetos controles ninguno correspondió a tal variante. De esta manera, podemos afirmar que la variante N314D es prácticamente inexistente en sujetos mexicanos con aplasia de Mullerianos, lo que descarta su asociación, al menos en esta muestra, con la enfermedad. La variante N314D se reconoció hace algunos años como causante, en el estado homocigoto, de un tipo de galactosemia conocida como variante Duarte (Kelley et al. 1983). En las crías hembra de ratones con niveles elevados de galactosa durante la gestación se han observado defectos en el desarrollo de las estructuras Mullerianas. Sin embargo, el hecho de que las mujeres con galactosemia no presenten una frecuencia mayor de alteraciones del tracto genital interno, hace difícil apoyar una responsabilidad de la galactosa o de las variantes moleculares que intervienen en su metabolismo en el SMRKH.

Aunque los datos disponibles indican que la HIM o el AMHR-II no están asociados al SMRKH es coherente especular acerca de defectos en otros componentes de la vía de acción de HIM como alguno de sus receptores tipo I o en proteínas efectoras intracelulares. También es probable que los defectos en la formación y/o diferenciación de las estructuras derivadas de los

conductos Mullerianos estén relacionados con distintos morfógenos que actúan antes que la HIM durante la embriogénesis. El uso de ratones transgénicos ha permitido demostrar que deficiencias en factores morfogenéticos embrionarios como *Emx2* (Miyamoto et al. 1997) y *Pax-2* (Torres et al. 1995) provocan malformaciones de los conductos de Muller en embriones de ambos sexos.

Por otra parte, en años recientes se ha hecho evidente la participación de los genes *Wnt* en el desarrollo normal del tracto genital interno femenino (Kitajewski et al. 2000). Los genes *Wnt* codifican una familia de factores de crecimiento secretados ricos en cisteína que median la comunicación célula-célula en diversos procesos de desarrollo tales como proliferación, morfología, motilidad y muerte celular a través de mecanismos de señalización conservados evolutivamente. Experimentos con modelos murinos han indicado que al menos *Wnt4*, *Wnt-5a*, and *Wnt-7a* son expresados en patrones mesenquimatosos-epiteliales específicos en el útero y la vagina (Miller et al. 1998; Heikkila et al. 2001). Los ratones deficientes para estos genes exhiben un espectro amplio de anomalías Mullerianas que incluyen aplasia, hipoplasia y alteraciones de la citoarquitectura (Heikkilä et al. 2001). Al igual que *Pax-2* y *Emx2*, *Wnt-4* es esencial en la morfogénesis inicial de los conductos de Müller: ratones hembra *knockout* para *Wnt-4* carecen de útero y trompas (Vainio et al. 1999). En la región de los conductos genitales internos en desarrollo, la expresión de *Wnt4* está ausente del epitelio y mesénquima del conducto Wolffiano, pero es abundante en las células mesenquimatosas del conducto Mulleriano (Vainio et al. 1999).

Wnt-7a también interviene en el desarrollo de los conductos de Müller, pero más tardíamente en el desarrollo y su ausencia provoca malformaciones uterinas menores (Parr y MacMahon, 1998). Otros genes que han sido identificados recientemente como indispensables en la formación del tracto genital interno femenino en el ratón son *HoxA13* (Warot et al. 1997) y *Lim1* (Kobayashi et al. en prensa), que codifican factores de transcripción con un homeodominio y *Ltap*, que codifica una proteína transmembranal con homología a moléculas de segmentación corporal de *Drosophila* (Kibar et al. 2001). Mutaciones en algunos de estos genes podrían explicar ciertos casos de aplasia de derivados Mullerianos en el humano por lo que es conveniente continuar la caracterización molecular de este grupo de pacientes analizando algunos de los genes mencionados.

Sin embargo, el escenario más probable es que en la mayoría de los casos la aplasia de Mullerianos sea una entidad que puede ser originada por fallas a diversos niveles durante la formación y diferenciación de los conductos Mullerianos o bien que se trate de un padecimiento multifactorial en el que la combinación específica de ciertos factores genéticos y ambientales ocasione el defecto anatómico. Como ha sido descrito para anomalías en otras estructuras del cuerpo, el compromiso del flujo sanguíneo durante la organogénesis podría también ser responsable de algunos casos de la enfermedad. Sin embargo, los casos de recurrencia familiar (aún cuando no se han identificado patrones mendelianos de transmisión hereditaria) sugieren fuertemente la participación de factores genéticos, en estas familias.

En suma, nuestros resultados permiten descartar una participación de los genes HIM y AMHR-II en la etiología del SMRKH en pacientes Mexicanas, contribuyen a la caracterización de variantes genéticas de estos dos genes y establecen las bases para futuros estudios funcionales que permitan identificar si ciertas anomalías en la vía de transducción de la HIM están relacionadas con algunos casos de aplasia de Mullerianos en el humano.

REFERENCIAS

1. Aittomaki K, Eroila H, Kajanoja P. A population-based study of the incidence of müllerian aplasia in Finland. *Fertil Steril.* 76:624-625, 2001.
2. Alarid ET, Cunha GR, Young P, Nicoll CS. Evidence for an organ- and sex-specific role in basic fibroblast growth factor in the development of the fetal mammalian reproductive tract. *Endocrinology.* 129:2148-2154, 1991.
3. Allard S, Adin P, Gouedard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC, Picard JY, Xavier F. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of β -catenin. *Development.* 127:3349-3360, 2000.
4. Altchek A. Congenital absence of the uterus and vagina. En: *The Uterus. Pathology, diagnosis, and management.* Springer Verlag, Nueva York, . pp 271-293, 1991.
5. Anderson TR, Copeland TK, Scholer H, Heasman J, Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev.* 91:61-68, 2000
6. Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell.* 99:409-419, 1999.
7. Armendares S, Buentello L, Frenk S. Two male sibs with uterus and fallopian tubes: a rare probably inherited disorder. *Clin Genet.* 4:291-296, 1973.
8. Baarends WM, Uilenbroek JTJ, Kramer P, et al. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 136:4951-4962, 1995.
9. Baarends WM, van Helmond MJL, Post M, et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the Müllerian duct. *Development.* 120:189-197, 1994.
10. Bedell MA, Brannan, CI, Evans EP, Copeland NG, Jenkins NA, Donovan PJ. DNA rearrangements located over 100 kb 5' the *Steel (Sl)*-coding region in *Steel-panda* and *Steel-contrasted* mice deregulate *Sl* expression and cause female sterility by disrupting ovarian follicle development. *Genes Dev.* 9:455-470, 1995.

11. Beheshti M, Churchill BM, Hardy BE, Bailey JD, Weksberg R, Rogan GF. Familial persistent müllerian duct syndrome. *J Urol.* 131:968-969, 1984.
12. Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, et al. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. *Nature.* 345:167-170, 1990.
13. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell.* 79:415-425, 1994
14. Belville C, Josso N, Picard JY. Persistence of Müllerian derivatives in males. *Am J Med Genet.* 89:218-223, 1999.
15. Bhagavath B, Stelling JR, van Lingen BL, Davis AJ, Reindollar RH, Gray MR. Congenital absence of the uterus and vagina (CAUV) is not associated with the N314D allele of the galactose-1-phosphate uridylyl transferase (GALT) gene. *J Soc Gynecol Invest.* 5:140A (abstract), 1998.
16. Birk O, Casiano D, Wassif C, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg J, Parker K, Porter F, Westphal H. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature.* 403:909-913, 2000.
17. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol.* 6:298-304, 1996.
18. Byskov AG, Hoyer PE. Embryology of mammalian gonads and ducts. En: *The Physiology of Reproduction.* Raven Press Knobil E y Neill JD (eds), Pp 487-540, 1994
19. Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev.* 66:71-117, 1986.
20. Capel B, Albrecht KH, Washburn LL, Eicher EM. Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on *Sry*. *Mech Dev.* 84:127-131, 1999.
21. Capel B. The battle of the sexes. *Mech Dev.* 92:89-103, 2000.
22. Carré-Eusebè D, Imbeaud S, Harbison M, New MI, Josso N, Picard JY. Variants of the anti-Müllerian hormone gene in a compound heterozygote with the persistent Müllerian duct syndrome and his family. *Hum. Genet.* 90: 389-394, 1992.
23. Carson SA. Heritable aspects of uterine anomalies: genetic analysis of Müllerian aplasia. *Fertil Steril.* 40:86-90, 1983.

24. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*. 45:685-698, 1986.
25. Catlin EA, Powell SM, Manganaro TF, Hudson PL, Ragin RC, Epstein J, Donahoe PK. Sex specific fetal lung development and Müllerian inhibiting substance. *Am Rev Respir Dis*. 141:466-470, 1990.
26. Chan W-Y, Rennert OM. Molecular aspects of sex determination. *Curr Mol Med*. 2:25-37, 2002.
27. Charlesworth B. The evolution of chromosomal sex determination. En: *The Genetics and Biology of Sex Determination*. Novartis Foundation symposium, John Wiley (Ed). Pp 220-225, 2002.
28. Clark A, Garland K, Russell L. The *Desert hedgehog (Dhh)* gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod*. 63:1825-1838, 2000.
29. Cohen-Haguenuer O, Picard JY, Mattei MG, et al. Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogen Cell Genet*. 44:2-6, 1987.
30. Cramer DW, Goldstein DP, Fraer C, Reichardt JK. Vaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome) associated with the N314D mutation of galactose-1-phosphate uridylyl transferase (GALT). *Mol Hum Reprod*. 2:145-148, 1996.
31. Cunha GR, Shannon JM, Neubauer BL. Mesenchymal-epithelial interactions in sex differentiation. *Hum Genet*. 58:68-77, 1981.
32. de Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, et al. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol*. 18:6653-6665, 1998.
33. de Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, et al. Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone receptor. *J Biol Chem* 273:29654-29660, 1998.
34. di Clemente N, Ghaffari S, Pepinsky RB, et al. A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-Müllerian hormone: the fetal ovary aromatase assay. *Development*. 114:721-727, 1992.
35. di Clemente N, Wilson CA, Faure E, et al. Cloning, expression and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol*. 8:1006-1020, 1994.

36. Dohr G, Tarmann T. Contacts between wolffian and müllerian cells at the tip of the outgrowing müllerian duct in rat embryos. *Acta Anat.* 120:123-128, 1984.
37. Donahoe PK, Fuller AF, Scully RE, Guy SR, Budzik GP. Müllerian inhibiting substance inhibits growth of a human ovarian cancer in nude mice. *Ann Surg.* 194:472-480, 1981.
38. Dresser DW, Hacker A, Lovell-Badge R, Guerrier D. The genes for a spliceosome protein (SAP62) and the anti-Müllerian hormone (AMH) are contiguous. *Hum Mol Genet.* 4:1613-1618, 1995.
39. Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 140:5789-5796, 1999.
40. Dutertre M, Gouédard L, Xavier F, et al. Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Müllerian hormone in transgenic mice. *Endocrinology.* 142:4040-4046, 2001.
41. Dyche WJ. A comparative study of the differentiation and involution of the Mullerian duct and Wolffian duct in the male and female fetal mouse. *J Morphol.* 162:175-209, 1979.
42. Fallat ME, Siow Y, Marra M, et al. Müllerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertil Steril.* 67:962-965, 1997.
43. Fénichel P, Rey R, Poggioli S, et al. Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 236:456-460, 1999
44. Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal sex dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet.* 1:711-713; 1959.
45. Giuili G, Shen WH, Ingraham HA. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Müllerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development.* 124:1799-1807, 1997.
46. Gouédard L, Chen YG, Thevenet L, et al. Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor. *J Biol Chem.* 275:27973-27978, 2000.
47. Griffin JE, Edwards C, Madden JD. Congenital absence of the vagina. The Mayer-Rokitansky-kuster-hauser syndrome. *Ann Intern Med.* 85:224-228, 1976.

48. Grumbach M, Conte F. Disorders of sex differentiation. En: Wilson J, Foster D. eds. Williams Textbook of Endocrinology, 8^a. ed. Philadelphia. Saunders. Pp:853-951, 1992.
49. Grunwald P. The relation of the outgrowing Müllerian duct to the Wolffian duct and its importance for the genesis of malformations. Anat Rec. 81:1-19, 1941.
50. Guerrier D, Boussin L, Mader S, Josso N, Kahn A, Picard JY. Expression of the gene for anti-Müllerian hormone. J Reprod Fertil. 88:695-706, 1990.
51. Guerrier D, Tran D, Vanderwinden JM, Hideux S, Van Outryve L, Legeai L, Bouchard M, Van Vliet G, De Laet MH, Picard JY, Kahn A, Josso N. The persistent Müllerian duct syndrome: A molecular approach. J Clin Endocrinol Metab. 68:46-52, 1989.
52. Gupta C. Role of prostaglandins in the testosterone-dependent Wolffian duct differentiation of the fetal mouse. Biol Reprod. 47:1151-1160, 1992.
53. Ha T, Segev DL, Barbie D, et al. Müllerian inhibiting substance inhibits ovarian cell growth through an Rb-independent mechanism. J Biol Chem. 275:37101-37109, 2000.
54. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. Development. 121:1603-1614, 1995.
55. Hamilton TH, Teng CS. Sexual stabilization of Mullerian ducts in the chick embryo. En: DeHaan RL, Ursprung H (eds). Organogenesis. Nueva York: Holt, Rinehart and Winston. Pp 681-700, 1965.
56. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, et al. SRY, SOX9 and DAX1 expression patterns during human sexual determination and gonadal development. Mech Dev. 2000:91:403-477.
57. Haqq CM, King CY, Donahoe PK, Weiss MA. SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. Proc Natl Acad Sci USA. 90:1097-1101, 1993.
58. Haqq CM, King CY, Ukiyama E, et al. Molecular basis of mammalian sexual determination: Activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. Science. 266:1494-1500, 1994.
59. Hayashi A, Donahoe PK, Budzik GP, Trelstad RL. Periductal and matrix glycosaminoglycans in rat Mullerian duct development and regression. Dev Biol. 92:16-26, 1982.

60. Heikkila M, Peltoketo H, Vainio S. Wnts and the female reproductive system. *J Exp Zool.* 290:616-623, 2001.
61. Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. The murine *steel Panda* mutation affects *kit* ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol.* 157:100-109, 1993.
62. Hughes IA. Sex differentiation. *Endocrinology.* 142:3281-3287, 2001.
63. Hutson JM, Baker ML. A hypothesis to explain abnormal gonadal descent in persistent Müllerian duct syndrome. *Pediatr Surg Int.* 9:542-543, 1994.
64. Hutson JM, Fallat ME, Donahoe PK. The fate of the grafted quail Mullerian duct in the chick embryo coelom. *J Pediatr Surg.* 19:345-352, 1984.
65. Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns CF. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev.* 18: 259-280, 1997.
66. Hutson JM, MacLaughlin DT, Ikawa H, Budzik GP, Donahoe PK. Regression of the Mullerian ducts during sexual differentiation in the chick embryo. A reappraisal. *Int Rev Physiol.* 27:177-224, 1983.
67. Ikeda Y, Shen W-H, Ingraham H, Parker K. Developmental expression of mouse *steroidogenic factor 1*, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol.* 8:654-662, 1994.
68. Imbeaud S, Belville C, Messika-Zeitoun L, Rey R, di Clemente N, Josso N, Picard J-Y. A 27 base-pair deletion of the anti-Müllerian type II receptor gene is the most common cause of the persistent Müllerian duct syndrome. *Hum Mol Genet.* 5:1269-1277, 1996.
69. Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattei M-G, di Clemente N, Tizard R, Carré-Eusèbe D, Belville C, et al. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nat Genet.* 11:382-388, 1995.
70. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature.* 183:302-303, 1959.
71. Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR. Requirement of *Bmpr1a* for Mullerian duct regression during male sexual development. *Nat. Genet.* 32:408-410, 2002.

72. Jones HW Jr, Mermut S. Familial occurrence of congenital absence of the vagina. *Am J Obstet Gynecol.* 114:1100-1106, 1972.
73. Josso N, Cate RL, Picard JY, et al. Anti-Müllerian hormone, the Jost factor. *Rec Progr Horm Res.* 48:1-59, 1993.
74. Josso N, di Clemente N. Transduction pathway of anti-mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF- β family. *Trends Endoc Metab.* 14:91-97, 2003.
75. Josso N, Picard JY, Imbeaud S, et al. Clinical aspects and molecular genetics of the persistent Müllerian duct syndrome. *Clin Endocrinol.* 47:137-144, 1997.
76. Josso N, Picard JY, Imbeaud S, et al. The persistent Müllerian duct syndrome: a rare cause of cryptorchidism. *Eur J Pediatr.* 152:S76-S78, 1993.
77. Josso N. Differentiation of the genital tract : stimulators and inhibitors. In: Austin CR, Edwards RG, eds. *Mechanism of Sex Differentiation in Animals and Man.* London: Academic Press, Pp 155-203, 1981.
78. Josso N. Permeability of membranes to the Mullerian-inhibiting substance synthesized by the human fetal testis in vitro: a clue to its biochemical nature. *J Clin Endocrinol Metab.* 34:265-270, 1972.
79. Josso, N, Picard, JY, Tran, D. The anti-Müllerian hormone. *Rec Progr Horm Res.* 33:117-160, 1977.
80. Jost, A. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Progr Horm Res.* 8: 379-418, 1953.
81. Jost, A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale.* 36: 271-315, 1947.
82. Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the celomic epithelium. *Dev Biol.* 203:323-333, 1998.
83. Kelley RI, Harris H, Mellman WJ. Characterization of normal and abnormal variants of galactose-1-phosphate uridyltransferase by isoelectric focusing. *Hum Genet.* 63:274-279. 1983.
84. Kibar Z. Ltap, a mammalian homologue of *Drosophila* Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nature Genet.* 28:251-255, 2001.

85. Kitajewsky J, Sasson D. The emergence of molecular gynecology: homeobox and Wnt genes in the female reproductive tract. *BioEssays*. 22:902-910, 2000.
86. Knebelmann B, Boussin L, Guerrier D, Legeai L, Kahn A, Josso N, Picard J.-Y. Anti-Mullerian hormone Bruxelles: a nonsense mutation associated with the persistent Mullerian duct syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:3767-3771, 1991.
87. Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development* (en prensa).
88. Koopman P. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci*. 55:839-856, 1999.
89. Koopman P. The genetics and Biology of vertebrate sex determination. *Cell*. 105:843-847, 2001.
90. Koopman P. The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals. *Reprod Fertil Dev*. 7:713-722, 1995.
91. Kriedberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. *Wt-1* is required for early kidney development. *Cell*. 74:679-691, 1993.
92. Kucheria K, Taneja N, Kinra G. Autosomal translocation of chromosomes 12q and 14q in Müllerian duct failure. *Ind J Med Res*. 87:290-294, 1988
93. Lane AH, Donahoe PK. New insights into Müllerian inhibiting substance and its mechanism of action. *J Endocrinol*. 158:1-6, 1998.
94. Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, et al. Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:571-576, 1996.
95. Lee MM, Donahoe PK, Silverman BL, et al. Measurements of serum Müllerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. *N Engl J Med* 336:1480-1486, 1997.
96. Lee MM, Seah CC, Masiakos PT, et al. Müllerian-inhibiting substance type II receptor expression and function in purified rat Leydig cells. *Endocrinology*. 140:2819-2827, 1999.
97. Lillie F. The theory of freemartin. *Science*. 43:611-613, 1916.

98. Lindenman E, Shepard MK, Pescovitz OH. Müllerian agenesis: an update. *Obstet Gynecol.* 90:307-312, 1997.
99. Lischke JH, Curtis CH, Lamb EJ. Discordance of vaginal agenesis in monozygotic twins. *Obstet Gynecol.* 41:920-923, 1973.
100. Lovell-Badge R, Canning C, Sekido R. Sex-determining genes in mice: building pathways. En: *The Genetics and Biology of Sex Determination*. Novartis Foundation symposium, John Wiley (Ed), Pp:4-17,2002.
101. Ludwig KS. The Mayer-Rokitansky-Küster-Hause syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 262:1-26, 1998.
102. Luo X, Ikeda Y, Parker K. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 77:481-490, 1994.
103. Lyet L, Louis F, Forest MG, et al. Ontogeny of reproductive abnormalities induced by deregulation of anti-Müllerian hormone expression in transgenic mice. *Biol Reprod.* 52: 444-454, 1995.
104. MacLaughlin DT, Hudson P, Graciano AL, et al. Müllerian duct regression and antiproliferative activities of Müllerian inhibiting substance reside in its carboxy-terminal domain. *Endocrinology.* 313:291-296, 1992.
105. Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol.* 7:958-968, 1997.
106. Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67:753-791, 1998.
107. McLaren A, Southee D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol.* 187:107-113, 1997.
108. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol.* 163:3-9, 2000.
109. Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N. Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Exper Cell Res.* 244:230-238, 1998.
110. Miller C, Sasson DA. Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development.* 125:3201-3211, 1998.
111. Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, et al. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev.* 10:2577-2587, 1996.

112. Mishina Y, Whitworth DJ, Racine C, Behringer RR. High specificity of Müllerian-inhibiting substance signaling in vivo. *Endocrinology*. 140:2084-2088, 1999.
113. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 124:1653-1664, 1997.
114. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, et al. Sox expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet*. 14:62-67, 1996.
115. Morikawa N, Clarke TR, Novina CD, et al. Human Müllerian inhibiting substance promoter contains a functional TFII-I-binding initiator. *Biol Reprod*. 63: 1075-1083, 2000.
116. Münsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sex differentiation. *Development*. 113:613-624, 1991.
117. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, et al. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*. 93:445-454, 1998.
118. Nachtigal MW, Ingraham HA. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:7711-7716, 1996.
119. Naguib KK, Teebi AS, Al-Awadi SA, El-Khalifa MY, Mahfouz ES. Familial uterine hernia syndrome: report of an arab family with four affected males. *Am J Hum Genet*. 33:180- 181, 1989.
120. Nef S, Parada LF. Hormones in male sexual development. *Genes Dev*. 14:3075-3086, 2000.
121. O'Neill RJ, Brennan FE, Delbridge ML, Crozier RH, Graves JAM. De novo insertion of an intron into mammalian sex determining gene, SRY. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:1653-1657, 1998
122. O'Rahilly R. The embriology and anatomy of the uterus. In: Norris HJ, Hertig AT, Abell MR, eds. *The Uterus*. Baltimore: Williams & Wilkins, Pp 17-39, 1973.
123. Oréal E, Pieau C, Mattéi MG, et al. Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn*. 212:522-532, 1998.

124. Palmer SJ, Burgoyne PS. *In situ* analysis of fetal, prepubertal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development*. 112:265-268, 1991.
125. Parr BA, McMahon AP. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*. 395:707-710, 1998.
126. Parr BA, McMahon AP. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*. 395:707-710, 1998.
127. Patten BM. *Human Embriology*. New York: McGraw-Hill, 1953.
128. Pavanello RCM. Relationship between Mayer-Rokitansky-Kuster (MRK) anomaly and hereditary renal adysplasia (HRA). *Am J Med Genet*. 29:845-849, 1988.
129. Picard JY, Benarous R, Guerrier, D, et al. Cloning and expression of cDNA for anti-Müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:5464-5468, 1986.
130. Picard JY, Josso N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol*. 34:23-29, 1984.
131. Picon R. Action du testicule foetal sur le developement in vitro des canaux de Müller chez le rat. *Arch Anat Microsc*. 58:1-9, 1969.
132. Pinsky L, Erickson RP, Schimke RN. The embriology of normal gonadal and genital development. En: *Genetic Disorders of Human Sexual Development*. Oxford University Press, (Ed) Nueva York, Pp. 3-10, 1999.
133. Quigley CA. Genetic basis of sex determination and sex differentiation. En: De Groot Lj, Jameson JL (eds). *Endocrinology 4a ed*. Filadelfia, WB Saunders pp 1926-1946, 2001.
134. Racine C, Rey R, Forest MG, et al. Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:594-599, 1998.
135. Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, et al. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 84:3836-3844, 1999.

136. Reindollar RH, Byrd JR, McDonough PG. Delayed sexual development: a study of 252 patients. *Am J Obstet Gynecol.* 140:371-380, 1981.
137. Resendes BL, Sohn SH, Stelling JR, Tineo R, Davis AJ, Gray MR, Reindollar RH. Role for anti-Müllerian hormone in congenital absence of the uterus and vagina. *Am J Med Genet.* 98:129-136, 2001.
138. Rey R, Al-Attar L, Louis F, et al. Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-Müllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *Am J Pathol.* 148:1689-1698, 1996.
139. Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC, et al. Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab.* 77:1220-1226, 1993.
140. Rey R, Sabourin JC, Venara M, et al. Anti-Müllerian hormone is a specific marker of Sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. *Hum Pathol.* 31:1202-1208, 2000.
141. Rey R. How to evaluate gonadal function in the cryptorchid boy. Lessons from new testicular markers. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 16:357-364, 2003.
142. Rey RA, Belville C, Nihoul-Fékété C, et al. Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum anti-Müllerian hormone measurement. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:627-631, 1999.
143. Roberts LM, Hirokawa Y, Nachtigal MW, Ingraham HA. Paracrine-mediated apoptosis in reproductive tract development. *Dev Biol.* 208:110-122, 1999.
144. Roberts LM, Hirokawa Y, Nachtigal MW, Ingraham HA. Paracrine-mediated apoptosis in reproductive tract development. *Dev Biol.* 208:110-122, 1999.
145. Rouiller-Fabre V, Carmona S, Abou-Merhi R, et al. Effect of anti-Müllerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats. *Endocrinology.* 139:1213-1220, 1998.
146. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 14.1-14.35, 1989.
147. Sarto GE, Simpson JL. Abnormalities of the Müllerian and Wolffian duct systems. *BDOAS XIV (6C):* 37-46, 1978.

148. Scherer G. The molecular genetic jigsaw puzzle of vertebrate sex determination and its missing pieces. En: The Genetics and Biology of Sex Determination. Novartis Foundation symposium, John Wiley Ed. Pp 225-235, 2002.
149. Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*. 127:65-73, 2000.
150. Schwindt B, Doyle LW, Hutson JM. Serum levels of Müllerian inhibiting substance in preterm and term male neonates. *J Urol*. 158:610-612, 1997.
151. Segev DL, Ha TU, Tran TT, et al. Müllerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa β -mediated pathway. *J Biol Chem*. 275:28371-28379, 2000.
152. Shawlot W, Behringer R. Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature*. 374:425-430, 1995.
153. Shen WH, Moore CCD, Ikeda Y, et al. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: A link to the sex determination cascade. *Cell*. 77:651-661, 1994.
154. Shokeir MHK. Aplasia of the Müllerian system: evidence for probable sex-limited autosomal dominant inheritance. *BDOAS XIV (6C)*: 147-150, 1978.
155. Simpson JL, Verp MS, Plouffe L. Female genital system. En: *Human Malformations*. RE Stevenson, Hall J, Goodman R, (eds.), Oxford University Press, pp 569-571, 1993.
156. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346:240-244, 1990.
157. Skinner MK, Tung PS, Fritz IB. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol*. 100:1941-1947, 1985.
158. Sloan WR, Walsh PC. Familial persistent müllerian duct syndrome. *J Urol*. 115:459-461, 1976.
159. Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*. 13:755-767, 1999.

160. Taguchi O, Cunha GR, Lawrence WD, Robboy SJ. Timing and irreversibility of Müllerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. *Dev Biol.* 106:394-398, 1984.
161. Takahashi M, Koide SS, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor. *Mol Cell Endocrinol.* 47:225-234, 1986.
162. Teng YN, Wang TR, Hwu WL, Lin SP, Lee-Chen GJ. Identification and characterization of -3c-g acceptor splice site mutation in human alpha-L-iduronidase associated with mucopolysaccharidosis type IH/S. *Clin Genet.* 57:131-136, 2000
163. Teixeira J, Kehas DJ, Antun R, Donahoe PK. Transcriptional regulation of the rat Müllerian inhibiting substance type II receptor in rodent Leydig cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:13831-13838, 1999.
164. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev.* 22:657-674, 2001.
165. Thompson ST, Grillis MA, Wolkoff LH, Katzin WE. Transverse testicular ectopia in a man with persistent Müllerian duct syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 118:752-755, 1994.
166. Tilman C, Capel B. Cellular and Molecular Pathways Regulating Mammalian Sex Determination. *Recent Prog Horm Res.* 57:1-18, 2002.
167. Torres M, Gómez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development.* 121: 4057-4065, 1995
168. Tran D, Meusy-Dessole N, Josso N. Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. *Nature.* 269:411-412, 1977.
169. Trbovich AM, Sluss PM, Laurich VM, et al. Müllerian inhibiting substance lowers testosterone in luteinizing hormone-stimulated rodents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:3393-3397, 2001.
170. Trelstadt RL, Hayashi A, Hayashi K, Donahoe PK. The epithelial-mesenchymal interface of the male Mullerian duct: loss of basement membrane integrity and ductal regression. *Dev Biol.* 92:27-40, 1982.
171. Tremblay JJ, Viger RS. GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology.* 142:977-986, 2001.

172. Tremblay JJ, Viger RS. Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol Reprod.* 64:1191-1199, 2001.
173. Tremblay JJ, Viger RS. Transcription factor GATA-4 enhances Müllerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol.* 13:1388-1401, 1999.
174. Tsang TE, Khoo PL, Jamieson RV, Zhou SX, Ang SL, Behringer R, Tam PP. The allocation and differentiation of mouse primordial germ cells. *Int J Dev Biol.* 45:549-556, 2001.
175. Tsuji M, Shima H, Cunha GR. In vitro androgen-induced growth and morphogenesis of the wolffian duct within urogenital reach. *Endocrinology.* 128:1805-1811, 1991.
176. Tsuji M, Shima H, Yonemura CY, Brody J, Donahoe PK, Cunha GR. Effect of human recombinant Mullerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during Mullerian duct regression in the rat. *Endocrinology.* 131:1481-1488, 1992.
177. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, et al. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 397: 405-409, 1999
178. Van Lingen BL, Eccles MR, Reindollar RH, Gray MR. Molecular genetic analysis of the PAX2 gene in patients with congenital absence of the uterus and vagina. *Dertil Steril.* 70:S402 (abstract), 1998b.
179. van Lingen BL, Reindollar RH, Davis AJ, Gray MR. Further evidence that the WT1 gene does not have a role in development of the Mullerian duct. *Am J Obstet Gynecol.* 179:597-603, 1998a.
180. Vigier B, Forest MG, Eychenne B, et al. Anti-Müllerian hormone produces endocrine sex-reversal of fetal ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:3684-3688, 1989.
181. Visser J.A, Olaso R, Verhoef-Post M, et al. The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signaling. *Mol Endocrinol.* 15: 936-945, 2001.
182. Visser JA, McLuskey A, van Beers T, et al. Structure and chromosomal localization of the human anti-Müllerian hormone type II receptor gene. *Biochem Biophys Res Comm.* 215:1029-1036, 1995.

183. Wang JJ, Roffler SR, Chou HH, et al. Characterization of Müllerian inhibiting substance binding on cervical carcinoma cells demonstrated by immunocytochemistry. *Tissue Cell*. 26:467-476, 1994.
184. Watanabe K, Clarke TR, Lane AH, et al. Endogenous expression of Müllerian inhibiting substance in early postnatal rat Sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:1624-1629, 2000.
185. Warot X, Fromental-Ramain C, Fraulob V, Chambon P, Dolle P. Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Development*. 124:4781-4791, 1997.
186. Western PS, Harry JL, Marshall-Graves JAM, Sinclair AH. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn*. 216:411-419, 1999.
187. Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature*. 364:713-715, 1993.
188. Whitman GF, Pantazis CG. Cellular localization of Müllerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid during human ovarian follicular development. *Am J Obstetr Gynecol*. 165:1881-1886, 1991.
189. Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfels C, et al. Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the TGF- β superfamily. *Mol Endocrinol*. 7:247-257, 1993.
190. Yamanaka J, Baker M, Metcalfe S, Hutson JM. Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys with cryptorchidism. *J Pediatr Surg*. 26:621-623, 1991.
191. Zondek LH, Zondek T. The secretory activity of the maturing epydydimis compared with maturational changes in other reproductive organs of the foetus, infant and child. *Acta Paediatr Scand*. 54:295-305, 1965.