



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“ESTUDIO DE LOS DESÓRDENES DEL
DESARROLLO SEXUAL 46,XY MEDIANTE
ANÁLISIS DEL GEN *AKRIC3*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ARMANDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS RAMOS TAVERA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

ASESORA INTERNA:

DRA. ELIA ROLDÁN REYES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

2018





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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno **MARTÍNEZ MARTÍNEZ ARMANDO**, con número de cuenta **302286562**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **27 de noviembre de 2018** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- | | | |
|-------------------|--|--|
| PRESIDENTE | M. en E.S. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ | |
| VOCAL | Dr. LUIS RAMOS TAVERA* | |
| SECRETARIO | Dra. ELIA ROLDÁN REYES | |
| SUPLENTE | Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA | |
| SUPLENTE | Dra. YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ | |

El título de la tesis que presenta es: **Estudio de los desórdenes del desarrollo sexual 46,XY mediante análisis del gen AKR1C3.**

Opción de titulación: Tesis

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 16 de octubre de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

RECONOCIMIENTO



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

El trabajo experimental del presente estudio se realizó en el Instituto Nacional de ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Biología de la Reproducción, Laboratorio de Bioquímica Hormonal, bajo la dirección del Dr. Luis Ramos Tavera.

A la Maestra en Ciencias Lizette Mares Gómez por la enseñanza y apoyo en la parte teórica y experimental de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio de bioquímica hormonal por su apoyo: Erika, Itzel, Fernanda, Melina, Octavio, Jorge, Stephany y Mariela.

Dedicatorias

A mis papás. Eva y Alfonso, por darme la oportunidad de llegar hasta aquí, por creer en mí a pesar de todos mis errores y ser un ejemplo y el motivo para superarme.

A mi hermana Juanita, por ser más que mi hermana, mi amiga, mi confidente, consejera y por creer siempre en mí a pesar de mis tropiezos, gracias por todo el apoyo en todos estos años de espera por este logro... “A mi hermana Juanita por el inclemente orden de su cabeza y el generoso desorden de su corazón”.

A mi sobrina Diana Arellí, por llegar a la familia y unirnos mucho más, por tu alegría y tus ocurrencias que alegran mi vida cada día. Espero poder ser un ejemplo para ti. Te amo.

A mi gran amigo Roberto Miguel Juárez Santiago†, porque ambos sabemos que sin ti este logro jamás hubiera empezado, gracias por ese empujón extra que necesitaba, por todos los buenos momentos vividos, por todo lo que me enseñaste, tu amistad y los recuerdos que siempre me acompañarán a lo largo de mi vida, donde te encuentres sabes que este triunfo también es tuyo. ¡Misión cumplida!

A Erandi Hernández, por siempre creer en mí y apoyarme, por enseñarme a ser mejor persona, por todo tu cariño y por todo lo vivido. Tu fortaleza ante la adversidad me demuestra que nuestra vida también le pertenece a las personas que nos quieren. Sabes que mientras sigamos vivos encontraremos la paz en nuestras miradas... Gracias por todo. Te quiero.

A la Bióloga Nora Isela Robles, por creer en mí, por todas las tardes que me regalaste para escucharme y apoyarme incondicionalmente en los malos momentos. Por la alegría que me brindas cuando más la necesito y empujarme para seguir siempre adelante. Espero algún día devolverte parte de todo lo que me has ayudado. Por tu apoyo incondicional. Gracias por a pesar de todo seguir siendo parte de mi vida. Te quiero mucho.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella, por las experiencias vividas dentro y fuera de sus salones que me han permitido desarrollarme como profesionista y ser mejor persona.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitirme cursar una carrera, por darme excelentes bases teóricas y prácticas para formarme como profesional.

A mi director de tesis, Dr. Luis Ramos Tavera, por la confianza que me deposito para realizar el trabajo que puso en mis manos, por su interés genuino en mí aprendizaje, por compartir su conocimiento desinteresadamente a aquel que se lo pida, por su paciencia, su dedicación, por transmitirnos su pasión por la búsqueda de más conocimiento y por hacer un ambiente mucho más agradable de trabajo. Lo admiro y siempre le estaré agradecido.

A la M.C. Lizette Mares Gómez, por su paciencia (infinita), por enseñarme y guiarme en todo lo necesario para desarrollarme en el laboratorio, por resolver mis dudas, las platicas y por los buenos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio. Tu profesionalismo y dedicación son mi ejemplo de superación. Siempre estaré en deuda contigo. Gracias por todo y por tu amistad.

Al Dr. Felipe Vilchis Uribe, por permitirme ser parte del laboratorio y aprender directa e indirectamente de él.

A todo el equipo de bioquímica hormonal por hacer un agradable ambiente de trabajo.
A Sarita.

A mi asesora interna, Dra. Elia Roldán Reyes, por sus valiosas sugerencias y comentarios para mejorar el presente trabajo y el tiempo dedicado para revisarlo.

A cada uno de los sinodales que enriquecieron con sus comentarios este trabajo:
M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez.

Dra. Lucila Álvarez Barrera.

Dra. Yolanda Córdova Galaviz.

Agradecimientos y menciones personales

A mis amigos de CCH plantel Oriente: Sergio, Mauricio, Eduardo, Luis, Julio, Martín, Daniel, Alejandro, Sofía, Nadia, Fanny, Perla, Claudia, Gaby, Génesis y todos los demás que faltan, gracias por compartir conmigo algunos de los mejores momentos de mi vida y por todos los recuerdos.

A mis colegas y amigos de la carrera de Biología de FESZ: Oscar, Rocío, Paty, Brenda, Jorge, Rodrigo, Héctor, Julio, Alejandra, Denisse, Lenin y Freddy. Gracias a todos por hacer de mi etapa en la universidad algo muy agradable, por los buenos momentos en la facultad y en campo que nunca voy a olvidar.

A la familia Hernández-Rivero: Por abrirme las puertas de su casa, por todas las lecciones de vida que aprendí, todos los consejos que me dieron y la amistad que se formó, es algo que voy a valorar el resto de mi vida.

A la QFB Itzel Calderón Cruz, porque tu decisión de estar en el laboratorio te hizo mi compañera, tu alegría, sinceridad y buena onda te hicieron mi amiga. Gracias por hacer mi estancia en el laboratorio más agradable. Te quiero amiga.

Al Lic. Isaac González por su apoyo técnico, administrativo y en la búsqueda del material audio-visual, bibliográfico y web necesario para el desarrollo de la presente investigación. Y por su amistad.

A todas las personas que en algún momento me brindaron un consejo y que de alguna forma creyeron que podía superarme.

INDICE**RESUMEN****LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS**

1. ANTECEDENTES	1-28
<i>1.1 Determinación y Diferenciación Sexual</i>	
<i>1.2 Esteroidogénesis</i>	
<i>1.3 Mecanismo de Acción de Andrógenos</i>	
<i>1.4 AKR1C3</i>	
<i>1.5 Desordenes del Desarrollo Sexual</i>	
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO	31
2. MATERIAL Y MÉTODOS	32
<i>2.1 Extracción de DNA</i>	
<i>2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	
<i>2.3 Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla</i>	
<i>2.4 Purificación de DNA mediante electroelución</i>	
<i>2.5 Secuenciación</i>	
<i>2.6 Análisis de equilibrio Hardy-Weinberg</i>	
<i>2.7 Análisis in silico</i>	
3. RESULTADOS	38
4. DISCUSIÓN	54
5. CONCLUSIÓN	61
6. REFERENCIAS	62

RESUMEN

Durante el desarrollo embrionario los andrógenos Testosterona (T) y Dihidrotestosterona (DHT) inducen la diferenciación sexual masculina. Estos esteroides son sintetizados a través de múltiples enzimas esteroideogénicas mediante una vía “clásica”. Mutaciones en la biosíntesis de alguna de estas enzimas generan desordenes del desarrollo sexual (DSD) en individuos 46,XY. Esta condición congénita se caracterizan por ambigüedad en genitales externos que incluyen fenotipos como: hipospadias, criptorquidia, hasta presentar genitales externos con apariencia completamente femeninos. Sin embargo, muchas de estas patologías siguen sin explicación ya que no todos los factores genéticos han sido caracterizados. El objetivo de este estudio fue identificar mutaciones en el gen *AKRIC3* en 25 individuos 46,XY con hipospadias. La enzima producto de este gen posee una actividad 3 α -reductasa/17 β -deshidrogenasa y participa en la síntesis de DHT por una ruta alternativa denominada “backdoor”. Se extrajo gDNA de todos los individuos y se amplificaron sus regiones exónicas por PCR-SSCP marcado con [α^{32} P]-dCTP, se usaron geles de agarosa y poliacrilamida, seguido de análisis por secuenciación automatizada. Se encontraron variantes génicas en los exones: 1 (c.15C>G), 2 (c.230A>G) y 3 (c.312G>A) de *AKRIC3*. Las variantes del exón 1 y exón 2 mostraron un cambio de aminoácido (p.H5Q) y (p.E77G) respectivamente. Para el exón 3 la variante resulto ser silenciosa (p.K104=). Mediante el análisis *in silico* se determinó que ninguna de las variantes posee un cambio que altere significativamente la proteína, por lo que se identificaron como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Con estos resultados concluimos que las variantes del gen *AKRIC3* presentan escasa participación en el desarrollo sexual masculino de la uretra y por consiguiente carecen de una probable causa de hipospadias en nuestro grupo estudiado, aunque no se descarta que otros genes como: *AKRIC4* ó *Mafb* podrían estar implicados como causa en la formación de hipospadias.

Palabras clave: aldo-ceto reductasas , andrógenos, determinación y diferenciación sexual, Desórdenes del Desarrollo Sexual, testosterona, dihidrotestosterona, esteroideogénesis, hipospadias, vía backdoor.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

Δ^4:	RUTA ESTEROIDOGENICA DENOMINADA DELTA 4
Δ^5:	RUTA ESTEROIDOGENICA DENOMINADA DELTA 5
17β-HSD5:	17 BETA HIDROXI-ESTEROIDE DESHIDROGENASA TIPO 5
3α-DIOL:	ANDROSTANDIOL
3α-HSD2:	3 ALPHA-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA TIPO 2
ACTH:	HORMONA ADENOCORTICOTROPICA
ADT:	ANDROSTERONA
AIS:	SINDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS
AKR's:	ALDO-CETO REDUCTASAS
AMH:	HORMONA ANTIMÜLLERIANA
AR:	RECEPTOR DE ANDROGENOS
ARE:	ELEMENTOS DE REPUESTA ANDROGÉNICA
ARX:	<i>GEN ARISTALES-RELATED HOMEBOX, X-liked</i>
CAIS:	SINDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS COMPLETA
CGP:	CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES
DBD:	DOMINIO DE UNIÓN A DNA
DHH:	<i>GEN DESERT HEDGEHOG</i>
DHP:	DIHIDROPROGESTERONA
DHT:	DIHIDROTESTOSTERONA
DMSO:	DIMETIL SULFÓXIDO
DNA:	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO

DSD:	DESÓRDENES DEL DESARROLLO SEXUAL
EDTA:	ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO
gDNA:	DNA GENÓMICO
HSD:	HIDROXI-ESTEROIDE DESHIDROGENASA
HSP:	PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO
LBD:	DOMINIO DE UNIÓN A LIGANDO
LIM1:	GEN HOMEBOX Lhx1
NTD:	DOMINIO N-TERMINAL
PAIS:	SINDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS PARCIAL
PCR:	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
PSA:	PERSULFATO DE AMONIO
SF1:	FACTOR ESTEROIDOGENICO 1
SNP:	POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEOTIDO
SRY:	REGION “Y” DETERMINANTE DEL SEXO
SSCP:	POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA
StAR:	PROTEINA REGULADORA DE LA ESTEROIDOGENESIS AGUDA
T :	TESTOSTERONA
TBE:	TRIS-BORATO-EDTA
TEMED:	TETRAMETILETILDIAMINA
WT1:	GEN SUPRESOR DEL TUMOR DE WILM’S

1. ANTECEDENTES

1.1 DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL

En humanos, el desarrollo del sistema reproductor masculino y femenino comienza alrededor de la quinta semana de gestación y se considera completa después de la aparición de los caracteres sexuales secundarios y la fertilidad (producción de gametos que se consideren viables) al final de la pubertad. Durante la embriogénesis, el desarrollo sexual puede dividirse en tres procesos secuenciales: cromosómico, gonadal y fenotípico (Jost, 1970). En humanos el sexo cromosómico es determinado al momento de la fecundación (Rey et al., 2000), la fertilización ocurre entre un ovocito (llevando un cromosoma X) y un espermatozoide (portando un cromosoma X ó un cromosoma Y), de esta unión resulta un cigoto con carga cromosómica 46,XX (femenina) ó 46,XY (masculina).

A nivel genético son múltiples los genes que regulan la diferenciación de la cresta urogenital a la gónada bipotencial. Específicamente han sido reportados tres genes que codifican para factores transcripcionales, los cuales son esenciales para la diferenciación de la cresta urogenital en humanos. Estos genes son denominados *WT1*, *NR5A1* y *Lim1*. *WT1* (gen supresor de tumor de Wilms') es un gen que codifica para un factor transcripcional que se une a la región promotora del gen *NR5A1* (Wilhem y Englert, 2002). Se ha descrito que se expresa en tejido mesodérmico embrionario, cresta urogenital, gónadas y mesonefros (Armstrong et al., 1993). Además se ha reportado evidencia que algunas isoformas de este gen actúan en sinergia con *NR5A1* para incrementar la expresión del gen de la hormona antimülleriana (*AMH*), el cual es esencial para la inhibición del desarrollo de estructuras femeninas (Arango et al., 1999). El gen *NR5A1* (*SF-1* o factor esteroideogénico 1) juega un papel clave en el desarrollo gonadal y glándula suprarrenal, ya que su proteína de transcripción regula genes

involucrados en la esteroidogénesis incluyendo: 3β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa, el receptor de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) (Parker y Schimmer, 1997). Su expresión ha sido determinada en la gónada, además de presentar un papel importante en el desarrollo del hipotálamo y la hipófisis anterior (Val y Swain, 2010). El gen *Lim1* (*Lhx1*) desempeña un papel en el desarrollo de los conductos femeninos y masculinos. La importancia de este gen se ha demostrado en ratones homocigotos con mutaciones en *Lim1* en donde están ausentes todos los derivados Wolffianos (epidídimo, vasos deferentes y vesícula seminal) y Müllerianos (oviductos, útero y vagina superior) (Kobayashi et al., 2004).

En humanos, durante la primera y segunda semana de gestación, no existen diferencias sexuales excepto por su carga cromosómica; alrededor de la sexta semana de gestación es cuando la gónada bipotencial comienza a diferenciarse dependiendo de la expresión de ciertos genes asociados al complemento cromosómico (Capel, 1998). Es en esta fase que el embrión masculino y el femenino tienen dos pares de conductos genitales: los conductos mesonéfricos (de Wolff) y los conductos paramesonéfricos (de Müller) (Kofman et al., 1982; Parma y Radi, 2012).

La determinación del sexo es un proceso en el que la gónada primordial indiferenciada comienza a desarrollarse hacia testículos u ovarios (**Fig. 1**). La diferenciación sexual consiste en la participación de hormonas que actúan a nivel de genitales externos e internos, resultando en una diferenciación hacia estructuras sexuales reproductoras dimórficas (Ono y Harley, 2013).

La determinación del testículo es un proceso activo que en humanos comienza alrededor de la sexta semana de gestación y se realiza bajo el control genético y de hormonas esteroideas, principalmente andrógenos. El desarrollo de los testículos es inducido por la expresión del gen *SRY* (Sex-determining Region of the Y chromosome) que es el principal iniciador de una cascada de interacciones génicas que determinan el desarrollo de los testículos a partir de la etapa de gónada bipotencial. El desarrollo de testículos en mamíferos requiere de un cromosoma Y estructuralmente íntegro y de un gen *SRY* transcripcionalmente activo. El gen *SRY* puede activar directa o indirectamente la transcripción del gen *SOX9* (*SRY-Related HMG-BOX Gene 9*). Ambos genes dirigen el desarrollo de la gónada masculina (Wilhem et al., 2007). El gen *SOX9* conjuntamente con el *SFI* son los responsables de la regulación de la expresión del gen de la *AMH*, esta hormona es la encargada de la regresión de los ductos Mülllerianos en el sexo masculino y es secretada por las células de Sertoli hacia las 7^a semana de gestación. La regulación del gen *AMH* se encuentra controlada bajo factores de transcripción como: *SFI*, *WT1* (Wilms tumor-1) y *GATA4* (GATA-Binding Protein 4). La *AMH* es importante ya que mutaciones o la ausencia de expresión en la gónada de individuos 46,XY permite el desarrollo de los conductos de Müller hacia las trompas de Falopio, útero y el tercio superior de la vagina (Wilhem et al., 2007; Parma y Radi, 2012).

Otros genes relacionados en la diferenciación testicular son: el gen *DHH* (*Desert HedgeHog*), el cual es necesario para la regulación de *SFI* en células de Leydig (Yao et al., 2002). El gen *DHH* también es expresado en las células de Sertoli en embrión murino y es clave importante en la diferenciación de células mioides, las cuales a su vez son las que envainan los cordones testiculares. El gen *DMRT1* (Doublesex-and-MAB3-Related Transcription) Factor 1 codifica para un factor transcripcional con dominios de unión al DNA denominados dedos de Zinc que regula la determinación y diferenciación sexual masculina, la

proteína muestra un patrón de expresión específicamente masculino en la cresta genital durante la séptima semana de gestación. El gen *Aristaless-Related Homeobox (ARX)* codifica un factor de transcripción que regula la migración neuronal y el desarrollo encefálico, asimismo se ha determinado su importancia en el desarrollo y diferenciación de las células de Leydig (Hannema y Hughes, 2007; Parma y Radi, 2012).

A la octava semana del desarrollo fetal, las células de Leydig comienzan a secretar andrógenos, esta acción es esencial para la masculinización del feto XY. La biosíntesis de andrógenos requiere la acción de enzimas que se activan en orden secuencial y son capaces de convertir el colesterol hacia testosterona (T). Estas enzimas son primordialmente algunos citocromos P450 y múltiples hidroxisteroide deshidrogenasas. La esteroidogénesis androgénica es capaz de inducir el desarrollo de los ductos Wolffianos entre la semana 8 y 13 de la vida fetal, en donde se diferenciaran los ductos en epidídimo, conductos deferentes y vesícula seminal. En tejidos periféricos la T es convertida a 5α -dihidrotestosterona (DHT) por acción de la enzima 5α -esteroide reductasa tipo 2 (*SRD5A2*), esta conversión es esencial para la formación de los genitales externos (uretra, escroto y pene) y regular el crecimiento de la próstata. La acción de los andrógenos, T y DHT, es mediada por la unión intracelular al receptor de andrógenos (*AR*, *NR3C4*), un receptor nuclear que es codificado por un gen localizado en el cromosoma Xq11-12. La participación de los andrógenos durante la etapa neonatal aún no se ha definido totalmente, aunque podría estar vinculada al desarrollo del sistema nervioso central. En la pubertad los andrógenos permiten el desarrollo del dimorfismo sexual, desarrollo de caracteres sexuales secundarios y controlan la reproducción (Vilchis et al., 2008; Vilchis et al., 2010). En el humano, al inicio de la pubertad los andrógenos regulan la espermatogénesis, causan un incremento en el desarrollo de la musculatura esquelética y una proliferación de glándulas sebáceas; así como una estimulación del vello axilar y púbico.

En el sexo masculino, los andrógenos también pueden generar, en cierta medida, la conducta agresiva y sexual y en algunas especies los efectos organizacionales del cerebro durante la vida prenatal o postnatal temprana (Wilson y Davies, 2007).

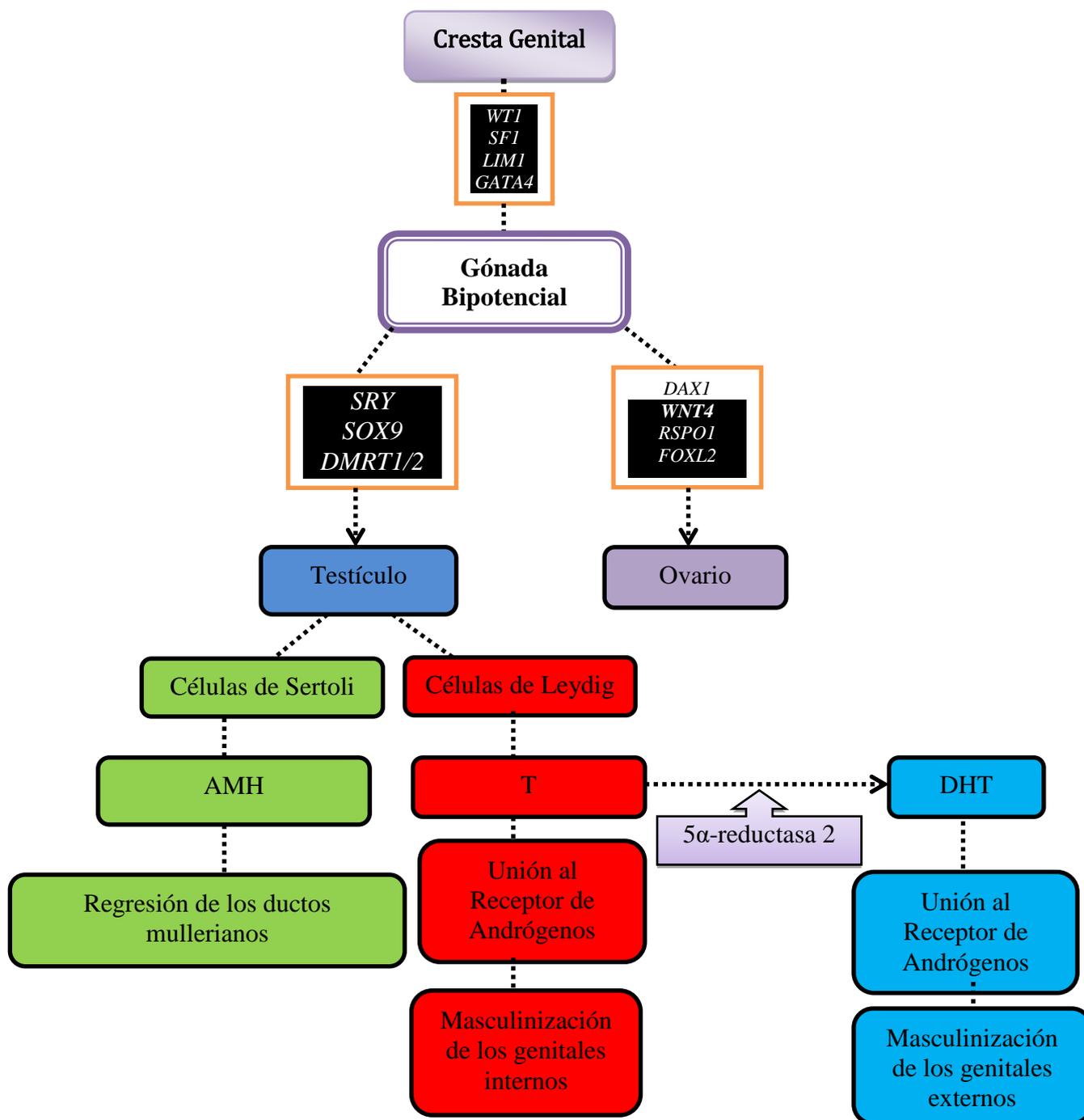


Fig. 1. Ruta genética para la diferenciación sexual masculina durante la etapa embrionaria. En humanos, la determinación del sexo es un proceso dinámico que abarca tres pasos cruciales desde la vida fetal hasta la edad adulta, el sexo cromosómico, gonadal y fenotípico. La gónada bipotencial se desarrolla independientemente del contexto cromosómico y los embriones XX y XY expresan el mismo conjunto de genes en esta etapa. Bajo la influencia de los factores genéticos, la gónada bipotencial formará un ovario o un testículo a través de las vías femeninas (derecha) o masculina (izquierda).

1.2 ESTEROIDOGÉNESIS

Las hormonas esteroides están encargadas de regular múltiples procesos metabólicos así como controlar la diferenciación sexual durante la vida fetal y la etapa adulta (Miller y Auchus, 2011). La producción de hormonas esteroides como glucocorticoides, mineralocorticoides, progestágenos, estrógenos y andrógenos se logra a través de una cascada de enzimas (como citocromos e hidroxisteroide deshidrogenasas) que son codificadas por diferentes genes y son comunes en todos los órganos productores de esteroides (Flück et al., 2011).

Los citocromos P450 representan un amplio número de enzimas oxidativas, todas ellas consisten de aproximadamente 500 aminoácidos y contienen un único grupo prostético hemo. Estas enzimas desempeñan un papel fundamental en el metabolismo y biosíntesis de drogas, eicosanoides, ácido araquidónico, colesterol, ácidos biliares, esteroides, vitamina D3 e hidroxilación del ácido retinoico. Las enzimas P450 involucradas en la biosíntesis de hormonas esteroides son proteínas asociadas a la membrana del retículo endoplásmico y mitocondria, bioquímicamente existen dos clases de enzimas P450; las enzimas tipo I como CYP11A, CYP11B1 y CYP11B2 están asociados a la membrana mitocondrial y las enzimas tipo II como CYP17, CYP19 y CYP21 se encuentran asociadas al retículo endoplasmático (microsomal). Durante la diferenciación sexual del borde urogenital, el factor de transcripción SF1, un miembro de la superfamilia de receptores nucleares, regula la expresión de los genes P450 implicados en la esteroidogénesis. Estudios moleculares recientes han reportado que las mutaciones en estos genes causan alteraciones innatas del metabolismo y contribuyen a muchas enfermedades clínicamente relevantes (Miller y Auchus, 2011).

La transformación de compuestos Δ^5 , 3β -hidroxiesteroides a sus correspondientes metabolitos reducidos Δ^4 , 3ceto-esteroides es una etapa esencial para la biosíntesis de todas las clases de esteroides activos: progesterona, mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos y estrógenos. Hasta este momento se han identificado, clonado y caracterizado siete isoformas de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 isomerasa (3β -HSD I-VII), principalmente en rata, ratón y humano. Asimismo se han caracterizado otras 3β -HSD en especies como el mono, bovino y hámster. Estas isoenzimas son codificadas por distintos genes y se ha observado que presentan un alto porcentaje de homología en su secuencia de aminoácidos. Las 3β -HSD son enzimas asociadas a la membrana mitocondrial o microsomal dependiendo del tipo celular en donde se estén expresando. En humanos se ha observado que su deficiencia genera una forma rara de hiperplasia adrenal congénita en ambos sexos, además de provocar una masculinización incompleta de los genitales externos en hombres con cariotipo 46,XY (Simard et al., 2005).

Las 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasas (17β HSD) regulan las concentraciones de andrógenos y estrógenos en mamíferos, esta reacción se lleva a cabo a través de la reducción de 17-ceto esteroides o la oxidación de 17β esteroides utilizando NAD(P)H o NAD(P)(+) como cofactor. La 17β -HSD ha sido clonada a partir de diversas especies y se han caracterizado nueve diferentes isoenzimas, todas ellas codificadas por diferentes genes (Mendonca et al., 2017). Estas isoenzimas han sido clonadas ampliamente a partir de diversas especies como el humano, rata, ratón y mono. Además de esto, se han clonado otras isoenzimas en especies como el hámster, rana, gallo y conejo. A diferencia de las 3β HSD, se ha observado que las 17β -HSD presentan un bajo porcentaje de homología en su secuencia de aminoácidos. Las alteraciones en las 17β -HSD generan anomalías en la diferenciación

sexual, además de estar involucradas en ciertas enfermedades neuronales y en la patogénesis de varios tipos de cáncer (Rizner y Penning, 2014; Mendonca et al., 2017).

Todas las hormonas esteroides son sintetizadas a partir de la molécula del colesterol y poseen una estructura particular común basada en cuatro anillos denominada ciclopentanoperhidrofenantreno. El colesterol debe ser transportado hacia el interior de la membrana mitocondrial interna (MMI) por la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein), sitio celular donde la molécula de colesterol es transformada a pregnenolona debido a una serie de tres reacciones consecutivas catalizadas por una única enzima denominada citocromo CYP11A1 (Cholesterol side-chain cleavage enzyme o Citocromo P450_{scc}). La reacción consiste en la hidroxilación del carbono 22, hidroxilación del carbono 20 y escisión del enlace 20,22 carbono-carbono (Miller y Auchus, 2011).

La pregnenolona puede ser convertida a T mediante dos rutas, denominadas delta 4 (Δ^4) y delta 5 (Δ^5). En la vía Δ^4 , la biotransformación de T a partir del colesterol involucra la presencia de 4 enzimas esenciales para su conversión: citocromo P450_{scc} enzima que rompe la cadena lateral del colesterol (gen *CYP11A1*), 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (gen *HSD3B2*), 17 α -hidroxilasa/17,20 liasa (gen *CYP17A1*) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (gen *HSD17B3*); mientras que en la vía Δ^5 la formación de T involucra la presencia de 4 enzimas: CYP11A1, CYP17A1, 3 β -HSD2 y 17 β -HSD tipo 3. La ruta Δ^4 es principalmente usada en el ratón, mientras que la ruta Δ^5 es preferentemente usada en humanos, especialmente durante la vida fetal. Estas reacciones enzimáticas involucradas en la transformación de colesterol hacia DHT usando a la T como intermediario son nombradas usualmente como vía “clásica”. Estas dos rutas pueden generar la producción de T y esta a su

vez es reducida en tejidos específicos por la isoenzima 5α -esteroide reductasa tipo 2 para producir DHT (Payne y Hales, 2004; Biason et al., 2013; Fluck y Payne, et al., 2014).

Recientemente (2004) se han reportado dos vías para la producción de DHT sin el uso de T como intermediario en testículo de un marsupial: *Macropus eugenii*. A diferencia de la vía clásica, la vía “alterna” utiliza androstendiona (AD) como intermediario para la producción de DHT; además se han encontrado hallazgos de una vía denominada “backdoor” (**Fig. 2**) (Wilson et al., 2003; Auchus, 2004; Mahendro et al., 2004; Fukami et al., 2013). El término “backdoor” fue usado para describir la síntesis en la especie *Macropus eugenii*, en la que DHT es biosintetizada a partir del androstandiol (3α -diol). Este término fue propuesto por Auchus (2004) y lo más relevante en la vía “backdoor” hacia DHT es la existencia de un paso catalizado por una enzima que permite convertir un esteroide inactivo hacia una hormona activa (Luu-The, 2013). En esta vía el colesterol es transformado por el citocromo P450_{sc} (*CYP11A1*) hacia pregnenolona, consecutivamente este esteroide es convertido a progesterona mediante la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (3β -HSD2). La progesterona es reducida hacia 5α -dihidroprogesterona (DHP) por la enzima 5α -reductasa tipo 1. La molécula de dihidroprogesterona es reducida a alopregnenolona por la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α -HSD) o también denominada aldo-ceto reductasa tipo 2/4 (*AKR1C2/4*). Inmediatamente después la alopregnenolona es transformada a androsterona (ADT) mediante el *CYP17A1*. La androsterona formada puede ser reducida a androstandiol (3α -diol) por acción de la enzima *AKR1C3* y finalmente el 3α -diol puede ser oxidado a DHT mediante las enzimas *AKR1C2/4* o la 17β -HSD tipo 6 (Biason et al., 2013; Fukami et al., 2013; Luu-The, 2013) (**Fig. 3**).

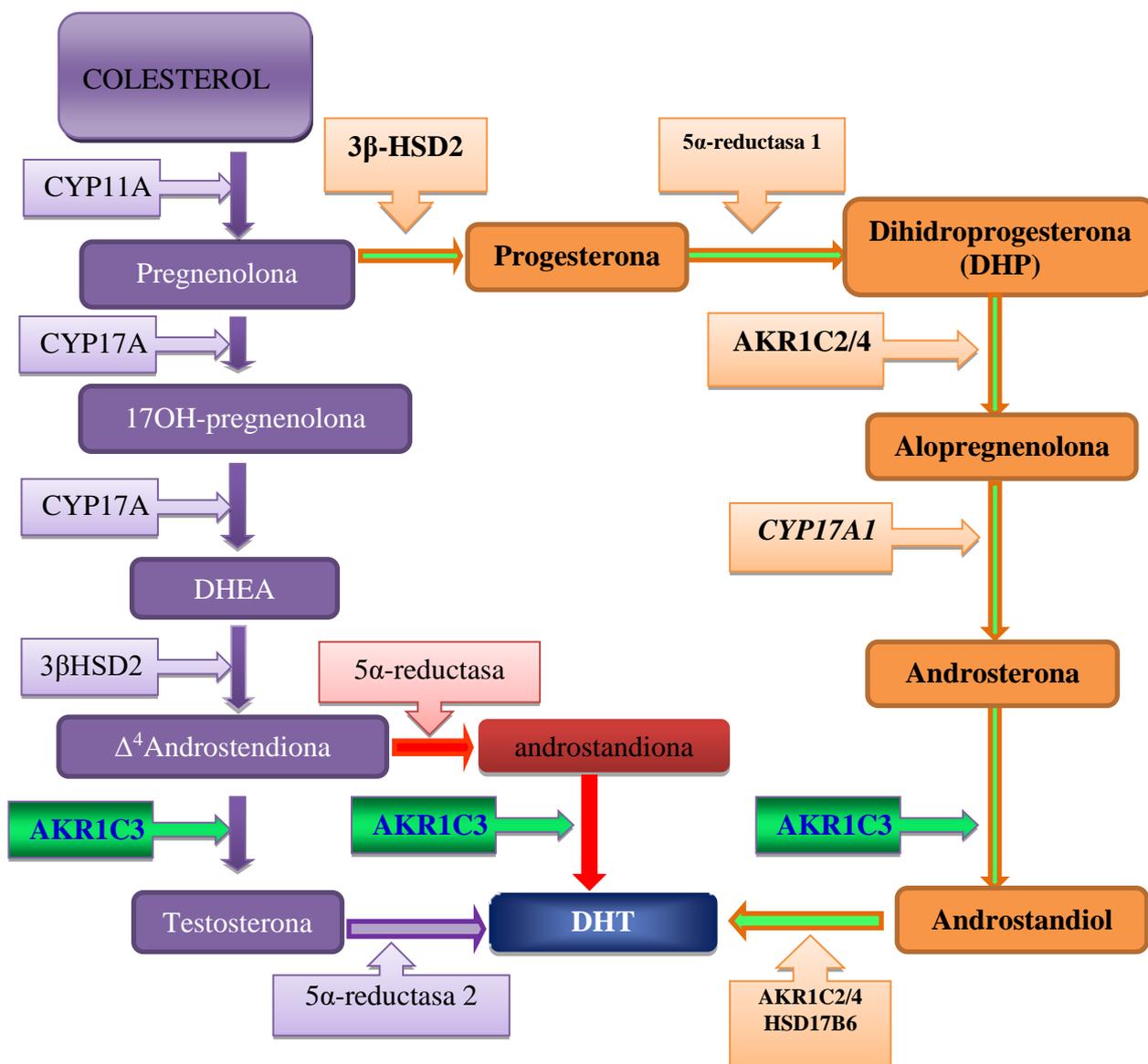


Figura 2. Síntesis y metabolismo de hormonas esteroides sexuales. La figura ilustra la formación de andrógenos a partir del colesterol. Vía Δ^5 “clásica” con sus respectivas enzimas (morada), ruta “alterna” (rojo), vía “backdoor” (naranja) para la biosíntesis de DHT en el humano. La reacción catalizada por la *AKR1C3* es marcada en verde.

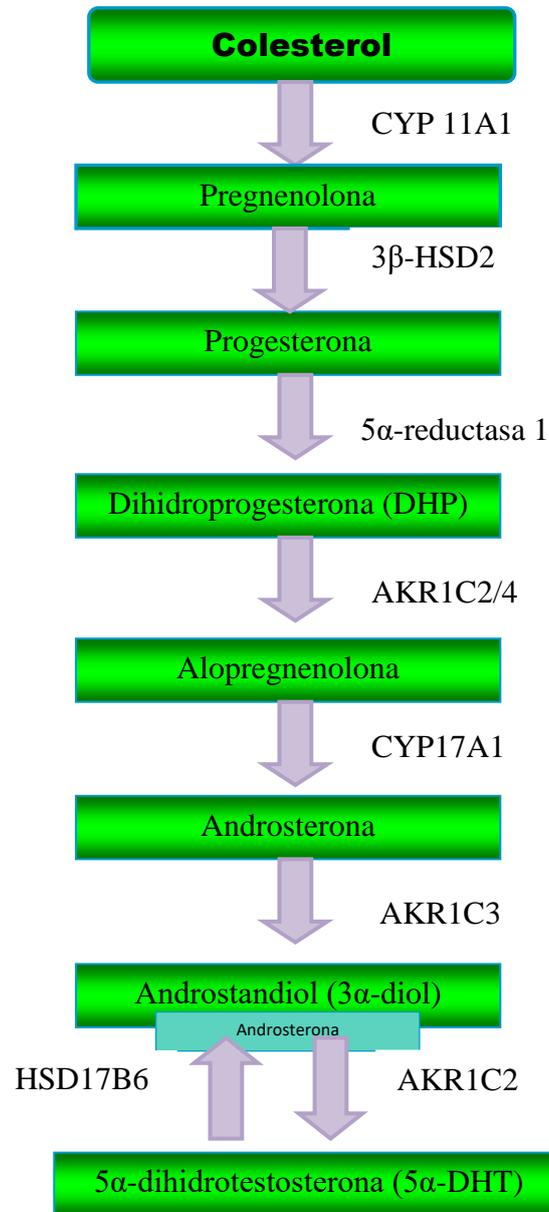


Figura 3. Biosíntesis de hormonas esteroides mediante la vía “backdoor”. La figura muestra la formación de DHT con sus respectivas enzimas para cada sustrato.

1.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE ANDRÓGENOS

Los andrógenos son hormonas esteroides cuya función principal está involucrada en el desarrollo del fenotipo masculino durante la embriogénesis, la maduración sexual durante la pubertad, el mantenimiento de los órganos reproductores masculinos y la espermatogénesis durante la edad adulta. Además afectan otros tejidos no reproductivos como hueso y músculo esquelético (Heinlein et al., 2002; Patrao et al., 2009). Los receptores a hormonas esteroides pertenecen a una superfamilia de factores transcripcionales que regulan la función de genes en células blanco (Whitfield, 1999).

El receptor de andrógenos (AR) o *NR3C4* (Nuclear Receptor subfamily 3, group C, member 4) es un gen de única copia que se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq11-q12) y es miembro de una superfamilia de receptores nucleares; este gen ha sido conservado evolutivamente en todos los mamíferos (monotremas, marsupiales y placentarios). El *NR3C4* contiene 8 exones denominados con la letra A-H, se encuentran separados por 7 intrones con un tamaño aproximado de 90 Kb y su transcrito posee un tamaño de aproximadamente 10.6 Kb. Todos los exones contribuyen a codificar para las distintas regiones de una proteína de 919 aminoácidos de un tamaño de 110 kDa (Quigley et al., 1995; Gelmann, 2002). Su estructura está organizada en dominios funcionales que consisten en: un dominio N-terminal (NTD) que es codificado por el exón 1, un dominio de unión al DNA (DBD) codificado por los exones 2 y 3 y un dominio de unión al ligando C-terminal (LBD) que comprende los 5 exones restantes del gen. La región NTD es amplia y abarca casi la mitad de la secuencia codificante del receptor. Esta región contiene el principal dominio de transactivación de AR, denominado función de activación 1 (AF1) (Patrao et al., 2009). El dominio DBD incluye ocho residuos de cisteína que forman dos complejos de coordinación,

cada uno se compone de cuatro cisteínas y un ion de zinc (Zn^{2+}), estas estructuras se conocen como dedos de zinc. El primer dedo de zinc interviene en el reconocimiento específico del DNA, mientras que el segundo dedo está asociado con la homodimerización del AR. El LBD está compuesto por 12 hélices alfa ordenadas en una estructura globular, esta conformación es esencial para el reclutamiento e interacción con correguladores (Shang et al., 2002; Gobinet et al., 2002).

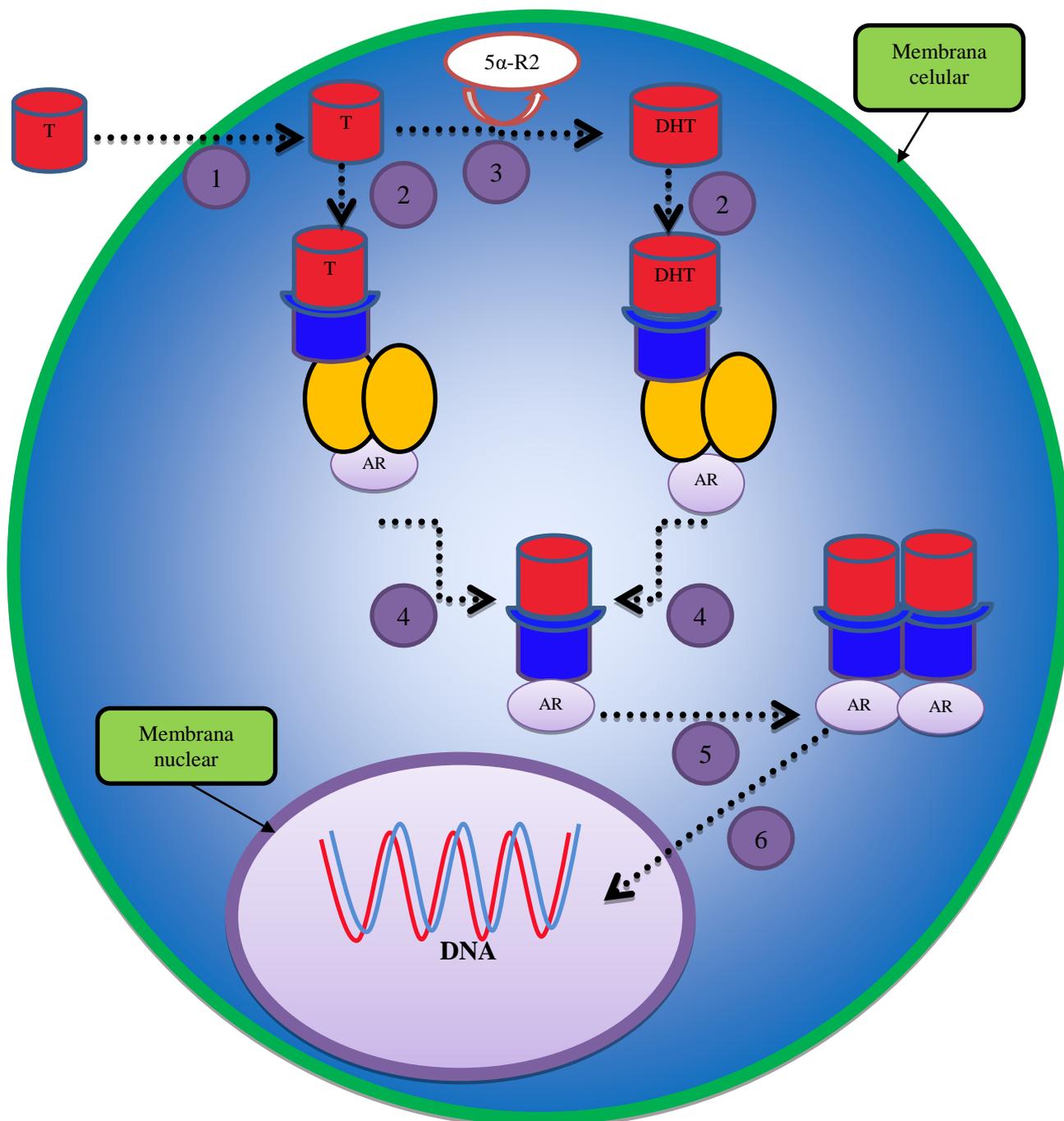
La acción de los andrógenos, T y DHT, se inicia con su unión al AR. Ambos esteroides pueden unirse al AR, sin embargo DHT presenta mayor afinidad (Matsumoto y Bremner, 2011). Además, el complejo DHT-AR tiene mayor termoestabilidad y una tasa de disociación más lenta que el complejo T-AR. Antes de unirse a su ligando, el AR se localiza perinuclearmente y se encuentra unido a moléculas chaperonas o proteínas de choque térmico (HSP). La función de las proteínas HSP es mantener inactivo al receptor en ausencia de ligando, ocasionando la inactivación de la transcripción (Gelman, 2002). La T entra a la célula mediante difusión pasiva, lo que conlleva a su unión con el AR. En tejidos periféricos la T puede ser reducida por la enzima 5α -reductasa tipo 2 hacia DHT (Vilchis et al., 2010). Después de la unión con T o DHT, el AR sufre un cambio conformacional que facilita su dimerización, transporte al núcleo e interacción con el DNA blanco (**Fig. 4**). El complejo ligando-AR es liberado mediante acetilación de histonas que lo mantienen inactivo lo que induce la fosforilación del receptor y su eventual activación (Patrao et al., 2009; Van de Wijngaart et al., 2012). En el núcleo, el AR forma homodímeros o heterodímeros que se unen a secuencias de DNA de reconocimiento específico, denominados elementos de respuesta androgénica (ARE), que se ubican en las regiones promotoras de los genes regulados por andrógenos y generan el inicio de la transcripción (Heinlein y Chang, 2002; Gelman, 2002). Después de unirse con los ARE, el complejo ARE-AR-ligando puede interactuar con los

complejos generales de la transcripción llamados corre reguladores, que son proteínas reclutadas por el AR y que estimulan la transcripción de genes. Las regiones AF (AF-1 y AF-2) son las encargadas de interactuar con este grupo de coactivadores, la región AF-1 es responsable de casi toda la actividad de la transcripción y la región del receptor AF-2 interactúa con el motivo LXXLL (L es leucina y X cualquier amino ácido) del coactivador, favoreciendo el control de genes de la transcripción, modulando la unión del DNA, remodelado de la cromatina y reclutando factores asociados con la RNA polimerasa II. Una vez terminada la transcripción y maduración del mRNA, se incorpora al citoplasma donde viaja al ribosoma y comienza a unirse a complejos de traducción para la producción de proteínas andrógeno-reguladas (Hughes IA, 2001; Gelmann, 2002; Shang et al., 2002; Patrao et al., 2009).

A pesar de que la T y DHT interactúan con un mismo receptor, ejercen efectos fisiológicos diferentes (Quigley et al., 1995). Se sabe que la interacción T-AR es responsable de la regulación de la producción de gonadotropinas, de la espermatogénesis y de la formación de los genitales internos (epidídimo, conductos deferentes y vesícula seminal) a partir del anclaje de los conductos Wolffianos durante la diferenciación sexual fenotípica del embrión masculino. En contraste, la DHT unida al mismo receptor induce la formación de los genitales externos (escroto y pene) y la próstata, a partir del primordio del seno urogenital en el embrión masculino, asimismo la DHT es requerida para la maduración sexual durante la pubertad (Biason et al., 2013).

El síndrome de insensibilidad a los andrógenos (AIS) es un desorden hereditario del desarrollo sexual (OMIM #300068) que afecta exclusivamente a individuos con cariotipo 46,XY. El desarrollo anormal de las estructuras sexuales internas y externas observadas en estos individuos se debe a mutaciones en la línea germinal, específicamente en el gen del

receptor de andrógenos (*AR/NR3C4*). El gen *NR3C4* codifica para una proteína transductora de señales de 919 aminoácidos y que funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando. A la fecha, se han descrito más de 350 mutaciones distintas en el AR en pacientes con AIS. De estas alteraciones, aproximadamente el 30% parece ser mutaciones *de novo* (Ramos et al., 2018).



T= Testosterona
DHT= Dihidrotestosterona
5α-R2= 5α-reductasa tipo 2
AR= Receptor de Andrógenos

Figura 4. Mecanismo molecular de andrógenos en célula blanca. 1) entrada del esteroide por difusión pasiva a la célula, 2) unión del esteroide a su receptor, 3) transformación de T a DHT por la 5α-reductasa tipo 2, 4) disociación del receptor de andrógenos de las HSP, 5) dimerización del receptor y 6) translocación al núcleo y unión al DNA.

1.4 *AKR1C3*

Las aldo ceto reductasas (AKR) son proteínas dependientes de NADPH/NADH que pertenecen a una superfamilia de enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción. Las enzimas humanas de la familia 1 (AKR1) han sido principalmente implicadas en el metabolismo de esteroides. Algunos miembros de estas familias actúan en las posiciones C3, C17 y C20 de múltiples esteroides. Al respecto, existen dos subfamilias: AKR1C y AKR1D (Rizner y Penning, 2013). Las AKR1C catalizan la conversión de aldehídos y cetonas hacia alcoholes primarios y secundarios. (Rizner y Penning, 2014; Penning et al., 2000).

Las AKRs existen primordialmente en el citoplasma celular como proteínas monoméricas de 34-37 KDa (Khanna et al., 1995). En humanos, existen cuatro isoformas conocidas como: 20 α (3 α)-HSD tipo 4 (AKR1C1), 3 α -HSD tipo 3 (AKR1C2), 3 α -HSD tipo 2 (AKR1C3) y 3 α -HSD tipo 1 (AKR1C4). Las AKRs poseen un plegamiento característico en barril α/β , a este tipo de pliegue se le denomina “barril de triosa isomerasa” (TIM). El plegamiento consiste en una secuencia alternada de α hélices y hebras β , que se repiten ocho veces y donde la hebras β se unen en el centro de la enzima para adoptar la conformación de un barril (Penning et al., 2015). Las AKRs poseen una secuencia muy similar entre todas las isoformas humanas, de aproximadamente 84% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Penning et al., 2004; Rizner y Penning, 2014).

Interesantemente, al miembro C3 de la familia AKR1 se le han asignado dos nombres genéticos (*HSD17B5* o *AKR1C3*) y dos nombres para su producto enzimático (17 β -HSD5 o 3 α -HSD2), esto debido a la multifuncionalidad de la enzima (Qin et al., 2005). En humanos, el gen *AKR1C3* se ubica en el brazo corto del cromosoma 10 (10p14-p15). Este gen está compuesto por 9 exones y 8 intrones que en su totalidad presenta un tamaño aproximado de

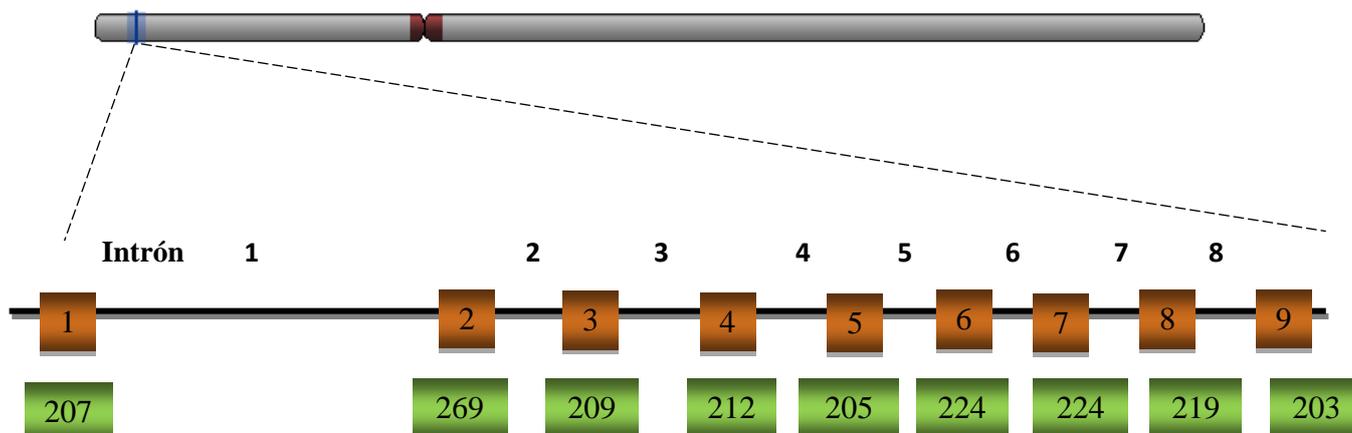
13 kilobases (Kb) con un mRNA de 1.2 kb (Miller y Auchus, 2011) y codifica para una proteína de 323 aa (**Fig. 5**) (Penning et al., 2001; Rizner y Penning, 2014). La región 5' no traducida del gen *AKR1C3* aparentemente no posee una caja TATA ni caja CAAT dentro de los 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, sin embargo una secuencia CCT repetida ha sido descrita como esencial para promover la actividad transcripcional del gen *AKR1C3* y que funciona para la unión de proteínas nucleares Sp1 y Sp3. Estos factores de transcripción Sp1/Sp3 son necesarios para inducir la expresión y constitución del gen (Qin et al., 2005). Se ha reportado que el gen *AKR1C3* expresa su mRNA basal en diversos tejidos como: próstata, testículo, hígado, riñón, pulmón, cerebro, placenta, bazo, suprarrenales y ovario; aunque se ha demostrado que *AKR1C3* está altamente expresado en próstata y glándula mamaria, así como glándulas suprarrenales en periodo fetal (Flück et al., 2011; Penning et al., 2015;).

En su estructura proteica la 3 α -HSD2 contiene un sitio activo conservado entre todos los miembros de la familia y es denominado "tétrada catalítica". La región está compuesta de cuatro aminoácidos Tyr55, Lys84, Asp50 e His117, asimismo posee un sitio de unión al sustrato NAD(P)(H). Los datos han sugerido que un cambio en la secuencia de aminoácidos en Tyr55 y Lys84 altera la actividad catalítica de las AKRs. La enzima presenta un sitio de unión al sustrato en la región carboxilo terminal, la cual se cree que tiene la habilidad de discriminar entre los diferentes sustratos de las AKRs (**Fig. 6, 7**) (Jez et al., 1997; Penning et al., 2001; Qiu et al., 2004; Rizner y Penning, 2014). La enzima codificada por el gen *AKR1C3* presenta una doble función: de oxidación [3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSD)] y de reducción [17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD)], dependiendo del sustrato al que se una, aunque algunos estudios han reportado que actúa preferentemente como 17-ceto esteroide reductasa para formar productos 17 β -reducidos (Dufort et al., 1999; Penning et al.,

2015). Esta actividad 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa es importante ya que ha sido implicada en la formación de andrógenos en las distintas vías, incluyendo la vía “backdoor”. La enzima presenta una alta eficiencia catalítica en próstata para reducir Δ^4 -androsteno-3,17-diona (4-diona) hacia el andrógeno T (vía “clásica”), también reduce 5 α -androstano-3,17-diona hacia 5 α -DHT (vía alterna) y posee la cualidad de reducir 5 α -DHT a 3 α -diol (andrógeno débil), por ello se sugiere que una de las funciones de esta enzima es regular la disponibilidad del AR, ya que al poder transformar andrógenos inactivos en andrógenos activos y viceversa, se puede promover o reprimir el inicio del mecanismo de acción de andrógenos (Penning, 2000; Rizner y Penning, 2014; Penning et al., 2015). La enzima presenta un papel importante en la formación de esteroides neuroactivos, lo cual muestra una relevancia en el desarrollo y diferenciación cerebral (Mellon y Griffin, 2002).

Se ha demostrado que la 3 α -HSD2 reduce al sustrato androsterona (ADT) y lo transforma a 3 α -diol en cantidades significativas gracias a su capacidad de funcionar como una 17-ceto reductasa en presencia del cofactor NADPH (**Fig. 6**) (Penning et al., 2000), seguido de esto el 3 α -diol es oxidado hacia la DHT, de este modo se puede producir el potente andrógeno sin la necesidad de pasar por el intermediario T (Jez et al., 1997; Rizner y Penning, 2014). Los datos podrían estar sugiriendo que esta enzima posee un papel fisiológico importante dentro de la vía “backdoor” en la producción de andrógenos, aunque a la fecha no existen datos concluyentes al respecto. Por lo tanto, una alteración en el gen *AKR1C3* puede producir un daño en la función o estructura de la proteína que codifica, lo cual podría repercutir en su participación dentro de la vía backdoor en la síntesis de DHT y afectar de manera significativa la diferenciación sexual masculina normal durante la embriogénesis (Biaison et al., 2013; Soderhall et al., 2015).

Cromosoma 10 (10p15-p14)



Gen *AKRIC3*

Figura 5. Ubicación esquemática del gen *AKRIC3* en el brazo corto del cromosoma 10. Se muestra la distribución de sus exones (cuadro naranja) con sus respectivos tamaños en pares de bases (pb) (cuadro verde) y los intrones (negro) (Ramos y Martínez, 2018).

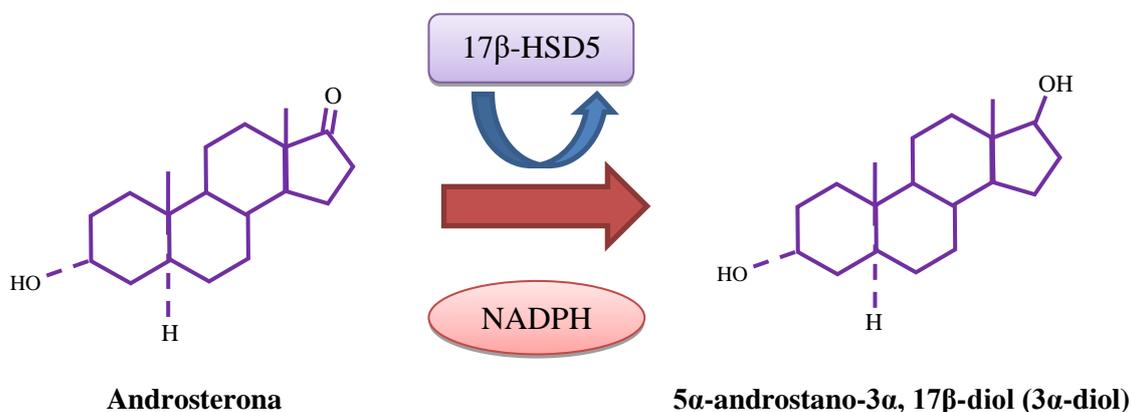


Figura 6. Esquema representativo de la transformación de androsterona por la acción de la enzima 17β-HSD5 (*AKRIC3*). El NADPH se utiliza como cofactor para obtener el andrógeno 5α-androstano-3α, 17β-diol (3α-diol), un precursor de la DTH dentro de la vía "backdoor".

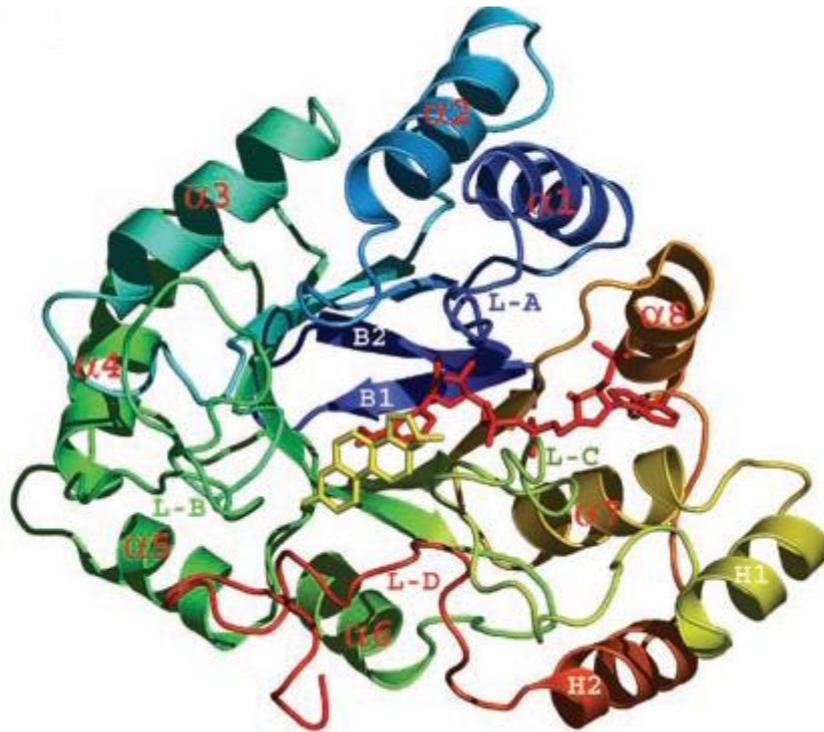


Figura 7. Representación tridimensional de la estructura de la proteína 17 β -HSD tipo 5 (17 β -HSD5) o 3 α -HSD tipo 2 (3 α -HSD2) codificada por el gen *AKR1C3*, donde se muestran el complejo formado por 17 β -HSD5/testosterona/NADP. Se observa la T en amarillo y la molécula de NADP en rojo. En azul fuerte dos laminas β (B1 y B2) formando una horquilla alrededor de la región N-terminal de la estructura beta-barril que contiene ocho estructuras (α/β) numerados (α 1- α 8), dos α -hélices adicionales (H2 y H1), cuatro loops amplios (L-A a L-D) respectivamente, que forman el sitio de unión al sustrato y al cofactor en la región C-terminal de la molécula (Figura tomada de Qiu *et al.*, 2004).

1.5 Desórdenes del Desarrollo Sexual (DSD)

En el año 2006 se realizó un consenso en la ciudad de Chicago para la redefinición y manejo de los “desórdenes intersexuales” en el cual se sugirió realizar un cambio en los términos de este grupo de padecimientos, por lo cual se designó usar el término: “desórdenes del desarrollo sexual” (Lee et al., 2006). Los desórdenes del desarrollo sexual (DSD) pueden definirse como: “condiciones congénitas que resultan en una discordancia entre el sexo genético, gonadal o anatómico” (Krishnan y Wisniewski, 2014).

Este grupo de desórdenes son altamente heterogéneos e incluyen fenotipos clínicos como hipospadias (extrapolación del meato uretral, 1 de cada 250 niños), genitales ambiguos (1 de cada 4500 nacidos vivos) y reversión completa del sexo XX o XY (1 en 20,000 nacimientos) (Eggers et al., 2016).

La incidencia de este desorden sexual es variable en los diferentes grupos étnicos, por ejemplo, se ha calculado en 1 de cada 5000 nacimientos con genitales ambiguos por año en Alemania y en 1 en 2500 en algunas poblaciones árabes. La razón de esto puede reflejar las tasas más altas de consanguinidad o endogamia en algunas comunidades que pueden resultar en la expresión de rasgos recesivos. Sin embargo, los genitales ambiguos se han reportado que ocurren en aproximadamente 1:4500 nacimientos. En más del 80% de los casos, los bebés afectados se crían como niños y tienen un cariotipo XY presuntivo o confirmado. Los DSD 46,XY incluyen 46,XY con disgenesia gonadal completa o parcial (errores en la determinación del testículo), subvirilización o submasculinización de un varón XY debido a defectos en la síntesis o acción de andrógenos. Los DSDS 46,XX incluyen disgenesia gonadal, sobrevirilización o masculinización de un individuo XX debido al exceso de andrógenos (Bashamboo et al., 2017).

Los DSDs son el resultado de alteraciones genéticas en cualquiera de los genes involucrados en el desarrollo del sexo durante la embriogénesis (Krishnan y Wisniewski, 2014). Actualmente se ha sugerido emplear una clasificación para los DSD de la siguiente manera (Tabla 1): A) **DSD asociados a los cromosomas sexuales**, que comprende trastornos cromosómicos como el síndrome de Klinefelter 47,XXY, síndrome de Turner 45X, disgenesia gonadal mixta (MGD) 45X/46XY y ovo-testículo tipo quimera o mosaicismo 46XX/46XY; B) **DSD 46,XY** (anteriormente descrito como pseudohermafroditismo masculino), comprende desordenes del desarrollo testicular, desordenes en la síntesis o acción de los andrógenos y C) **DSD 46,XX** (anteriormente referido como pseudohermafroditismo femenino o masculinización de un individuo XX) que comprende desordenes en el desarrollo de ovario o exceso de producción de andrógenos durante el periodo fetal (Hughes, 2008; Ocal, 2011; Mouriquand et al., 2016; Witchel, 2018).

Múltiples genes nuevos y vías metabólicas han sido identificados en los últimos años y se han asociado con alteraciones en la diferenciación sexual de la gónada masculina de humanos. Algunos de estos genes y condiciones clínicas son: la deficiencia de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (*STAR*, OMIM #201710), deficiencia de la enzima que rompe la cadena lateral del colesterol P450 (*CYP11A1*, OMIM #613743), deficiencia de 17-hidroxilasa/17,20 liasa (*CYP17A1*, OMIM #202110), deficiencia de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (*HSD3B2*, OMIM #201810), deficiencia de 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (*HSD17B3*, OMIM #264300), deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 (*SRD5A2*, OMIM #264600) y síndrome de insensibilidad a los andrógenos (*NR3C4*, OMIM #300068).

Tabla (1) Clasificación de los desórdenes del desarrollo sexual (Tomado y modificado de Ocal, 2011; Witchel, 2017).

<i>Cromosomas sexuales DSD</i>	<i>DSD 46,XY</i>	<i>DSD 46,XX</i>
A: 46,X (síndrome de Turner y variantes)	<p>A: Desordenes del desarrollo testicular</p> <ul style="list-style-type: none"> • Disgenesia gonadal completa • Disgenesia gonadal parcial • Regresión gonadal • DSD Ovotesticular 	<p>A: Desordenes del desarrollo ovárico</p> <ul style="list-style-type: none"> • DSD Ovotesticular • DSD testicular (SRY+, dup SOX9) • Disgenesia gonadal
B: 47,XXY (síndrome de Klinefelter y variantes)		
C: 45,X y 46,XY disgenesia gonadal mixta	<p>B: Desordenes en la síntesis o acción de andrógenos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Defectos en la biosíntesis de andrógenos: deficiencia de 5α-reductasa, • Mutaciones en el receptor de andrógenos como CAIS, PAIS • Deficiencia de 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa como AKR1C2 y AKR1C3 	<p>B: Exceso de andrógenos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Deficiencia de 21-hidroxiilasa • Deficiencia de 11-hidroxiilasa • Deficiencia de aromatasa placentar • Virilización del luteoma • Exposición a andrógenos
D: 46,XX/46,XY quimeras		
	<p>C: Otras alteraciones en genitales externos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipospadias severas • Criptorquidia • Síndromes de persistencia de los conductos Mülllerianos • Asociadas a algunas ginecomastias 	<p>C: Otras causas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atresia vaginal • Otros síndromes

Específicamente para este trabajo los DSD 46,XY son anomalías en el desarrollo gonadal que se caracterizan cuando el individuo afectado posee un cariotipo 46,XY y gónadas masculinas, cuando llegan a estar presentes (testículos); pero presentan genitales externos ambiguos o de aspecto femenino en un amplio rango de características y fenotipos. En casos severos, se presenta un fenotipo completamente femenino y genitales externos con apariencia totalmente femenina (Ramos et al., 2018). Este fenotipo puede ser causado por mutaciones en las proteínas que son requeridas para la formación de T, incluyendo a todos los genes relacionados con la formación de andrógenos en las distintas vías (Witchel, 2017). Asimismo, se consideran como DSD 46,XY a las alteraciones en el gen que codifica para la enzima 5 α -reductasa tipo 2 (*SRD5A2*), en este DSD la T no puede transformarse hacia DHT durante el periodo fetal debido a mutaciones que disminuyen su actividad catalítica. Afecta a individuos masculinos 46,XY que al nacimiento presentan genitales externos ambiguos, fenotípicamente poseen pseudovagina, microfalo, criptorquidia e hipospadias (Vilchis et al., 2003; Vilchis et al., 2010).

Otro DSD 46,XY es el síndrome de insensibilidad a andrógenos (AIS). El síndrome afecta únicamente a individuos masculinos y es debido a mutaciones en el AR que interfieren con su mecanismo de acción, por tanto la T y la DHT no pueden unirse efectivamente a su receptor y de esta manera desencadenar un desarrollo normal en estructuras genitales internas y externas; además de una diversidad de fenotipos sexuales femeninos. Son tres las formas reconocidas de AIS: 1) **síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos (CAIS)**, poseen testículos intra-abdominales de tamaño normal, presentan genitales externos femeninos con una vagina terminada en un fondo ciego con vestigios derivados de ductos Wolffianos, tienen desarrollo completo de glándula mamaria y no poseen vello axilar y púbico; 2) **el síndrome de insensibilidad parcial a los andrógenos (PAIS)**, se presenta

como un fenotipo predominantemente masculino con hipospadias severas o un fenotipo mayormente femenino con ginecomastia, clitoromegalia y genitales ambiguos; 3) **en la forma más simple (MAIS)**, el efecto fenotípico varía dependiendo del tipo y lugar de la mutación para afectar la actividad del AR, fenotípicamente solo presentan ginecomastia (Ramos et al., 2018). Avances en el escaneo genético han permitido el análisis detallado de esta malformación congénita y determinar las causas de los DSDs (Ono y Harley, 2013). Sin embargo, aún con estos ensayos muchas de las causas de DSDs siguen siendo desconocidas y los estudios posteriores son realizados con la finalidad de poder brindar a los individuos afectados un diagnóstico preciso y un asesoramiento genético adecuado.

Para el desarrollo de este proyecto en particular se definen únicamente a las hipospadias y se comprenden como una malformación al nacimiento en varones. Se caracterizan por una fusión incompleta de los pliegues uretrales produciendo una abertura anormal en la uretra en varios grados desde simples hasta severas y diferentes grados de curvatura en el pene (van der Host y de Wall, 2017). Las hipospadias son la segunda causa más común de desórdenes congénitos masculinos después del criptoquidismo (un mal descenso en los testículos), pero es la malformación congénita de pene más común. Su incidencia en México es de 3 a 8 individuos por cada 1000 niños nacidos vivos (Donaire y Mendez, 2018). La clasificación estándar de las hipospadias está basado en la ubicación del meato uretral: distal o proximal. Esta clasificación es variante, aunque el 70% de las hipospadias se encuentran comúnmente en la posición glanular (distal), mientras que el resto se considera severa o grave además de complejo. La causa exacta de este padecimiento es aún desconocida, sin embargo las investigaciones han identificado su probable origen en causas genéticas, endocrinas y probablemente en factores medio ambientales. Asimismo, defectos en el metabolismo de andrógenos, como mutaciones en la enzima 17β -hidroxiesteroide

deshidrogenasa tipo 5 (*AKR1C3*) pueden incrementar el riesgo de generar hipospadias (Bouty et al., 2015; Sordehall et al., 2015; Donaire y Mendez, 2018).

Las evidencias para el papel esencial de la DHT en la diferenciación sexual masculina provienen de la observación de individuos 46,XY con defectos en la 5 α -reductasa 2 y que desarrollan hipospadias con pseudovagina, virilización parcial en estos individuos al nacimiento es generalmente atribuida a la T. En pacientes con deficiencia de 5 α -reductasa 2, la virilización podría también ser parcialmente atribuida a la DHT sintetizada por el testículo fetal a través de la ruta “alternativa” que no requiere 5 α -reductasa 2. En nuestro laboratorio hemos estudiado y caracterizado los genes *NR3C4*, *SRD5A2*, *HSD17B3*, *AKR1C2*, *HSD17B6* y *NR5A1* como causa de DSD 46,XY y diagnóstico de genitales ambiguos en un grupo pacientes mexicanos (Vilchis et al., 2008; Vilchis et al., 2010). Algunos de estos individuos afectados no han sido estudiados correctamente y desafortunadamente algunos de ellos han sido gonadectomizados en la infancia o durante la pubertad cuando aparece la virilización. El diagnóstico de estos pacientes se ha dificultado debido a la variabilidad clínica y a la semejanza existente entre los fenotipos con DSD 46,XY.

JUSTIFICACIÓN

Resultados recientes han demostrado que la vía “backdoor” para la biosíntesis de andrógenos podría ser importante o estar implicada en la diferenciación sexual masculina, esto indica una posible participación de la vía “backdoor” en la formación de DHT. Por lo tanto, en este estudio se realizarán ensayos moleculares para caracterizar mutaciones en el gen *AKR1C3* en pacientes de origen mexicano con cariotipo 46,XY y fenotipificados clínica y únicamente con hipospadias aisladas.

HIPÓTESIS

Si la vía “backdoor” es una de las principales fuentes de esteroides C19-5 α -reducidos durante la embriogénesis, las deficiencias de la actividad enzimática de la 3 α -HSD (oxidativa-reductiva) podría ser una causa de DSD 46,XY debido a la incapacidad de formar 3 α -diol o convertir 3 α -diol a DHT. En consecuencia, estos individuos tendrían un cuadro clínico similar al de los sujetos con síndrome de insensibilidad a andrógenos parcial (PAIS).

OBJETIVO GENERAL

Identificar y determinar mutaciones en el gen *AKRIC3* en individuos con Desordenes del Desarrollo Sexual 46,XY asociados a hipospadias aisladas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Se determinarán mutaciones en la región codificante del gen *AKRIC3* de 25 pacientes 46,XY fenotipificados clínica y exclusivamente con hipospadias aisladas.

Se compararán las substituciones obtenidas con las aldo-ceto reductasas (AKRs) clonadas a la fecha para identificar su porcentaje de identidad y establecer su posible importancia estructural.

Se utilizarán bases de datos para diferenciar la presencia entre posibles polimorfismos y mutaciones del gen *AKRIC3*.

Se utilizarán programas bioinformáticos para predecir la patogenicidad de las mutaciones encontradas y el posible daño funcional.

2. MATERIAL Y METODOS

En este estudio molecular, ningún tipo de prueba se aplicó directamente en los pacientes; es además, un estudio mutacional-comparativo entre casos y controles. Por otro lado este estudio se considera de tipo traslacional, ya que se realizaron estudios en el área clínica para la valoración y manejo de los pacientes, así como en el área básica para el análisis molecular de desórdenes del desarrollo sexual 46,XY con hipospadias aisladas.

El presente estudio fue aprobado por el comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (BRE-2601-19-21-1; Reg. CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20160627) y cumple con el Reglamento de la Ley general de Salud, el cual, se considera de riesgo mínimo ya que para este estudio se tomó una muestra única de 5-10 ml de sangre por punción venosa, el cual es un procedimiento común en examen de diagnóstico rutinario y se realiza en el área clínica bajo consentimiento informado y firmado por los padres de los pacientes que son de edad pediátrica. La historia clínica de cada uno de los pacientes con hipospadias se mantuvo y mantendrá en estricta confidencialidad por parte de los servicios del área clínica del Instituto.

Para este proyecto se utilizó DNA genómico (gDNA) de 25 pacientes mexicanos diagnosticados al nacimiento única y exclusivamente con hipospadias aisladas por parte del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, además se aplicaron estudios moleculares sobre algunos genes (*NR3C4* y *SRD5A2*) causantes de desórdenes del desarrollo sexual 46,XY para excluirlos como causa de hipospadias aisladas específicamente en estos pacientes.

Para el grupo control se incluyeron 100 individuos masculinos de origen mexicano, mayores de 18 años, todos fueron captados en el departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en el periodo 2010 a 2018, con consentimiento informado y firmado para la extracción y uso de su gDNA únicamente con fines de investigación. Estos individuos se consideran sanos por no presentar ningún tipo de desorden del desarrollo sexual 46,XY y ninguna afectación en el aparato genitourinario. Por otro lado, de los 100 individuos control, 50 individuos control fueron usados para el exón 1 y 3, y 100 fueron usados para el exón 2 del gen *AKRIC3*, esto último se hizo con el fin de buscar las 2 variantes encontradas dentro del exón 2 de pacientes con hipospadias ya que solo una variante se encontró en los primeros 50 controles analizados para este exón, de este modo se aseguró la presencia o ausencia de esta variante dentro de un tamizaje molecular en un total 100 individuos control únicamente para el exón 2.

2.1 EXTRACCIÓN DE DNA

Se extrajeron de 5-10 ml de sangre periférica de pacientes y controles. Los 10 ml de sangre periférica se coloca en tubos cónicos de 50 ml con 200 μ L de EDTA 0.5 M pH 8.0. Se mezcló por inversión. Posterior a esto se coloca la muestra sobre hielo y se procedió a llevar a un volumen de 35 ml con una solución de sacarosa-tritón 2X (Sacarosa 0.64 M, Tris-Base 0.02 M, $MgCl_2$ 0.01 M, Tritón 100X al 2% pH 7.6). La muestra se llevó a un volumen final de 50 ml con agua desionizada, estéril y destilada (ddH_2O). La muestra fue colocada sobre hielo durante 10 minutos y se mezcló varias por inversión. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 xg durante 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado fue suspendido en 3 ml de solución de lisis nuclear (Tris-Base 10 mM, NaCl 400 mM, Na_2 EDTA 2 mM pH 8.2), con 108 μ L de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 20% y 100 μ L de proteínasa K (5 mg/ml), se mezcló y se colocó en una incubadora con agitación a 50°C durante un mínimo de 2 horas. El contenido fue transferido a tubos cónicos estériles de 15 mL y se agregó 1 mL de NaCl saturado, se agito vigorosamente durante 15 segundos. Las muestras se centrifugaron a 1000 xg durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a tubos cónicos de 15 mL estériles. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión hasta que el DNA se precipitó. Se extrajo el DNA con una pipeta Pasteur sellada y se procedió a lavar con etanol al 70% durante 30 segundos. Se extrajo el DNA y se dejó secar por 30 segundos a temperatura ambiente. El DNA fue resuspendido en 200 μ L de Tris-EDTA (Tris 1.0 mM, EDTA 0.1 mM) y se mezcló suavemente hasta disolver completamente el DNA. Se dejó disolver el DNA en una incubadora a 37°C durante toda la noche. La pureza y concentración de la muestra fue cuantificada espectrofotométricamente.

2.2 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

Se realizó una PCR de punto final que consistió en una amplificación *in vitro* de una región específica del gen *AKRIC3*, en la que cada región específica de ambas hebras de DNA fueron amplificadas y al final de la reacción se obtuvieron millones de copias de nuestra secuencia de interés. En este caso se realizó un PCR por cada uno de los 9 Exónes que posee el gen *AKRIC3* con oligonucleótidos específicos para amplificar cada región exónica y se muestran a continuación:

Exón	Secuencia de Oligonucleótidos	Temperatura de Alineamiento
1	5' GTAATCTCTGAGGAGAAGCAG 3' 3' AATACGGGTTTCACTTCTACTA5'	60°C
2	5' CCACAGTGATCACCAGATACTAC3' 3' GTCATCTCCACACAATCACAATAAA5'	60°C
3	5' GATTTGCTCAAGCATTTCATTCA3' 3' GACAGCAGAAGCGCAATTT 5'	60°C
4	5' GGTTACAGCTATGAGTGGAGAAA3' 3' CCTATTGAACCTGGGAAACAGA 5'	60°C
5	5' GCAGCCAACCTGCACAAATAA 3' 3' TGAAGAACCGAAAGGAGAGAAG5'	60°C
6	5' TCAGCTTCCTTACTTTTCATCTT 3' 3' GGTTTATGTAAAGGTCCCATTGT 5'	60°C
7	5' CAGCCTTTCTGCCTTTTCCTT3' 3' CAGGAGACCTGAGGCC 5'	60°C
8	5' GGGATTCACAACTGGCAATCTA 3' 3' CTGGTATGGAGGTCCTCTCA 5'	60°C
9	5' CAGCTTCATTGAAATCACTTTACTACTC3' 3' TCCAGTCACCGGCATAGA 5'	60°C

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final utilizada para la técnica SSCP se realizó con los siguientes reactivos y sus respectivos volúmenes para cada uno de los 9 exónes del gen *AKR1C3* como sigue:

Componente para PCR punto final	Vol. Utilizado para 1 reacción
Buffer 5X	5.0 μ L
MgCl ₂ Solucion 25 mM	1.6 μ L
Mix de nucleotidos 10 mM	0.5 μ L
Primer Sentido	0.5 μ L
Primer Antisentido	0.5 μ L
Taq Polimerasa	0.2 μ L
gDNA	1.5 μ L
dCTP ³²	0.3 μ L
DMSO	1.0 μ L
H ₂ Odd	8.9 μ L
Volumen final	20 μ L

2.3 POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA (SSCP)

Una vez analizados los exones del gen *AKR1C3* de los pacientes y controles, se utilizó la técnica de tamizaje molecular SSCP. Todas las muestras fueron analizadas mediante geles de acrilamida a diferentes concentraciones y se prepararon de la siguiente manera: **8% sin glicerol** (36.89 mL de ddH₂O, 14.0 mL de TBE 5X, 18.66 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de PSA 10%, 25 µL de Temed) **8% con glicerol** (29.85 mL de ddH₂O, 7.0 mL de glicerol, 14.0 mL de TBE 5X, 18.66 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de PSA 10%, 25 µL de Temed), **5.4% sin glicerol** (42.91 mL de ddH₂O, 14.0 mL de TBE 5X, 12.6 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de PSA 10%, 24.5 µL de Temed) y **5.4% con glicerol** (35.91 mL de ddH₂O, 7.0 mL de glicerol, 14.0 mL de TBE 5X, 12.6 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de PSA 10%, 24.5 µL de Temed). Se dejó desgasificar por 5 minutos y al término fue agregado el TEMED para su polimerización. El gel de poliacrilamida se dejó polimerizar durante 1 hora y se colocaron en cámaras de electroforesis. Se preparó 1 L de solución de corrida de TBE 0.5X para cada sistema. Para cargar las muestras en los geles, se usó 1 µL de la muestra obtenida de PCR y se le agregaron 14 µL de solución de carga para SSCP (EDTA 20 mM, formamida 95%, azul de bromofenol 0.05%). Las muestras se desnaturalizaron a 94°C durante 5 minutos. Las muestras se colocaron en frío. Las muestras desnaturalizadas fueron colocadas en los geles previamente preparados para realizar la electroforesis. La electroforesis se dejó correr a 200-250 volts durante 12-18 horas. A continuación el gel fue colocado en papel Whatman de 3MM y se colocó en un secador durante 1 hora a 70°C. Las muestras transferidas en el papel fueron expuestas a una pantalla (Molecular Imager FX, Imaging screen-K, BioRad) durante un mínimo de 3 horas para posteriormente ser analizadas en un escáner PMI Personal Molecular Imager BIO-RAD usando el programa QuantityOne 4.6.

2.4 PURIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE ELECTROELUCIÓN

Una vez identificadas las muestras con un patrón de movimiento electroforético diferente, estas fueron amplificadas nuevamente por medio de PCR y visualizadas a través de un gel al 1% de agarosa teñido con Midori Green. Se utilizaron 3 μ L de solución de carga más 5 μ L de muestra de PCR y se colocaron en el gel. Se utilizó nuevamente el *software: Molecular Imager® Chemi Doc™ XRS+ Imaging System with Image Lab™*. Las muestras en el gel fueron analizadas en un transiluminador con UV. Se identificó que el tamaño esperado fuera el correcto y se procedió a cortar y extraer las muestras del gel. Se colocaron las muestras en tubos eppendorf de 1.5 ml. Enseguida se lavaron en membranas de diálisis con ddH₂O y fueron equilibradas con TBE 0.5X. Se colocaron las muestras en las membranas y se adicionó TBE 0.5X hasta cubrir la muestra, esto se hizo dentro de una cámara de electroforesis y se dejó correr a 100 volts durante 15 minutos. Al término de la electroforesis se extrajo el TBE 0.5X de las membranas que contenía el DNA electroeluido.

Las muestras fueron colocadas en columnas *Amicon® Ultra-4* y se agregaron 3 ml de H₂O dd. Se centrifugaron a 1000 xg durante 10 minutos, se eliminó el centrifugado y se extrajo el sobrenadante. Las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos eppendorf de 0.5 ml y analizadas mediante espectrofotometría para medir su integridad y posteriormente se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Midori Green y una solución de carga de TBE 0.5X a 90-110 volts para visualizar su pureza.

2.5 SECUENCIACIÓN

Las muestras purificadas fueron secuenciadas mediante el estuche Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA) y para cada una de las muestras se usó el siguiente protocolo:

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
Big Dye Terminator reaction Mix	2.0 μ L
Big Dye Solution 5X	1.0 μ L
H₂O	5.0 μ L
Primer	1.6 pmol (1.0 μ L)
DNA	5 nanogramos (1.0 μ L)
Volumen final	10 μ L

Después de preparadas las muestras, se procedió a colocarlas en un termociclador Veriti de Applied Biosystems, las condiciones que presentó el programa para esta reacción fueron: 1 ciclo a 95°C por 1 minuto, 35 ciclos a 96°C durante 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 4 minutos, finalmente 1 ciclo a 4°C.

El producto de secuenciación se purificó utilizando 45 μ L de solución SAM y 10 μ L de solución *Big Dye XTerminator*. Se agitaron las muestras durante 30 minutos y se centrifugaron por 2 minutos a 1000 xg en una microcentrífuga. Se obtuvo el sobrenadante y se colocó en tubos limpios.

Se preparó el equipo de secuenciación (*310 Genetic Analyzer ABI PRISM™ Applied Biosystems, Foster City, CA*) y se procedió a colocar todas las muestras dentro del equipo, para secuenciar cada una de ellas en ambos sentidos. Posteriormente se analizaron las secuencias obtenidas para su análisis por medio del software Chromas Lite 2.6.

2.6 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

Para determinar si los genotipos de nuestra población se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, las proporciones genotípicas esperadas se compararon con las frecuencias genotípicas observadas. Para esto utilizamos la siguiente ecuación:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Dónde:

p= la frecuencia del alelo A

q= la frecuencia del alelo a

p²= probabilidad de poseer unos alelos A/A

q² = probabilidad de poseer unos alelos a/a

2pq= probabilidad de ser heterocigoto (A/a)

Se aplicó la ecuación a las frecuencias obtenidas previamente (p y q) para cada uno de los exónes tanto de pacientes como controles. Posteriormente, para evaluar el efecto del azar sobre los valores observados y esperados, se aplicó una prueba de bondad de ajuste de X² (bondad de ajuste de chi-cuadrado) en cada grupo estudiado.

2.7 ANÁLISIS *IN SILICO*

Las variantes identificadas previamente mediante secuenciación fueron comparadas con múltiples bases de datos y la literatura disponible al momento de la realización de este estudio, esto se hizo con la finalidad de obtener una interpretación más profunda y que permitió determinar la patogenicidad de estas variantes determinadas. Para esto se han desarrollado bases de datos que usan algoritmos de predicción, que estiman la probabilidad de las variantes génicas para tener consecuencias deletéreas para la proteína. En este caso se analizaron las variantes encontradas en la región codificante del gen *AKRIC3* y se determinó su probable afectación a la proteína. Los programas utilizados en este estudio fueron MutationTaster2 (<http://www.mutationtaster.org/>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Provean (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php) y SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html).

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS POR PCR

El tamizaje molecular del gen *AKRIC3* en pacientes 46,XY diagnosticados clínica y exclusivamente con hipospadias se inició con la amplificación de la región codificante por PCR-dCTP[α - 32 P], es decir, se obtuvo cada uno de los 9 exones que posee el gen. Los productos de la reacción fueron cargados en geles de agarosa (un gel por cada exón amplificado) junto con un marcador de peso molecular (MPM) para comparar el tamaño de los fragmentos amplificados tanto de pacientes como de sujetos control. Seguido de esto, los productos de reacción fueron sometidos a electroforesis. Los análisis en geles de agarosa indicaron que todos los exones del gen fueron amplificados con especificidad al observar una sola banda y presentaban un tamaño esperado entre 200 y 250 pb. La figura 8 muestra una electroforesis representativa para los 9 exones amplificados del gen *AKRIC3*.

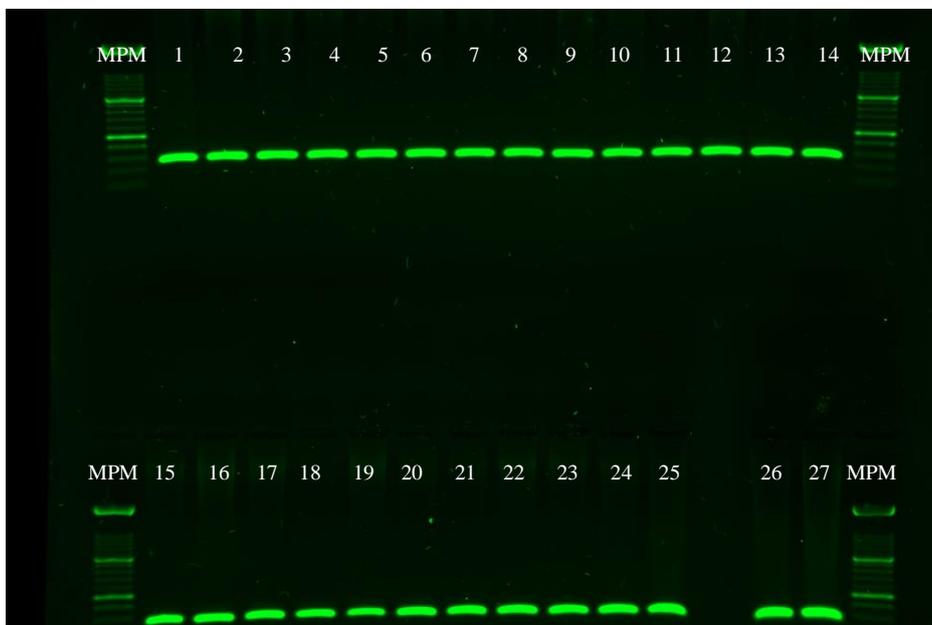


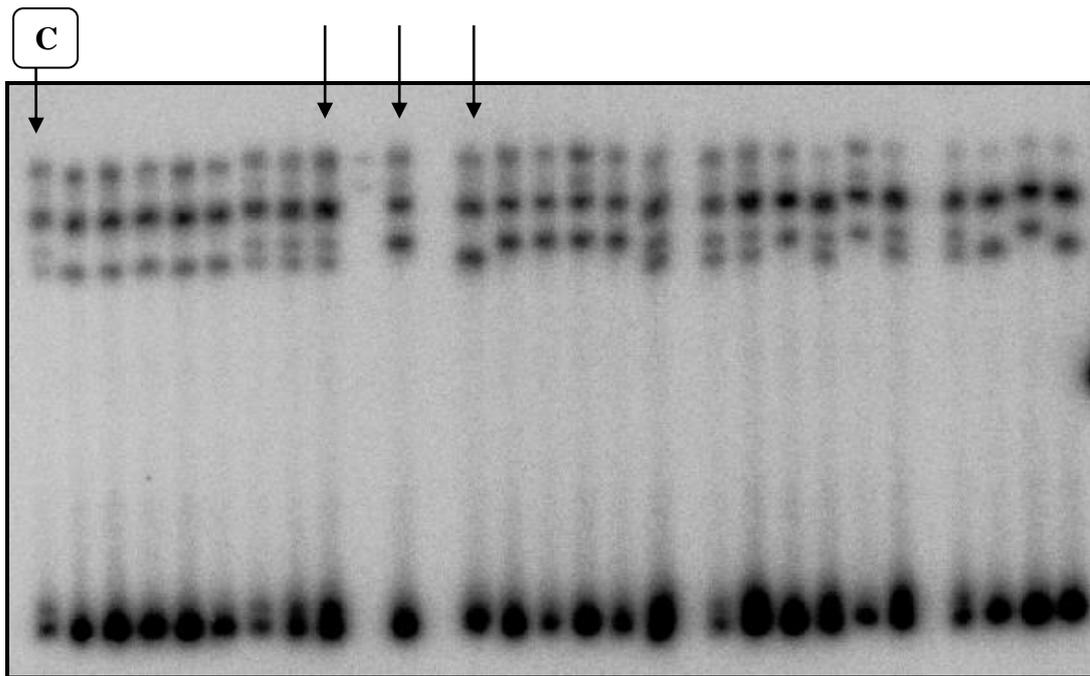
Fig. 8. Figura representativa de uno de los exones del gen *AKRIC3*. En la imagen se muestra el exón 2. Los números indican las muestras amplificadas de sujetos control (1-27).

3.2 TAMIZAJE MOLECULAR POR SSCP

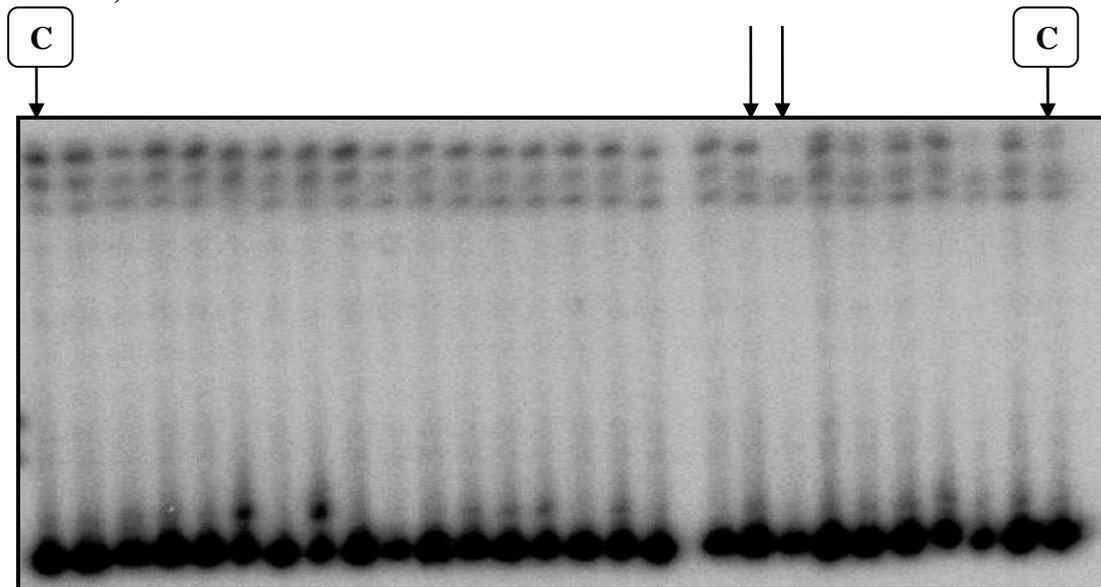
Posterior a la amplificación por PCR se procedió a la realización del tamizaje molecular del gen *AKRIC3* por la técnica de SSCP. Los productos de PCR amplificados fueron cargados en geles de poliacrilamida y se sometieron a electroforesis. Para cada exón se prepararon cuatro concentraciones diferentes de poliacrilamida como se describe en la metodología y cada uno de los pacientes fue tamizado en cada uno de los sistemas. Esto se realizó para cada uno de los 9 exones del gen *AKRIC3*, obteniendo un total de 36 sistemas para el análisis de este gen. Las concentraciones usadas para los geles han sido estandarizadas en nuestro laboratorio, con lo cual en alguno de los cuatro sistemas se puede visualizar mejor el patrón de migración de las muestras, además, un grupo de 50 individuos sanos se usaron como controles y fueron sometidos a las mismas condiciones que las muestras para cada uno de los exones del mismo gen.

Por medio de la técnica de SSCP se pudo observar un patrón de migración variable en los exones 1, 2 y 3 del gen *AKRIC3* a 5.4% sin glicerol, 8% con glicerol y 5.4% con glicerol respectivamente (Fig. 9). El patrón de migración electroforética variable fue determinado y comparado con el patrón de movilidad que presentaron los controles (Fig. 10).

A) Exón 1



B) Exón 2



C) Exón 3

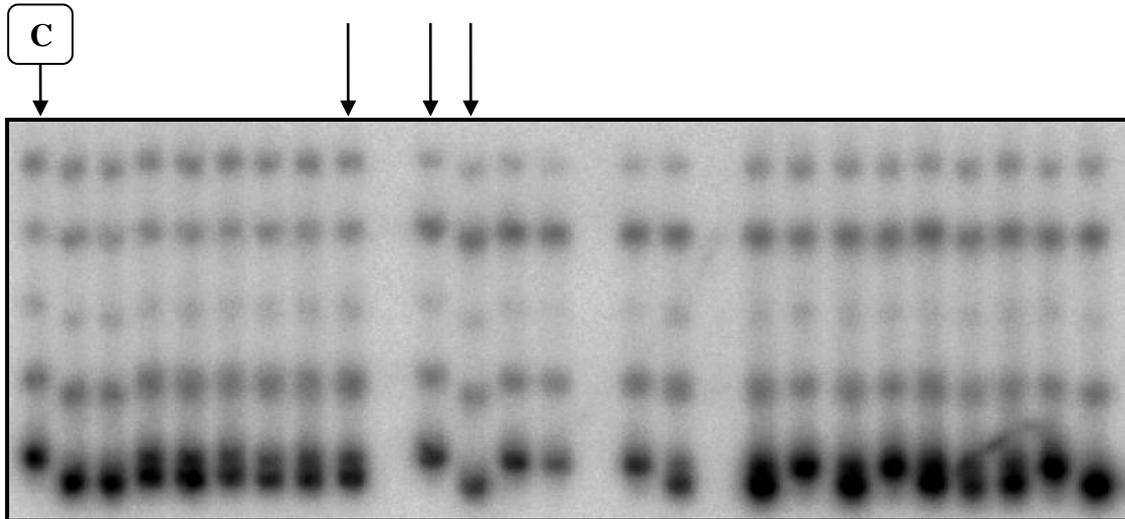
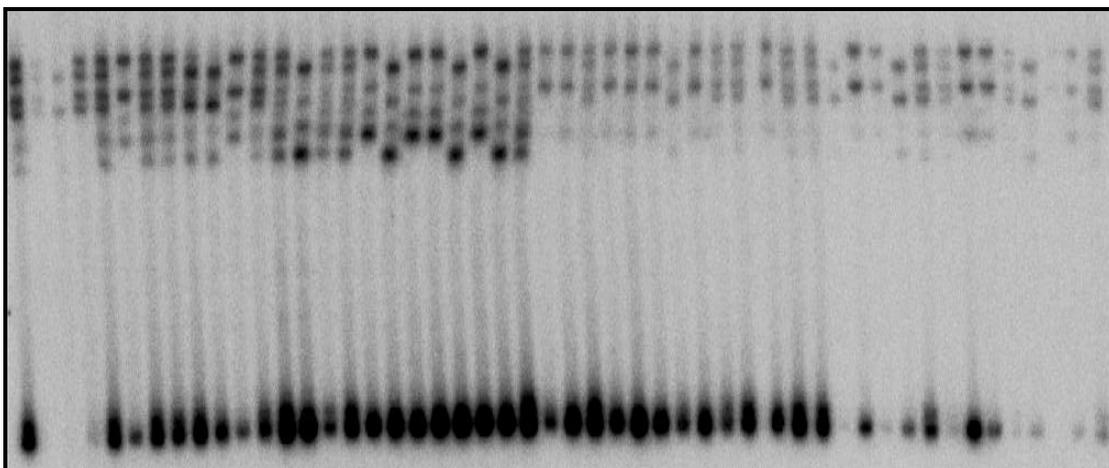


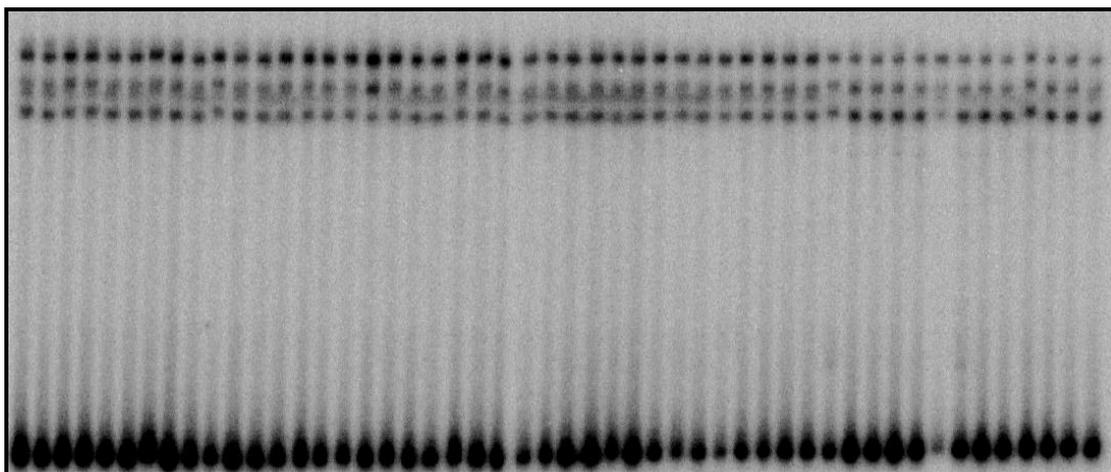
Fig. 9. Patrón de migración de los exones 1, 2 y 3 del gen *AKR1C3* en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol (A), 8% con glicerol (B) y 5.4% con glicerol (C), respectivamente. Los pacientes con hipospadias aisladas fueron tamizados y comparados con individuos control. Los pacientes con un patrón electroforético variable se muestran con una flecha, adicionalmente se encontraron tres diferentes patrones de migración electroforética en el exón 1 (A), dos patrones en el exón 2 (B) y tres patrones para el exón 3 (C), a cada extremo de los geles se le colocó un control (marcado con la letra “C”).

Con los resultados obtenidos en pacientes 46,XY con hipospadias, se decidió realizar el análisis de genotipificación mediante SSCP a un grupo de 50 individuos (exones 1 y 3) y 100 individuos (exón 2) para confirmar la existencia de las variantes en la población mexicana. Los resultados mostraron patrones de migración electroforética diferentes en los exones 1, 2 y 3 en individuos control similar a lo encontrado para los pacientes (Fig. 13).

D) Exón 1 controles



E) Exón 2 controles



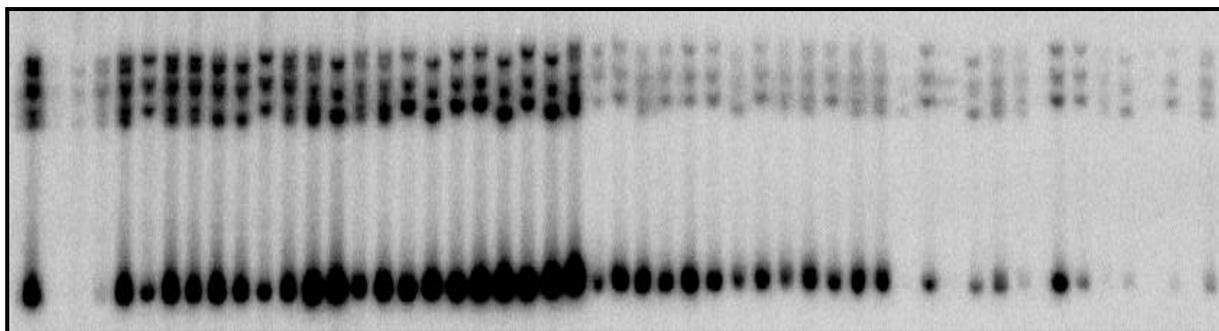
F) Exón 3 controles

Fig. 13. Las imágenes muestran tres geles de poliacrilamida utilizando la misma concentración para los pacientes donde se encontraron variantes, 5.4% sin glicerol (D), 8% con glicerol (E) y 5.4% con glicerol (F), respectivamente.

3.4. ANÁLISIS GENOTÍPICO Y ALÉLICO

Una vez identificados los genotipos de cada exón en ambos grupos (pacientes y controles), se calculó la frecuencia genotípica, para esto, se sumó la cantidad de individuos que poseían el mismo genotipo y se dividió entre el número total de individuos en la muestra (n), como se describe en la tabla 2. De igual modo se calcularon las frecuencias alélicas a partir de las frecuencias genotípicas de acuerdo a las siguientes formulas:

Tabla 2. Formulas usadas para calcular frecuencias genotípicas y alélicas encontradas.

Frecuencias genotípicas	Frecuencias alélicas
$f(AA) = \text{número de individuos } AA/n$ $f(Aa) = \text{número de individuos } Aa/n$ $f(aa) = \text{número de individuos } aa/n$	$p = f(AA) + \frac{1}{2} f(Aa)$ $q = f(aa) + \frac{1}{2} f(Aa)$

Dónde:

n= número total de individuos en la muestra

p= frecuencia alélica del alelo A

AA= homocigoto del alelo A

q= frecuencia alélica del alelo a

aa= homocigoto del alelo a

Aa= heterocigoto

Los resultados de las frecuencias alélicas de los 25 pacientes con hipospadias mas los 50 individuos (exones 1 y 3) y 100 individuos (exón 2) control son mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Frecuencias alélicas para las variantes de *AKRIC3* asociadas con hipospadias aisladas y controles sanos en nuestro grupo estudiado. Para el exón 1 (c.15C>G) y para el exón 3 (c.312G>A) solo se utilizaron 50 controles.

Gen	Variantes	Alelo	Función	% Hipospadias		% Controles	
				(n=25)	(n=100)	(n=50)	(n=50)
				Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica
<i>AKRIC3</i>	Exón 1 c.15C>G	C/C	No	28 (7)	p= 0.46	22 (11)	p= 0.42
		G/G	sinónima	36 (9)	q=0.54	38 (19)	q= 0.58
		C/G		36 (9)		40 (20)	
	Exón 2 c.230A>G	A/A	No	80 (20)	p= 0.9	71 (71)	p= 0.84
		G/G	sinónima	ND	q= 0.1	2 (2)	q= 0.155
		A/G		20 (5)		27 (27)	
	Exón 3 c.312G>A	G/G	Sinónima	12 (3)	p= 0.38	4 (2)	p=0.17
		A/A		36 (9)	q=0.62	70 (35)	q= 0.83
		G/A		52 (13)		26 (13)	

En los resultados obtenidos del análisis de frecuencia para ambos grupos (pacientes y controles) observamos que en la variante c.15C>G del exón 1, el genotipo con menor frecuencia fue el genotipo silvestre C/C y siendo de mayor frecuencia el genotipo G/G en ambos grupos; esto también se ve reflejado en sus respectivas frecuencias alélicas donde ocurrió lo mismo. El alelo C se presentó en menor proporción y el alelo G se presentó en mayor frecuencia aunque en proporción muy cercanas entre sí.

Para la variante c.230A>G del exón 2, el genotipo A/A silvestre se mantuvo en mayor proporción en comparación con los genotipos A/G y G/G siendo este último el menos frecuente en la población control y ausente en la población de pacientes con hipospadias. En

cuanto a sus frecuencias alélicas, éstas estuvieron muy cercanas entre sí, siendo el alelo A el más frecuente o tipo silvestre.

Por otro lado, los resultados para la variante c.312G>A del exón 3 mostraron una frecuencia genotípica mayor en el genotipo G/A comparada con el genotipo G/G, siendo este último el genotipo con menor frecuencia tanto en controles como en pacientes. Además la frecuencia alélica mostró que el alelo A se presentó en mayor frecuencia que el alelo G (alelo de tipo silvestre).

3.5 ANÁLISIS DE EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

Se determinó que ambos grupos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ya que el resultado fue no significativo ($P > 0.05$), con estos datos podemos sugerir que los genotipos se encuentran estables y el resumen de los datos se muestra en las siguientes tablas.

AKRIC3 Exón 1

Población	Variante	Número de muestras	gl	X^2	Probabilidad	Significancia
Control	c.15C>G	50	1	2.34	≈ 0.1	ns
Hipospadias	c.15C>G	25	1	1.499	≈ 0.2	ns

ns= no significativo

gl= grados de libertad

AKRIC3 Exón 2

Población	Variante	Número de muestras	gl	X^2	Probabilidad	Significancia
Control	c.230A>G	100	1	0.092	≈ 0.75	ns
Hipospadias	c.230A>G	25	1	0.308	≈ 0.60	ns

ns= no significativo

gl= grados de libertad

AKRIC3 Exón 3

Población	Variante	Número de muestras	gl	X^2	Probabilidad	Significancia
Control	c.312G>A	50	1	0.352	≈ 0.55	ns
Hipospadias	c.312G>A	25	1	1.95	≈ 0.15	ns

ns= no significativo

gl= grados de libertad

3.6. PREDICCIÓN *IN SILICO*

Una vez identificadas las variantes génicas y de aminoácidos, se realizaron los análisis *in silico* para predecir y determinar la patogenicidad de las alteraciones encontradas en el gen *AKR1C3* que codifica la proteína 3 α -HSD 2/17 β -HSD 5, se compararon con las bases de datos y diferentes algoritmos de predicción.

Los resultados obtenidos para la variante p.H5Q en el programa MutationTaster2 predijeron únicamente un polimorfismo sin ninguna afectación a la proteína, de igual forma el programa PolyPhen-2 predijo ese cambio como benigno. Provean marco la variante como neutra y SIFT por su parte indicó ese cambio como tolerado. Esto nos indica que esta variante muy probablemente y de acuerdo a los programas bioinformáticos no afectaría la función de la proteína (tabla 1).

La variante p.E77G en el programa MutationTaster2 marcó como un polimorfismo esta variante, de igual manera el programa PolyPhen-2 nos indicó un resultado benigno, sin embargo el programa Provean marca este cambio como deletéreo con lo cual es probable una afectación a la proteína. De forma similar el programa SIFT nos predijo un cambio con probable daño a la proteína (tabla 1).

Por otro lado para los resultados de los análisis *in silico* para la variante (p.K104=) no se identificó ningún tipo de cambio en la proteína debido a que la substitución no afecto la secuencia de aminoácidos para esta. De este modo, casi todos los programas bioinformáticos no predijeron algún tipo de daño a la proteína excepto en el programa SIFT que nos predijo un probable daño (tabla 6).

Tabla 6. Cuadro comparativo de las cuatro bases de datos consultadas para el análisis *in silico* de las variantes encontradas en los exones del gen *AKR1C3*.

Variantes	Mutation Taster2	PolyPhen-2	Provean	SIFT
p.H5Q	Polimorfismo	Benigna	Neutral	Tolerada
p.E77G	Polimorfismo	Benigna	Deletérea	Probable Daño
p.K104=	Polimorfismo	Benigna	Neutral	Probable Daño

4 DISCUSIÓN

Durante el desarrollo embrionario masculino, los andrógenos desempeñan un papel importante en la diferenciación sexual. Múltiples genes son requeridos en etapas tempranas del desarrollo embrionario para actuar sobre la biosíntesis de hormonas esteroides androgénicas y lograr la activación del AR. Los esteroides con 19 átomos de carbono como T y DHT originan un correcto desarrollo de los genitales internos y externos. Así, la diferenciación sexual masculina es inducida por la formación del complejo al AR-DHT, esta unión desencadena una serie de eventos genéticos y fisiológicos que culminaran en la diferenciación de las estructuras sexuales masculinas externas (escroto, pene, uretra y desarrollo prostático) en el humano durante la vida fetal (Patrao et al., 2009; Witchel., 2017).

La producción de DHT se realiza mediante la vía “*clásica*” donde la T es usada como principal intermediario. Sin embargo, se ha reportado otra vía en donde la T no es utilizada para la producción de DHT y se ha denominado vía “*backdoor*”. En esta vía intervienen una serie de enzimas (*AKRIC2-4*, *HSD17B6*, *SRD5A1*) que pudieran participar en el correcto desarrollo sexual masculino (Auchus, 2004; Biason et al., 2013; Fukami et al., 2013). Una de las enzimas participantes en la “*backdoor*” es codificada por el gen *AKRIC3* (Rizner y Penning, 2014), miembro de la familia de las aldo-ceto reductasas. Debido a que se han descrito individuos con DSD 46,XY que presentan mutaciones en el gen *AKRIC2* (Fluck et al., 2011; Miller y Auchus, 2011; Biason-Lauber et al., 2013), alteraciones en el gen *AKRIC3* podrían estar asociadas a DSD 46,XY durante el periodo fetal, ya que la enzima interviene en los últimos pasos del metabolismo para la producción de DHT dentro de la vía “*backdoor*” (Penning, 2000; Fluck et al., 2011; Miller y Auchus 2011; Biason-Lauber et al., 2013; Achermann et al., 2015). Actualmente no existen estudios específicos sobre el gen *AKRIC3*

en individuos 46,XY con DSD asociados a hipospadias, por ello en este estudio se realizó el tamizaje molecular de las regiones exónicas del gen *AKRIC3* en 25 individuos con hipospadias por medio de geles de poliacrilamida seguido de secuenciación Sanger.

Los resultados determinaron variantes genotípicas en tres de los exones del gen *AKRIC3* (exones 1, 2 y 3). Las variantes fueron observadas tanto en los 50 individuos sanos como en los 25 individuos con DSD 46,XY asociados a hipospadias. De acuerdo a los resultados obtenidos en el exón 1, la variante c.15C>G generó el cambio de Histidina (CAC) por Glutamina (CAG). El alelo C/G (heterocigoto) aparece con una frecuencia muy similar a la proporción del alelo G/G en ambas poblaciones dejando en menor cantidad al alelo C/C que es el alelo silvestre, con lo cual podemos sugerir que el alelo G se podría estar fijando dentro de la población; sin embargo mediante el cálculo del equilibrio Hardy-Weinberg se pudo demostrar que este alelo se encuentra en equilibrio así que la reproducción no podría ser un factor que esté actuando en estos individuos, por lo que se sugiere que otros mecanismos son los que probablemente estén actuando para producir el aumento y la disminución de las frecuencias de los alelos.

Para la variante p.E77G localizada en el exón 2 del gen *AKRIC3* se mostró un cambio c.230A>G donde el triplete (GAA) que codifica para un ácido glutámico cambió por (GGA) una Glicina. Las proporciones alélicas muestran que el alelo A/A, que es el tipo silvestre, se presentó en mayor proporción en ambos grupos, el alelo heterocigoto A/G tuvo una proporción menor pero el alelo G/G estuvo ausente en el grupo de pacientes y solo dos individuos en el grupo control. De acuerdo al resultado del análisis de Hardy-Weinberg el alelo A/A se mantiene fijo en la población estudiada y es el alelo dominante.

Para el exón 3 del gen *AKR1C3* la variante c.312G>A en el que el triplete original AAG cambia por AAA, el cambio de nucleótido no cambio el aminoácido transcrito que es una lisina (p.K104=) la cual resulta ser sinónima, además el alelo G/G de tipo silvestre fue el alelo que en menor proporción se presentaba en ambas poblaciones, en cambio el alelo A/G (heterocigoto) se presentó en una mayor proporción en pacientes; no así en los controles, en la cual fue el alelo A/A el de mayor proporción solo en el grupo control; esto nos sugiere que el alelo (A/A) se comienza a fijar dentro de la población aunque el análisis de equilibrio nos muestra un resultado no significativo con lo cual podemos decir que este cambio no resulta ser consecuencia de la reproducción y al igual que en el exón 1, la selección natural parece ser un proceso involucrado en el cambio de frecuencia alélica en esta posición.

Un polimorfismo puede ser equilibrado, de modo que en una población se pueden poseer y mantener dos o más variantes con frecuencias de equilibrio más o menos estables y de esta manera la selección natural puede ser causante de este mecanismo biológico. Por otro lado, un polimorfismo también puede ser transitorio y puede estar en una etapa entre el origen de una variante útil y su fijación en la población por selección natural cuya eficacia biológica de fenotipos y genotipos variantes puede desplazarse en sentido positivo o en sentido negativo. Esto de acuerdo a la capacidad de los seres vivos de tolerar cambios genéticos como respuesta a presiones de su medio ambiente.

Se ha reportado que ciertos polimorfismos en el gen *AKR1C3* pueden influenciar en el riesgo de ciertas enfermedades andrógeno-dependientes (Jakobsson et al., 2007). De acuerdo a la literatura, la variante c.15C>G esta descrita con la clave **rs12529** y se ha reportado que está asociada a cáncer de vejiga ya que puede contribuir significativamente a esta patogénesis ya que el alelo G/G muestra incremento de riesgo a este tipo de cáncer, mientras que el riesgo

decrece con el alelo C/C. Por otro lado, existe una asociación entre este polimorfismo en población china asociada a un incremento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón para el alelo G/G. Un estudio más fue hecho en cáncer de próstata y no se halló asociación entre este polimorfismo y esta patología (Milivojevic et al., 2014; Karunasinghe et al., 2016; Tiryakioglu y Tunali, 2016).

Por otro lado la variante polimórfica del exón 2 (c.230A>G; p.E77G) esta reportada con la clave **rs11551177** y ha sido asociada a bajos niveles significativos en la concentración de T libre en suero en población masculina sueca pero esta asociación no fue encontrada en población coreana ya que en esta población no se encontró la variante; en este estudio se hizo una comparación de cinética enzimática entre el alelo A/A y el alelo A/G del gen *AKR1C3* en población Sueca, donde se encontró que esta variante afecta moderadamente la eficiencia de la enzima en cuanto a la reducción del sustrato androsterona para producir 3 α -diol, aunque tuvo una significancia mayor al reducir 4-diona a T (Jakobsson et al., 2007).

La variante del exón 3 (c.G>A; p.K104=) ha sido reportada en la literatura en esa posición específica con la nomenclatura **rs12387** y se ha reportado un estudio con este polimorfismo asociado a cáncer de pecho en mujeres que han usado terapia combinada de estrógenos-progesterona (Reding et al., 2009).

Si bien los polimorfismos de una sola variante (SNPs) se encuentran en un porcentaje mayor al 1% dentro de una población, estos son muy frecuentes y la mayoría tienen poco impacto sobre la salud; sin embargo existen pruebas sobre ciertas variantes que causan efectos en el fenotipo. Además, los SNPs podrían tener un impacto en la susceptibilidad a ciertas enfermedades ya que estas substituciones pueden presentarse en todas las regiones de un gen,

como ejemplo en una región codificante para un aminoácido (variante no sinónima) de una proteína que pueda generar un mal plegamiento de la proteína, cambio de polaridad, fosforilación inadecuada entre otras consecuencias funcionales (Wang et al., 2005).

Aunque la variante c.312 G>A es de tipo silenciosa y se considere neutral, este tipo de variantes pueden llegar a afectar la expresión génica por el cambio de secuencia del RNA, un ejemplo sería un cambio en la estructura secundaria que pueda influir en la transcripción, el procesamiento o un cambio de codones sinónimos requieran un tipo de respuesta de un RNA de transferencia diferente, de tal modo que se vea afectada la eficiencia de la traducción, incluso se propone que ligeros cambios en el plegamiento del mRNA y la actividad biológica se puede ver afectada, esto podría conllevar a la sobreproducción de proteínas o a su producción insuficiente. Esto se ha asociado con repercusiones para la manifestación de enfermedades humanas.

De acuerdo a lo obtenido en los análisis *in silico* por los programas bioinformáticos para el exón 1 en ninguno de los programas se describe algún tipo de daño a la proteína provocada por su respectiva variante. Sin embargo para el exón 2 los programas Provean y SIFT sugieren una afectación a la proteína marcándolo como “deletérea” y “probable daño” respectivamente para la variante encontrada, de igual modo el resultado del programa SIFT para el exón 3 predijo un probable afectación. De acuerdo a la literatura los residuos de aminoácidos (Tyr24, Leu54, Tyr55, Trp86, His117, Ser118, Pro119, Met120, Ser129, Asn167, Phe306, Ser308, Ser310, Phe311, Tyr317, Pro318, y Try319) de la proteína (3 α -HSD2/17 β -HSD5) forman una cavidad elíptica en el dominio C-terminal, además se ha determinado que los residuos Phe306 y Trp227 juegan un papel clave en el reconocimiento del sustrato, también se encontró que los residuos Tyr24, Asp50, Ser166, Asn167, Gln190

entre otros, adecuan la estructura de la enzima para el correcto reconocimiento al sitio de unión al cofactor NADPH (Qui et al., 2004), por lo anterior podemos comprobar que las variantes encontradas no afectan ningún aminoácido clave para la enzima en las posiciones descritas.

En nuestro estudio las variantes encontradas en el gen *AKRIC3* no parecen ser una causa de DSD 46,XY asociadas a hipospadias. Asimismo, nuestros datos dejan en claro que las alteraciones en el gen *AKRIC3* carecen de participación en la diferenciación de la uretra masculina; no obstante, aún faltan estudios para otras enzimas de la familia AKRs que pudieran estar implicadas en la diferenciación sexual de la uretra masculina y que juegan papeles clave en la producción de DHT como el gen *AKRIC4* (Fluck et al., 2011; Bignon-Lauber et al., 2013). Otro posible candidato es la enzima 17 β -HSD tipo 3 producida por el gen *HSD17B3* que se ha descrito posee la misma actividad 17 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa que la enzima producida por *AKRIC3* (Mendoca et al., 2016).

Recientemente se ha demostrado que la expresión sexualmente dimórfica del gen *Mafb* podría regular la masculinización de la formación uretral embrionaria en ratones (Suzuki et al., 2014). Nosotros contemplamos la probabilidad de asociar al gen *MAFB* de humanos como otro candidato involucrado para el desarrollo de hipospadias mediante la búsqueda de mutaciones en pacientes 46,XY DSD.

Aún no se han elucidado con claridad ciertos mecanismos implicados en determinadas enfermedades humanas causantes de desórdenes del desarrollo sexual, a pesar del avance en herramientas bioquímicas y en biología molecular ciertas patologías aún no pueden ser identificadas con técnicas como citogenética clásica o con perfiles hormonales, por ello la

investigación en diagnóstico molecular por aporte de nuevas herramientas a la biología molecular pueden mejorar el entendimiento y manejo de estos desordenes y esclarecer la causa exacta de tales padecimientos.

5 CONCLUSIONES

Se lograron identificar variantes en los primeros tres exones del gen *AKRIC3*, todas fueron determinadas como SNP's en los 25 pacientes 46,XY diagnosticados y fenotipificados con hipospadias aisladas. No se identificaron mutaciones o substituciones con daño patogénico.

De acuerdo a los análisis moleculares y estudios *in silico* obtenidos para el gen *AKRIC3*, los estudios comparativos entre los pacientes con hipospadias y controles sanos demostraron que poseen los mismos polimorfismos no patogénicos con lo que podemos sugerir la ausencia de asociación entre las hipospadias y las substituciones identificadas en el gen *AKRIC3* en la vía "backdoor".

Los datos obtenidos en este estudio nos sugieren que es poco probable determinar o identificar un daño estructural y funcional de la enzima producida por el gen *AKRIC3* que pudiera estar asociado a hipospadias.

Los SNP's encontrados en este gen presentan escasa participación en el desarrollo sexual masculino de la uretra durante el periodo fetal y por consiguiente son una causa improbable de hipospadias en nuestro grupo estudiado.

PERSPECTIVAS

Los estudios reportados en este trabajo no descartan la posibilidad que otros genes pudieran estar implicados en el desarrollo de hipospadias; un ejemplo podría ser el gen *AKRIC4*. Al respecto, el papel fisiológico del gen *AKRIC4* durante el desarrollo uretral masculino es desconocido. Recientemente, el gen *Mafb* ha sido asociado a la formación uretral en embriones de ratón, lo cual sugiere que muy probablemente podría estar implicado en el desarrollo de hipospadias en humanos.

6. REFERENCIAS

- Achermann, J. C., Domenice, S., Bachega, T. A., Nishi, M. Y., & Mendonca, B. B. (2015). Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Endocrinol*, 11(8), 478-488. doi: 10.1038/nrendo.2015.69
- Arango, N. A., Lovell-Badge, R., & Behringer, R. R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Cell*, 99(4), 409-419.
- Armstrong, J. F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W. A., Hastie, N. D., & Bard, J. B. (1993). The expression of the Wilms' tumour gene, *WT1*, in the developing mammalian embryo. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mech Dev*, 40(1-2), 85-97.
- Auchus, R. J. (2004). The backdoor pathway to dihydrotestosterone. [Review]. *Trends Endocrinol Metab*, 15(9), 432-438. doi: 10.1016/j.tem.2004.09.004.
- Bashamboo, A., Eozenou, C., Rojo, S., and McElreavey, K. (2017) Anomalies in human sex determination provide unique insights into the complex genetic interactions of early gonad development, *Clinical genetics* 91, 143-156.
- Biason-Lauber, A., Miller, W. L., Pandey, A. V., & Fluck, C. E. (2013). Of marsupials and men: "Backdoor" dihydrotestosterone synthesis in male sexual differentiation. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Mol Cell Endocrinol*, 371(1-2), 124-132. doi: 10.1016/j.mce.2013.01.017
- Bouty, A., Ayers, K. L., Pask, A., Heloury, Y., & Sinclair, A. H. (2015). The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. [Review]. *Sex Dev*, 9(5), 239-259. doi: 10.1159/000441988

- Capel, B. (1998). Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Annu Rev Physiol*, 60, 497-523. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.497
- Chamary, J. V., Parmley, J. L., & Hurst, L. D. (2006). Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Genet*, 7(2), 98-108. doi: 10.1038/nrg1770
- Donaire, A. E., & Mendez, M. D. (2018). *Hypospadias StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Dufort, I., Rheault, P., Huang, X. F., Soucy, P., & Luu-The, V. (1999). Characteristics of a highly labile human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Endocrinology*, 140(2), 568-574. doi: 10.1210/endo.140.2.6531
- Eggers, S., & Sinclair, A. (2012). Mammalian sex determination-insights from humans and mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Chromosome Res*, 20(1), 215-238. doi: 10.1007/s10577-012-9274-3.
- Eggers, S., Sadedin, S., van den Bergen, J. A., Robevska, G., Ohnesorg, T., Hewitt, J., Lambeth, L., Bouty, A., Knarston, I. M., Tan, T. Y., Cameron, F., Werther, G., Hutson, J., O'Connell, M., Grover, S. R., Heloury, Y., Zacharin, M., Bergman, P., Kimber, C., Brown, J., Webb, N., Hunter, M. F., Srinivasan, S., Titmuss, A., Verge, C. F., Mowat, D., Smith, G., Smith, J., Ewans, L., Shalhoub, C., Crock, P., Cowell, C., Leong, G. M., Ono, M., Lafferty, A. R., Huynh, T., Visser, U., Choong, C. S., McKenzie, F., Pachter, N., Thompson, E. M., Couper, J., Baxendale, A., Gecz, J., Wheeler, B. J., Jefferies, C., MacKenzie, K., Hofman, P., Carter, P., King, R. I., Krausz, C., van Ravenswaaij-Arts, C. M., Looijenga, L., Drop, S., Riedl, S., Cools, M., Dawson, A., Juniarto, A. Z., Khadilkar, V., Khadilkar, A., Bhatia, V., Dung, V. C., Atta, I., Raza, J., Thi Diem Chi, N., Hao, T. K., Harley, V., Koopman, P., Warne, G., Faradz, S., Oshlack, A., Ayers, K. L., & Sinclair, A. H. (2016). Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort, *Genome biology* 17, 243.

- Ellegren, H. (2008). Comparative genomics and the study of evolution by natural selection. [Review]. *Mol Ecol*, 17(21), 4586-4596. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03954.x
- Fluck, C. E., Meyer-Boni, M., Pandey, A. V., Kempna, P., Miller, W. L., Schoenle, E. J., & Biason-Lauber, A. (2011). Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Hum Genet*, 89(2), 201-218. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.06.009
- Fluck, C. E., & Pandey, A. V. (2014). Steroidogenesis of the testis -- new genes and pathways. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 75(2), 40-47. doi: 10.1016/j.ando.2014.03.002
- Fukami, M., Homma, K., Hasegawa, T., & Ogata, T. (2013). Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. [Review]. *Dev Dyn*, 242(4), 320-329. doi: 10.1002/dvdy.23892
- Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *J Clin Oncol*, 20(13), 3001-3015. doi: 10.1200/JCO.2002.10.018.
- Gobinet, J., Poujol, N., & Sultan, C. (2002). Molecular action of androgens. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Mol Cell Endocrinol*, 198(1-2), 15-24.
- Hannema, S. E., & Hughes, I. A. (2007). Regulation of Wolffian duct development. *Hormone Research*, 67, 142-151, doi:10.1159/000096644 (2007).
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Endocr Rev*, 23(2), 175-200. doi: 10.1210/edrv.23.2.0460
- Hughes, I. A. (2001). Minireview: sex differentiation. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Endocrinology*, 142(8), 3281-3287. doi: 10.1210/endo.142.8.8406

- Hughes, I. A. (2008). Disorders of sex development: a new definition and classification. [Review]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22(1), 119-134. doi: 10.1016/j.beem.2007.11.001
- Hughes, I. A., Houk, C., Ahmed, S. F., & Lee, P. A. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol*, 2(3), 148-162. doi: 10.1016/j.jpuro.2006.03.004
- Jakobsson, J., Palonek, E., Lorentzon, M., Ohlsson, C., Rane, A., & Ekstrom, L. (2007). A novel polymorphism in the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (aldo-keto reductase 1C3) gene is associated with lower serum testosterone levels in caucasian men. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Pharmacogenomics J*, 7(4), 282-289. doi: 10.1038/sj.tpj.6500419
- Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M., & Penning, T. M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Biochem J*, 326 (Pt 3), 625-636.
- Jost, A. (1970). Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. [Review]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 259(828), 119-130.
- Karunasinghe, N., Zhu, Y., Han, D. Y., Lange, K., Zhu, S., Wang, A., . . . Ferguson, L. R. (2016). Quality of life effects of androgen deprivation therapy in a prostate cancer cohort in New Zealand: can we minimize effects using a stratification based on the aldo-keto reductase family 1, member C3 rs12529 gene polymorphism? *BMC Urol*, 16(1), 48. doi: 10.1186/s12894-016-0164-4
- Keays, M. A., & Dave, S. (2017). Current hypospadias management: Diagnosis, surgical management, and long-term patient-centred outcomes. [Review]. *Can Urol Assoc J*, 11(1-2Suppl1), S48-S53. doi: 10.5489/cuaj.4386
- Khanna, M., Qin, K. N., Wang, R. W., & Cheng, K. C. (1995). Substrate specificity, gene structure, and tissue-specific distribution of multiple human 3 alpha-hydroxysteroid

- dehydrogenases. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Biol Chem*, 270(34), 20162-20168.
- Kobayashi, A., Shawlot, W., Kania, A., & Behringer, R. R. (2004). Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Development*, 131(3), 539-549. doi: 10.1242/dev.00951
- Kofman-Alfaro, S., Merchant-Larios, H., & Perez-Palacios, G. (1982). [Sexual differentiation. I. Biological basis of sexual dimorphism]. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Rev Invest Clin*, 34(4), 349-359.
- Krishnan, S., & Wisniewski, A. B. (2014). Ambiguous Genitalia in the Newborn. In L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer & A. Vinik (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth (MA).
- Lee, P. A., Houk, C. P., Ahmed, S. F., & Hughes, I. A. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. [Consensus Development Conference Practice Guideline Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Pediatrics*, 118(2), e488-500. doi: 10.1542/peds.2006-0738
- Luu-The, V. (2013). Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions. [Review]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 137, 176-182. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.05.017
- Mahendroo, M., Wilson, J. D., Richardson, J. A., & Auchus, R. J. (2004). Steroid 5alpha-reductase 1 promotes 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol synthesis in immature mouse testes by two pathways. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Mol Cell Endocrinol*, 222(1-2), 113-120. doi: 10.1016/j.mce.2004.04.009
- Matsumoto, AM., Bremner WJ. (2011). Testicular disorders. In: Williams textbook of endocrinology. Melmed S, et al; editors. 12th ed. Philadelphia: Saunders. 688-777.

- Mellon, S. H., and Griffin, L. D. (2002). Neurosteroids: biochemistry and clinical significance, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 13, 35-43.
- Mendonca, B. B., Gomes, N. L., Costa, E. M. F., Inacio, M., Martin, R. M., Nishi, M. Y., ... Domenice, S. (2017). 46,XY disorder of sex development (DSD) due to 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.002>
- Milivojevic, V., Feinn, R., Kranzler, H. R., & Covault, J. (2014). Variation in *AKR1C3*, which encodes the neuroactive steroid synthetic enzyme 3 α -HSD type 2 (17 β -HSD type 5), moderates the subjective effects of alcohol. [Randomized Controlled Trial Research Support, N.I.H., Extramural]. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(17), 3597-3608. doi: 10.1007/s00213-014-3614-2
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. [Review]. *Endocr Rev*, 32(1), 81-151. doi: 10.1210/er.2010-0013
- Mouriquand, P. D., Gorduza, D. B., Gay, C. L., Meyer-Bahlburg, H. F., Baker, L., Baskin, L. S., . . . Lee, P. (2016). Surgery in disorders of sex development (DSD) with a gender issue: If (why), when, and how? [Review]. *J Pediatr Urol*, 12(3), 139-149. doi: 10.1016/j.jpuro.2016.04.001
- Ocal, G. (2011). Current concepts in disorders of sexual development. [Review]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 3(3), 105-114. doi: 10.4274/jcrpe.v3i3.22
- Ono, M., & Harley, V. R. (2013). Disorders of sex development: new genes, new concepts. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Endocrinol*, 9(2), 79-91. doi: 10.1038/nrendo.2012.235
- Parker, K. L., & Schimmer, B. P. (1997). Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Endocr Rev*, 18(3), 361-377. doi: 10.1210/edrv.18.3.0301

- Parma, P., & Radi, O. (2012). Molecular mechanisms of sexual development. [Review]. *Sex Dev*, 6(1-3), 7-17. doi: 10.1159/000332209
- Patrao, M. T., Silva, E. J., & Avellar, M. C. (2009). Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 53(8), 934-945.
- Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Endocr Rev*, 25(6), 947-970. doi: 10.1210/er.2003-0030
- Penning, T. M., Burczynski, M. E., Jez, J. M., Hung, C. F., Lin, H. K., Ma, H., . . . Ratnam, K. (2000). Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Biochem J*, 351(Pt 1), 67-77.
- Penning, T. M., Burczynski, M. E., Jez, J. M., Lin, H. K., Ma, H., Moore, M., . . . Palackal, N. (2001). Structure-function aspects and inhibitor design of type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Mol Cell Endocrinol*, 171(1-2), 137-149.
- Penning, T. M., Chen, M., & Jin, Y. (2015). Promiscuity and diversity in 3-ketosteroid reductases. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 151, 93-101. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.12.003
- Penning, T. M., Jin, Y., Steckelbroeck, S., Lanisnik Rizner, T., & Lewis, M. (2004). Structure-function of human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: genes and proteins. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Mol Cell Endocrinol*, 215(1-2), 63-72. doi: 10.1016/j.mce.2003.11.006

- Qin, K., & Rosenfield, R. L. (2005). Characterization of the basal promoter element of the human type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. [Comparative Study Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Biochim Biophys Acta*, 1728(3), 115-125. doi: 10.1016/j.bbaexp.2005.01.015
- Qiu, W., Zhou, M., Labrie, F., & Lin, S. X. (2004). Crystal structures of the multispecific 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5: critical androgen regulation in human peripheral tissues. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mol Endocrinol*, 18(7), 1798-1807. doi: 10.1210/me.2004-0032
- Quigley, C. A., De Bellis, A., Marschke, K. B., el-Awady, M. K., Wilson, E. M., & French, F. S. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Endocr Rev*, 16(3), 271-321. doi: 10.1210/edrv-16-3-271
- Ramos, L., Chavez, B., Mares, L., Valdes, E., & Vilchis, F. (2018). Mutational analysis of the androgen receptor (NR3C4) gene in patients with 46,XY DSD. *Gene*, 641, 86-93. doi: 10.1016/j.gene.2017.10.038
- Reding, K. W., Li, C. I., Weiss, N. S., Chen, C., Carlson, C. S., Duggan, D., . . . Malone, K. E. (2009). Genetic variation in the progesterone receptor and metabolism pathways and hormone therapy in relation to breast cancer risk. [Research Support, N.I.H., Extramural].
- Rey, R., Josso, N., & Racine, C. (2000). Sexual Differentiation. In L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer & A. Vinik (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth (MA).
- Rizner, T. L., & Penning, T. M. (2014). Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't [Review]. *Steroids*, 79, 49-63. doi: 10.1016/j.steroids.2013.10.012.

- Rosenfeld, C. S. (2017). Brain Sexual Differentiation and Requirement of SRY: Why or Why Not?, *Frontiers in neuroscience* 11, 632.
- Sauna, Z. E., Kimchi-Sarfaty, C., Ambudkar, S. V., & Gottesman, M. M. (2007). Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. [Research Support, N.I.H., Intramural Review]. *Cancer Res*, 67(20), 9609-9612. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2377.
- Shang, Y., Myers, M., & Brown, M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Mol Cell*, 9(3), 601-610.
- Simard, J., Ricketts, M. L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, F. A., & Melner, M. H. (2005). Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. [Review]. *Endocr Rev*, 26(4), 525-582. doi: 10.1210/er.2002-0050.
- Soderhall, C., Korberg, I. B., Thai, H. T., Cao, J., Chen, Y., Zhang, X., . . . Nordenskjold, A. (2015). Fine mapping analysis confirms and strengthens linkage of four chromosomal regions in familial hypospadias. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Eur J Hum Genet*, 23(4), 516-522. doi: 10.1038/ejhg.2014.129.
- Suzuki, K.; Numata, T.; Suzuki, H.; Raga, D. D.; Ipulan, L. A.; Yokoyama, C.; Matsushita, S.; Hamada, M.; Nakagata, N.; Nishinakamura, R.; Kume, S.; Takahashi, S.; Yamada, G., Sexually dimorphic expression of *Mafb* regulates masculinization of the embryonic urethral formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, 111 (46), 16407-12.
- Tiryakioglu, N. O., & Tunali, N. E. (2016). Association of *AKR1C3* Polymorphisms with Bladder Cancer. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Urol J*, 13(2), 2615-2621.

- Val, P., & Swain, A. (2010). Gene dosage effects and transcriptional regulation of early mammalian adrenal cortex development. [Review]. *Mol Cell Endocrinol*, 323(1), 105-114. doi: 10.1016/j.mce.2009.12.010
- Van de Wijngaart DJ, Dubbink HJ, van Royen ME, Trapman J, Jenster G (2012) Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove, *Mol Cell Endocrinol* 352: 57-69.
- Van der Horst, H. J., & de Wall, L. L. (2017). Hypospadias, all there is to know. [Review]. *Eur J Pediatr*, 176(4), 435-441. doi: 10.1007/s00431-017-2864-5
- Vilchis, F., Ramos, L., Kofman-Alfaro, S., Zenteno, J. C., Mendez, J. P., & Chavez, B. (2003). Extreme androgen resistance in a kindred with a novel insertion/deletion mutation in exon 5 of the androgen receptor gene. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Hum Genet*, 48(7), 346-351. doi: 10.1007/s10038-003-0036-0
- Vilchis, F., Ramos, L., Mendez, J. P., Benavides, S., Canto, P., & Chavez, B. (2010). Molecular analysis of the SRD5A2 in 46,XY subjects with incomplete virilization: the P212R substitution of the steroid 5 α -reductase 2 may constitute an ancestral founder mutation in Mexican patients. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Androl*, 31(4), 358-364. doi: 10.2164/jandrol.109.009407
- Vilchis, F., Valdez, E., Ramos, L., Garcia, R., Gomez, R., & Chavez, B. (2008). Novel compound heterozygous mutations in the SRD5A2 gene from 46,XY infants with ambiguous external genitalia. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Hum Genet*, 53(5), 401-406. doi: 10.1007/s10038-008-0274-2
- Wang, X., Tomso, D. J., Liu, X., & Bell, D. A. (2005). Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. [Review]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 207(2 Suppl), 84-90. doi: 10.1016/j.taap.2004.09.024

- Whitfield, G. K., Jurutka, P. W., Haussler, C. A., & Haussler, M. R. (1999). Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. [Review]. *J Cell Biochem, Suppl* 32-33, 110-122.
- Wilhelm, D., & Englert, C. (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Genes Dev*, 16(14), 1839-1851. doi: 10.1101/gad.220102
- Wilhelm, D., Palmer, S., & Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Physiol Rev*, 87(1), 1-28. doi: 10.1152/physrev.00009.2006
- Wilson, C. A., & Davies, D. C. (2007). The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. [Review]. *Reproduction*, 133(2), 331-359. doi: 10.1530/REP-06-0078
- Wilson, J. D., Auchus, R. J., Leihy, M. W., Guryev, O. L., Estabrook, R. W., Osborn, S. M., . Renfree, M. B. (2003). 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol is formed in tammar wallaby pouch young testes by a pathway involving 5alpha-pregnane-3alpha,17alpha-diol-20-one as a key intermediate. [Research Support, Non-U.S. Gov't [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Endocrinology*, 144(2), 575-580. doi: 10.1210/en.2002-220721
- Witchel, S. F. (2018). Disorders of sex development. [Review]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 48, 90-102. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.11.005
- Yao, H. H., Whoriskey, W., & Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Genes Dev*, 16(11), 1433-1440. doi: 10.1101/gad.981202