



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES GENÉTICAS Y  
GENÓMICAS EN PACIENTES CON DESORDENES DEL  
DESARROLLO SEXUAL

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

NAYELLI NAJERA GARCIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:  
DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCIA

COMITÉ TUTOR:  
DRA. NORMA ANGELICA MORENO MENDOZA  
DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **NÁJERA GACÍA NAYELLI** con número de cuenta **96505348** con la tesis titulada: **"IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES GENÉTICAS Y GENÓMICAS EN PACIENTES CON DESORDENES DEL DESARROLLO SEXUAL"** realizada bajo la dirección de : **DRA. GLORIA E. QUEIPO GARCÍA**

Presidente: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO  
Vocal: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA  
Secretario: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE  
Suplente: DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR  
Suplente: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de agosto de 2011

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

- A los financiamientos:

Proyecto PAPIIT IN205608

Proyecto CONACYT SALUD-2009-01- 115440

- A los Miembros de mi Comité Tutorial:

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Dr. Diego Julio Arenas Aranda.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue realizado en el Servicio de Genética del Hospital General de México - Facultad de Medicina, UNAM a cargo de la Dra. Susana Kofman Epstein.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Tutora, la Dra. Gloria Queipo

A la M en C Esmeralda Lira Romero

**DEDICATORIAS**

*A Oscar y Sahid, mis dos grandes amores.*

*A mis papis*

*A mis M&Ms y a Metz*

## INDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
ANTECEDENTES .....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
OBJETIVOS .....	21
SUJETOS DE ESTUDIO .....	22
MATERIAL Y MÉTODO .....	30
RESULTADOS .....	36
DISCUSIÓN .....	43
CONCLUSIONES .....	46
REFERENCIAS .....	47
ARTÍCULO .....	54

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Bloqueo en la vía de esteroidogénesis secundario a defectos en *CYP17A1*

**Figura 2.** Bloqueo en la vía de esteroidogénesis secundario a defectos en *CYP11B1*

**Figura 3.** Árbol genealógico del caso 1

**Figura 4.** Árbol genealógico del caso 2

**Figura 5.** Árbol genealógico del caso 3

**Figura 6.** Árbol genealógico del caso 4

**Figura 7.** Árbol genealógico del caso 5

**Figura 8.** Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP17A1*. Paciente II.5, Caso 1.

**Figura 9.** Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP17A1*. Paciente II.1, Caso 3.

**Figura 10.** Inmunohistoquímica para detectar la proteína codificada por el gen *CYP17A1*.  
Controles

**Figura 11.** Inmunohistoquímica para detectar la proteína codificada por el gen *CYP17A1*.  
Paciente II.1, Caso 3.

**Figura 12.** Inmunohistoquímica para detectar 3 $\beta$ -HSD. Paciente II.1, Caso 3.

**Figura 13.** Electroferograma de la secuencia del gen *CYP11B1*. Pacientes III.3 y III.10. Caso 4.

**Figura 14.** Electroferograma de la secuencia del gen *CYP11B1*. Pacientes II.1 y II.2. Caso 5.

## RESUMEN

Los desórdenes de la diferenciación sexual en pacientes 46,XX y 46,XY, que se da en la etapa de diferenciación fenotípica y que se relaciona con la síntesis o acción de los andrógenos provoca condiciones de ambigüedad genital asociado o no a síndrome adrenogenital así como amenorrea primaria e hipertensión arterial en la adolescencia. Este grupo de trastornos se caracterizan por presentar una buena correlación genotipo-fenotipo, sin embargo, la incidencia, el abordaje, el diagnóstico y el manejo en estos trastornos no son homogéneos, siendo la biología molecular una herramienta diagnóstica fundamental. El objetivo de este trabajo fue realizar el estudio molecular de las formas no clásicas de Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC). Se estudiaron 3 casos afectados con deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20 liasa y 3 casos con deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa, a los que se les extrajo DNA de linfocitos. Se realizó secuenciación automatizada de los genes *CYP17A1* y *CYP11B1*, respectivamente. Se identificaron 3 nuevas mutaciones en el gen *CYP17A1*: S288X y K110X/R362H y 2 más en el gen *CYP11B1*: C4791T y 3467<sup>^</sup>3468 ins ACAGTACACCA. Las mutaciones identificadas en este trabajo y el antecedente de la procedencia de las familias, sugiere un efecto fundador en los Estados de Oaxaca y Chiapas. Finalmente, se demostró la viabilidad del diagnóstico molecular prenatal como una herramienta que permita aplicar el tratamiento adecuado y oportuno.

## ABSTRACT

Sex differentiation disorders present in 46,XX y 46,XY patients, originated in phenotypic differentiation and related to the androgens roll or synthesis, causes genital ambiguity associated or not to androgential syndrome as well as primary amenorrhea and hypertension in adolescence. This group of disorders is characterized by a good genotype-phenotype correlation, however, The incidence, approach, diagnosis and management of these disorders are not homogeneous, being molecular biology an essential diagnostic tool. The object of the present work was the molecular study of nonclassical forms of congenital adrenal hyperplasia (HSC). Three cases affected by deficiency of 17 $\alpha$ -hidroxilase/17,20 liase and 3 cases with deficiency of 11 $\beta$ -hidroxilase were studied; all of them got DNA extracted from lymphocytes. Automated sequencing was performed on genes *CYP17A1* y *CYP11B1*. Three new mutations were identified for genes *CYP17A1*: S288X and K110X/R362H and 2 more in *CYP11B1* gene: C4791T y 3467<sup>^</sup>3468 ins ACAGTACACCA. Mutations found in this work and history of the families story, suggest a founder effect in the states of Oaxaca and Chiapas. Finally, feasibility of prenatal molecular diagnosis was proved as a tool allowing to apply the proper and timely treatment.

## ANTECEDENTES

Desde los insectos hasta los mamíferos se presentan hembras XX y machos XY, sin embargo, los mecanismos de determinación sexual son muy diferentes entre estos organismos. En mamíferos la determinación sexual es estrictamente cromosómica y no se ve influenciada por el ambiente como en algunas especies de reptiles.

El dimorfismo sexual en humanos es consecuencia de una serie de eventos que se presentan en etapas tempranas del desarrollo embrionario y que requieren un alto grado de precisión en los mecanismos que lo regulan. La determinación sexual en mamíferos se basa en el control de la cascada génica que se presenta en las gónadas; éstas participan directamente para establecer el fenotipo sexual, a través de la producción de hormonas.

El desarrollo sexual en mamíferos, incluyendo al humano, se describe como un programa ordenado y secuencial que se lleva a cabo en tres etapas: 1) establecimiento del sexo cromosómico, 2) diferenciación gonadal y 3) diferenciación fenotípica. Así, anomalías en cualquiera de estas tres etapas conducen a una serie de patologías cuyo análisis ha permitido entender mejor el proceso de la determinación y la diferenciación sexual normal.

*Etapa Cromosómica.* En los mamíferos, el sexo cromosómico queda determinado en el momento de la fertilización en la que un óvulo, el cual contiene un cromosoma X, es fecundado por un espermatozoide portador ya sea de un cromosoma X, o bien de un cromosoma Y. En el primer caso el embrión con dos cromosomas X tendrá la información necesaria para el desarrollo de una hembra (sexo homogamético) mientras que en el segundo caso, el embrión XY, para un macho (sexo heterogamético).

La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada indiferenciada, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma del individuo (Ford, 1959).

*Diferenciación gonadal.* El mecanismo que determina el sexo fenotípico es puesto en marcha en el momento de la morfogénesis gonadal. La presencia del factor determinante testicular, el gen *SRY*, es fundamental para el desarrollo de los testículos, ya que activa la cascada génica necesaria para la diferenciación del testículo a partir de la gónada indiferenciada (o cresta genital), mientras que en la ausencia del gen *SRY* se desarrolla un ovario.

El papel del *SRY* durante la determinación sexual gonadal, ha sido demostrado en genotipos XX donde la presencia del *SRY* genera el progreso fenotípico del macho. En éste, la proteína obtenida por transcripción del gen *SRY* induce la expresión de una cascada de genes, cuyo resultado final será la diferenciación de la gónada indiferenciada en testículo (Koopman, 1990), el cual a su vez inducirá mediante las hormonas que secreta, la diferenciación de los conductos sexuales que llevará a la diferenciación fenotípica de los órganos sexuales internos y externos. Si el gen *SRY* no está presente, el individuo se desarrollará como hembra, por un mecanismo que parece estar predeterminado en las células gonadales (Capel, 2000).

Algunos de los genes que se han descrito que participan en esta etapa son: *LIM1*, *SF1* y *WT1*, entre otros.

### *Determinación sexual.*

El primordio gonadal se desarrolla como testículo por acción del gen *SRY* conocido como Factor Determinante Testicular (FDT), localizado en el cromosoma Y; en ausencia de este gen, el primordio gonadal evoluciona hacia ovario de manera pasiva (Sinclair *et al.*, 1990).

Aun cuando el esquema molecular de la determinación sexual en mamíferos no ha sido dilucidado totalmente se sabe que los genes *SRY* y *SOX9* son fundamentales para el inicio de la determinación testicular, mientras que *DAX1* (Bardoni *et al.*, 1994), *WT1* (Kriedberg, 1993), *LIM1* (Kobayashi *et al.*, 2004), *SF1* (Morohasi *et al.*, 1993), *GATA4* y *FOG2* (Tevosian *et al.*, 2002) son considerados como los genes principales responsables de conducir la morfogénesis y la diferenciación testicular (Hanley *et al.*, 2000).

En el humano, en los embriones 46,XY los cordones sexuales de la gónada indiferenciada proliferan hasta la octava semana. Los cordones testiculares, pierden contacto con la superficie del epitelio celómico y comienzan a separarse por una reorganización de tejido conectivo característico del testículo. Se observa migración de células mioides y endoteliales a partir del mesonefros hacia la gónada, que más tarde formará la túnica albugínea (Martineau *et al.*, 1997; Capel *et al.*, 1999; Tilmann *et al.*, 1999). Las células tipo epitelial que conforman los cordones testiculares se denominan células pre-Sertoli y una vez que comienzan a producir y secretar hormona inhibidora de los conductos Mülllerianos (HIM) se les llaman células de Sertoli. La producción de HIM es el primer producto hormonal del testículo fetal y es necesaria para la regresión de los conductos Mülllerianos, primordio de los genitales femeninos internos (Petersen *et al.*, 2001). De acuerdo con Scherer (2002) las células de Sertoli son necesarias en la

espermatogénesis debido a que proporcionan nutrientes y factores de crecimiento para el desarrollo de las células germinales (Petersen *et al.*, 2006).

***SRY (Sex-determining Region on the Y chromosome)***. Este gen fue descrito en 1990, se localiza en la region distal del brazo corto del cromosoma Y (Berta *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990) y actúa sobre las células del epitelio celómico promoviendo su proliferación (Schmahl *et al.*, 2000) y en las células de soporte, dirigiendo su diferenciación hacia células de Sertoli (Palmer and Burgoyne, 1991; Hanley *et al.*, 2000).

La proteína es codificada por un gen formado por un solo exón con un dominio central altamente conservado llamado caja HMG que tiene actividad de unión y plegado de DNA por lo que funciona como factor de transcripción.

Mutaciones en *SRY* han sido identificadas en pacientes con Desordenes de la Diferenciación sexual (DSD) XY, sin embargo, solo sucede en el 10-15% de los casos (Berta *et al.*, 1990; Hawkins *et al.*, 1992).

En contraparte, pacientes con DSD 46,XX con desarrollo testicular han sido descritos que acarrean translocaciones de *SRY* del cromosoma Y al X (Fechner *et al.*, 1993; Zenteno-Ruiz *et al.*, 2001; Dominice *et al.*, 2004). Para explicar el desarrollo testicular en ausencia de *SRY*, se ha postulado que alteraciones en algún otro gen, que actúe cascada abajo de *SRY* puede suplir la función de este gen e iniciar el desarrollo testicular (McElreavey *et al.*, 1993).

El candidato fue *SOX9*.

**SOX9 (SRY-related HMG box 9)**. Este gen se ubica en 17q24.3-q25.1. Mutaciones en **SOX9** se asocian a pacientes con displasia campomélica, una enfermedad que se caracteriza por malformaciones esqueléticas asociadas, en el 75% de los pacientes con DSD XY (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994).

**SOX9** al igual que **SRY** pertenece a la familia de los genes **SOX (SRY-type HMG BOX)** que codifican para factores de transcripción con dominio HMG con afinidad por las secuencias **AACAAT** y **AACAAAG** (Koopman, 1999; Harley *et al.*, 2003).

Estudios de expresión en ratones muestran que **Sox9** está presente en bajos niveles, en las crestas genitales de ambos sexos alrededor de los 11.5 días post coito (*dpc*), dicha expresión se inhibe en la gónada XX y aumenta en la gónada XY, implicando a las células de Sertoli como el sitio de expresión. Por lo tanto este gen juega un papel importante en la determinación sexual, inmediatamente después de la expresión de **SRY** (Da Silva M *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 1996).

Se sabe, que en el ratón, uno de los efectos más tempranos de **SRY** es inducir la sobre expresión del gen **Sox9** en el desarrollo gonadal (Sekido *et al.*, 2004).

La prueba de la importancia de **SOX9** como factor determinante testicular, la obtuvieron Vidal *et al.*, en el 2001, luego de expresar este gen de manera ectópica en gónadas XX, demostrando que **Sox9** es suficiente para inducir la formación testicular en ratones aún en ausencia de **SRY**.

En humanos, se conoce un solo caso de DSD testicular XX, **SRY** negativo y con duplicación de la banda 17q23-24 donde se localiza **SOX9** (Huang *et al.*, 1999), aunque no existen más casos en nuestra especie con este fenómeno.

Las evidencias que existen hasta el momento respecto a la función de SOX9 señalan la importancia de la dosis génica durante el proceso de diferenciación sexual.

**Etapa fenotípica.** En la tercera etapa, la diferenciación fenotípica es consecuencia de la acción ejercida por las hormonas secretadas por el testículo fetal. El mecanismo que lleva a cabo este dimorfismo en los mamíferos fue descrito originalmente por Alfred Jost (1973), quién demostró el papel fundamental de la testosterona en la diferenciación fenotípica al extirpar tempranamente las gónadas fetales de conejos XX y XY y observando diferenciación fenotípica femenina independientemente del sexo cromosómico (Grumbach *et al.*, 1998).

El desarrollo completo del fenotipo masculino es secundario a la formación testicular, el cual produce dos hormonas: la primera, la Hormona Inhibidora de los conductos Mülllerianos (HIM) promueve la involución de los conductos Mülllerianos durante la 6ª y 8ª semana de gestación concluyendo en la semana 11. Esta hormona, es una glicoproteína secretada por las células de Sertoli del testículo fetal (Behringer *et al.*, 1994) que actúa a través de un receptor transmembranal, localizado en las células del mesénquima adyacentes a los conductos mülllerianos. (Baarends *et al.*, 1994). Inmediatamente después de iniciada la síntesis de la HIM, las células intersticiales del testículo fetal se diferencian en células de Leydig, que poco más tarde secretará Testosterona (T) (Federman, 2006). La T ejerce su efecto virilizante sobre los conductos Wolffianos, que se diferencian en epidídimo, vasos eferentes, vesícula seminal y conducto eyaculador. La T es precursor de una tercera hormona fetal virilizante, la dihidrotestosterona (DHT), ésta se forma en las células blanco por la acción de la 5-alfa reductasa tipo II extragonadal y es el mediador intracelular de la gran mayoría de las acciones de los andrógenos, esta hormona es la única responsable del desarrollo de los genitales externos

masculinos y de la próstata (Mendez *et al.*, 1995; Makridakis *et al.*, 2005). Tanto la T como DHT se unen a su receptor, el receptor de andrógenos, localizado en el citoplasma de las células blanco. Al unirse con el andrógeno el complejo hormona-receptor es translocado al núcleo donde se une a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta a hormonas (Federman D, 2006; Vincent G, 1999).

***Desórdenes de la diferenciación sexual (DSD):*** Los DSD ocurren 1 en 4500 niños nacidos vivos. Estos padecimientos comprenden una gran variedad de anomalías definidas por condiciones congénitas en donde el sexo fenotípico, gonadal o cromosómico es atípico (Hughes *et al.*, 2006). Avances en la identificación de las causas moleculares de estas alteraciones han permitido establecer una nomenclatura que integra los nuevos conocimientos en genética molecular del desarrollo sexual (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los desórdenes de la Diferenciación Sexual.

DESORDENES DE LA DIFERENCIACION SEXUAL			
DSD Sexo cromosómico	A. 45,X	1. Síndrome de Turner	
	B. 47,XXY	2. Síndrome de Klinefelter	
	C. 45,X/46,XY	3. Disgenesia Gonadal Mixta o DSD ovotesticular	
	D. 46,XX/46,XY	Quimera, DSD Ovotesticular	
DSD 46,XY	A. Alteraciones en el desarrollo testicular	1. Disgenesia Gonadal Completa (Síndrome de Swyer)	
		2. Disgenesia Gonadal parcial	
		3. Regresión gonadal	
		4. Ovotesticular DSD	
	B. Alteraciones en la síntesis o acción de los andrógenos	1. Defectos en la biosíntesis	a. Deficiencia de 17-HSD
			b. Deficiencia de 5-alpha-reductasa
			c. Mutaciones en StAR
		2. Defectos en la acción de los andrógenos	a. Insensibilidad Completa
			b. Insensibilidad Parcial
		3. Defectos en el receptor de LH	a. Hipoplasia de células de Leydig
b. Aplasia de células de Leydig			
C. Otros	1. Hipospadias		
	2. Extrofia cloacal		
DSD 46,XX	A. Alteraciones en el desarrollo ovárico	1. Ovotesticular DSD	
		2. Testicular DSD	a. 46,XX, SRY positivos
			b. 46,XX, dup SOX9
	3. Disgenesia gonadal		
	B. Exceso de andrógenos	1. Fetal	a. Deficiencia de 21 - hidroxilasa
			b. Deficiencia de 11-hidroxilasa
		2. Fetoplacentario	a. Deficiencia de aromatasa
			b. POR
		3. Materna	a. Luteoma
			b. Andrógenos exógenos
C. Otros			
Hughes <i>et al.</i> , 2006			

Existe una gran variedad de genes que participan en la masculinización del feto XY y por consecuencia la ausencia o modificación de cualquiera de estos genes causan alteraciones en la diferenciación sexual. Varios casos de DSD reportados tempranamente en humanos XY han sido atribuidos a mutaciones en genes que participan en la vía de diferenciación testicular: por ejemplo una mutación que involucre la sustitución de un par de bases en el dominio de unión al DNA de *SF1*, incluso en un estado heterocigoto, causa feminización en individuos XY (Ozisk *et al.*, 2002). De forma similar la ausencia de función de *WT1*, el cual en forma normal codifica para varios factores de transcripción, causa falla en el desarrollo de la gónada y el riñón en homocigotos y reversión sexual XY en heterocigotos (Vilain *et al.*, 2002).

Mutaciones en el marco de lectura abierto de *SRY*, con o sin ninguna influencia en la unión al DNA o la propiedad de doblamiento de su dominio del grupo de alta movilidad (HMG), es considerado para una alta proporción de disgenesias gonadales XY (Scherer, 2002). También duplicaciones o mutaciones en el gen *SOX9* causa DSD XY y defectos en el esqueleto en humanos (Morais da Silva *et al.*, 1996; Huang. *et al.*, 1999; Hsiao *et al.*, 2006). La delección de un pequeño segmento de un miembro del par del cromosoma 9 da un estatus hemicigoto para el locus *DMRT1*, causando falla en el desarrollo testicular y feminización de una variedad de tejidos no gonadales (Ottolenghi *et al.*, 2000; Vilain, 2002; Zarkower, 2001). Fallas en la regulación de *DAX1* o *WNT4* (debido a la duplicación del segmento Xp que lleve el gen *DAX1* o a una mutación en el locus de *WNT4*) también causan DSD XY en humanos (Zanaria *et al.*, 1994; Jordan *et al.*, 2001; Sanlaville *et al.*, 2004). Cada vez son más los reportes sobre mutaciones en genes específicos involucrados en el desarrollo sexual que pueden ocasionar alteraciones en individuos XY y XX y que pueden mostrar una gran variedad de fenotipos dependiendo del estado específico en el cual la diferenciación sexual fue alterada. Pacientes con formas

específicas de alteraciones en el desarrollo sexual han incrementado el riesgo para desarrollar cánceres originados de la línea germinal, dentro de este grupo de tumores varias entidades han sido identificadas y caracterizadas por la edad de la presentación clínica, histología, comportamiento clínico y constitución genómica (Oosterhuis & Looijenga., 2005).

### **Anomalías durante la diferenciación fenotípica**

La Hiperplasia Suprarreal Congénita (HSC) es un conjunto de alteraciones histológicas características secundarias a la elevación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y a la hiperactividad crónica de la glándula por incapacidad de la corteza adrenal de producir niveles plasmáticos de cortisol adecuados en respuesta a la estimulación normal de ACTH. Esta incapacidad se debe al bloqueo enzimático causado en la vía de la esteroidogénesis.

Los defectos enzimáticos en la esteroidogénesis se han asociado a síndromes específicos:

- Deficiencia de 21-hidroxilasa. Clásica, perdedora de sal, clásica virilizante simple y no clásica.
- Deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa. Clásica y no clásica.
- Deficiencia de 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Clásica y no clásica.
- Deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa.

La HSC por deficiencia de 21-hidroxilasa corresponde al 90-95% de todas las HSC y se presenta en 1 de 15,000 recién nacidos vivos, mientras que la deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa ocupa el segundo lugar con el 5-8% (Li-Qiang *et al.*, 2008, Rimoin *et al.*, 2007). En la mayoría de los casos resultan mutaciones recesivas en los genes que codifican para las enzimas de la vía de esteroides y producen un fenotipo diferente (Nimkarn *et al.*, 2009) Ver Tabla 2.

**Tabla 2.** Genes conocidos involucrados en alteraciones del desarrollo sexual: 46,XY .

Gen	Proteína	Locus	Herencia	Gónada	Estructuras Mullerianas	Genitales Externos	Características
CYP11A1	Enzima	15q23-24	AR	Testículo		Femenino o ambiguo	HSC (falla adrenal primaria), falla en la pubertad
HSD3B2	Enzima	1p13.1	AR	Testículo	Parcial	Ambiguo	HSC (falla adrenal primaria), falla en la pubertad. Androgenismo parcial debido al incremento de DHEA
CYP17	Enzima	10q24.3	AR	Testículo	Parcial	Masculino o ambiguo	HSC, hipertensión debido al incremento de corticosterona y 11-deoxycorticosterona
HSD17B3	Enzima	9q22	AR	Testículo	Parcial	Femenino o ambiguo	Androgenización parcial durante la pubertad, incremento de androstenediona en relación a la testosterona

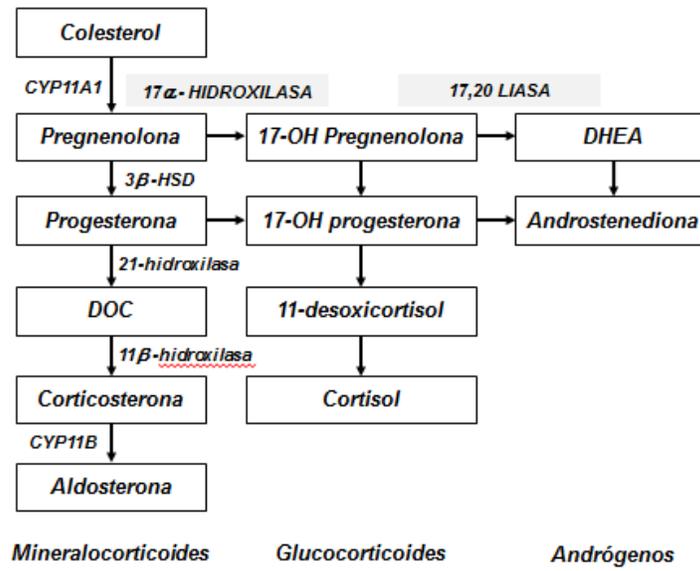
HSC=Hiperplasia Suprarrenal Congénita, AR= Autosómica recesiva

### ***Deficiencia de 17-hidroxilasa/17,20-liasa.***

La deficiencia de 17-hidroxilasa es una enfermedad autosómica recesiva con una incidencia aproximada de 1 en 50,000 individuos.

Las mutaciones en el gen *CYP17A1* llevan a falla en la síntesis de cortisol (actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa), andrógenos adrenales (17,20-liasa) y esteroides gonadales. En contraste con la deficiencia de 21-hidroxilasa y 11 $\beta$ -hidroxilasa, la deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa lleva a una insuficiencia adrenal y gonadal. La enzima se expresa tanto en adrenales como en gónadas y posee actividad de 17 $\alpha$ -hidroxilación y 17,20-liasa. La pérdida de la retroalimentación negativa lleva a un aumento en la secreción de esteroides previos al bloqueo, y se favorece la secreción de mineralocorticoides. Los niveles de aldosterona son variables, y el exceso de mineralocorticoides es resultado del exceso de DOCA en el 80% de los casos (Wilson *et al.*, 1998).

El citocromo P450 17-hidroxilasa (P450c17) es una de las enzimas clave en la síntesis de las hormonas esteroideas en la corteza adrenal y las gónadas. Pertenece a la familia de oxidasas con 2 funciones: 17-hidroxilasa y 17,20-liasa. P450c17 cataliza la conversión de pregnenolona y progesterona (P) en 17-hidroxipregnenolona y 17-hidroxiprogestero (17-OHP), que después se divide en el carbono C17, 20 vía 17,20-liasa para generar los precursores de andrógenos y estrógenos, como dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona. En la glándula adrenal, P y 17-OHP se convierten en 11-deoxicorticoesterona (DOCA) y cortisol, por reacciones de hidroxilación vía 21-hidroxilasa y 11hidroxilasa (Figura 2) (Tian *et al.*, 2009).



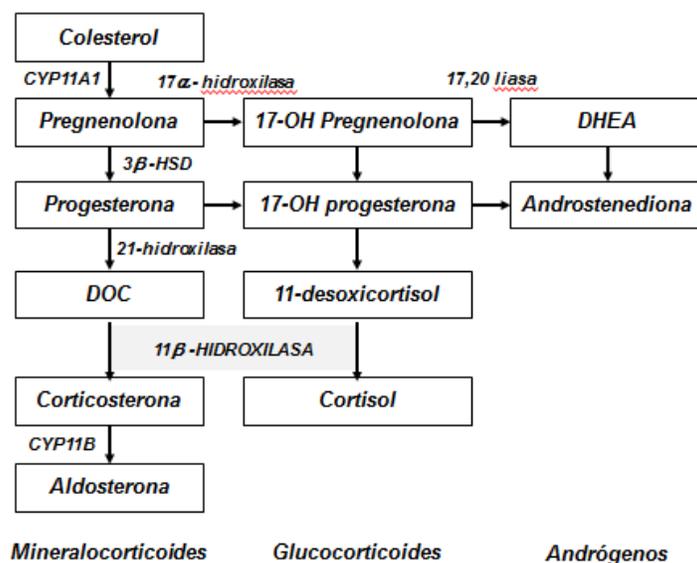
**Figura 2.** Bloqueo en la vía de esteroidogénesis secundario a defectos en *CYP17A1* (Wilson *et al.*, 1998)

**Deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa:** La secreción anormal de esteroides adrenales causada por la deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa fue descrita por primera vez por Eberlein y Bongiovanni. El gen *CYP11B1* codifica para la enzima que cataliza el último paso en la síntesis del cortisol y es regulada por la ACTH. El paso final en la síntesis de aldosterona es catalizado por la aldosterona sintetasa codificada por *CYP11B2* y regulada por la angiotensina II y el potasio.

El perfil característico de la deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa (P450c11) por mutación en *CYP11B1* muestra elevación en 11-deoxicortisol y desoxicorticosterona (DOCA) en sangre, con marcada elevación de los metabolitos urinarios.

La deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa representa el 5% de todos los casos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) con una incidencia de 1:100,000 nacimientos (Wilson *et al.*, 1998).

La enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa pertenece al sistema del citocromo P450, regula la biosíntesis de corticoesterona en la zona glomerular y cortisol en la zona fascicular de la glándula adrenal. La deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa resulta en disminución de la síntesis de cortisol y glucocorticoides, alterando la retroalimentación negativa de ACTH y aumentando su síntesis en la hipófisis, generando mayor producción de precursores del cortisol e hiperandrogenemia. El aumento de ACTH también lleva a un aumento en los niveles de DOCA y 11-deoxicortisol (Figura 1) (Li-Qiang *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Bloqueo en la vía de esteroidogénesis secundario a defectos en *CYP11B1* (Wilson *et al.*, 1998)

La deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa se divide en forma clásica y no clásica dependiendo de las manifestaciones clínicas. La deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa resulta en HSC virilizante, usualmente acompañada de hipertensión. La secreción anormal de esteroides adrenales tiene un efecto mineralocorticoide que lleva a retención de sodio y expansión de volumen.

La hipertensión y virilización son las características clínicas más importantes. El desarrollo de los genitales externos femeninos se afecta por el exceso de andrógenos causando genitales ambiguos en todos los casos, sin afectar los genitales internos. La persistencia en el aumento de andrógenos provoca aparición de caracteres sexuales secundarios de manera prematura tanto en hombres como mujeres. Las mujeres suelen tener conducta agresiva en la niñez.

La hipertensión es común pero no tan constante como la virilización. La sobreproducción de DOCA causa retención de sal e hipertensión, la cual se reconoce en la niñez o adolescencia (Li-Qiang *et al.*, 2008).

Las mutaciones en el gen *CYP11B1* provocan una baja o nula expresión de la enzima 11 $\beta$ -hidroxilasa. Se han descrito más de 50 mutaciones (Li-Qiang *et al.*, 2008).

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Los desórdenes de la diferenciación sexual en pacientes 46,XX y 46,XY, que se da en la etapa de diferenciación fenotípica y que se relaciona con la síntesis o acción de los andrógenos provoca condiciones de ambigüedad genital asociado o no a síndrome adrenogenital así como amenorrea primaria e hipertensión arterial en la adolescencia.

Este grupo de trastornos se caracterizan por presentar una buena correlación genotipo-fenotipo, sin embargo, la incidencia, el abordaje, el diagnóstico y el manejo en estos trastornos no son homogéneos, siendo la biología molecular una herramienta diagnóstica fundamental.

**OBJETIVO GENERAL:**

Analizar alteraciones genéticas o genómicas en pacientes con desórdenes del desarrollo sexual.

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

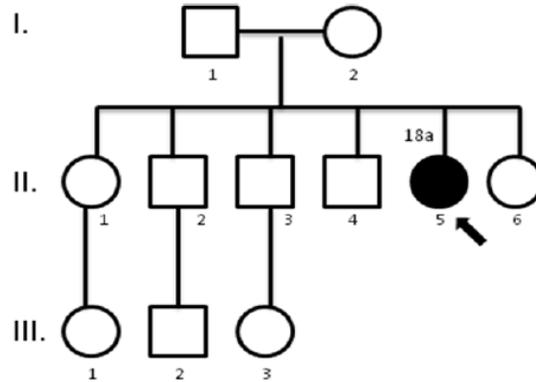
- ④ Realizar el estudio molecular de las formas no clásicas de Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC).
- ④ Desarrollar la herramienta diagnóstica molecular de las formas no clásicas de HSC pre y post-natal.
- ④ Caracterizar las mutaciones en los genes *CYP17A1* y *CYP11B1* en nuestra población.
- ④ Estudiar el posible efecto funcional de las mutaciones identificadas.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Sujetos de estudio

- a) **DSD 46,XY.** 3 Pacientes 46,XY con fenotipo femenino y con datos clínicos sugerentes de deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa.
- b) **DSD 46,XX.** 3 Pacientes 46,XX con fenotipo ambiguo o masculino y con datos clínicos sugerentes de deficiencia de 11-hidroxilasa.

**Caso 1.** Familia de San Juan Ocotlán, Oaxaca. La paciente II.5 de 18 años, acude a consulta con asignación de sexo femenino y crisis hipocalémica (Figura 3).



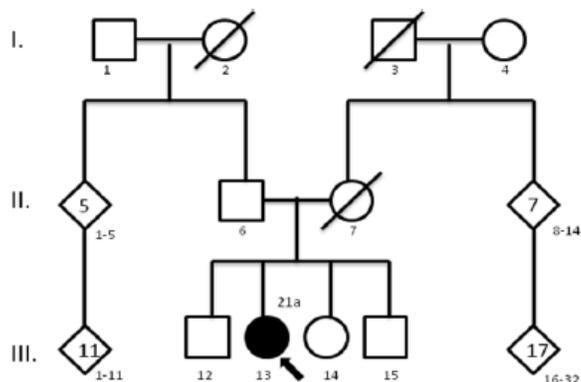
**Figura 3. Árbol genealógico del caso 1**

La paciente presenta amenorrea primaria, infantilismo sexual, hipertensión arterial 140/100. Fenotipo femenino, sin vello axilar ni púbico, genitales externos femeninos. No presenta útero ni ovarios, pero con gónadas en ambos canales inguinales.

El cariotipo mostró un complemento cromosómico 46,XY y secuencias del cromosoma Y por PCR positivas. Los exámenes de laboratorio muestran FSH 67.9 mUI/ml, LH 41.4 mUI/ml, prolactina 29.4 ng/ml, E2 10 pg/ml, TSH 0.99 g/ml, T4L 1.0 ng/ml, T3L 3.3 pg/ml, ACTH 535 pg/ml, aldosterona 171.2 pg/ml, progesterona 4.1 ng/ml, testosterona 10 ng/dL, Na 143, K 1.59, Mg 0.43.

Se realizó laparotomía exploradora y se extirparon ambos testículos y se tomó muestra de sangre periférica para realizar estudio molecular.

**Caso 2.** Familia de San Juan Ocotlán, Oaxaca. La paciente III.13 de 21 años y con asignación de sexo femenino, presentó amenorrea primaria e hipertensión. Sin antecedentes familiares pero procedentes de una comunidad endogámica de Oaxaca (Figura 4).



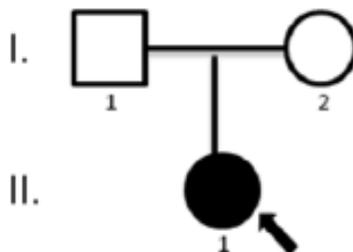
**Figura 4. Árbol genealógico del caso 2**

La paciente presentó fenotipo femenino, mamas poco desarrolladas, sin presencia de vello axila ni púbico, genitales externos femeninos y presión arterial de 140/100. A través del ultrasonido no se observó útero ni ovarios. El cariotipo reveló un complemento cromosómico 46,XY.

Los estudios de laboratorio muestran FSH 42.6 mUI/ml (3.5-12.5), LH 17.2 mUI/ml (2.4-12.6), E2 20.0 pg/ml (25- 195), prolactina 6.3 ng/ml (3.3-26.7), cortisol 0.5 µg/ml (8.7-22.4), DHT<15, androstenediona <0.3g/ml, DHEAS <15, testosterona 0.1 ng/ml (0.06-0.82), progesterona 4.59 ng/ml, ACTH 298.5 pg/ml (4.7-48.8), Na 141 mmol/L (136-144), K 3.1 mmol/L (3.6-5.1), Cl 105 mmol/L (101-111), Ca 9.6 mg/dL (8.9-10.3).

Se tomó muestra de sangre periférica para estudio molecular.

**Caso 3.** Familia procedente del estado de Morelos, con caso II.1 con asignación femenina de 15 años de edad que acude a consulta por amenorrea primaria sin desarrollo de caracteres sexuales secundarios (Figura 5).



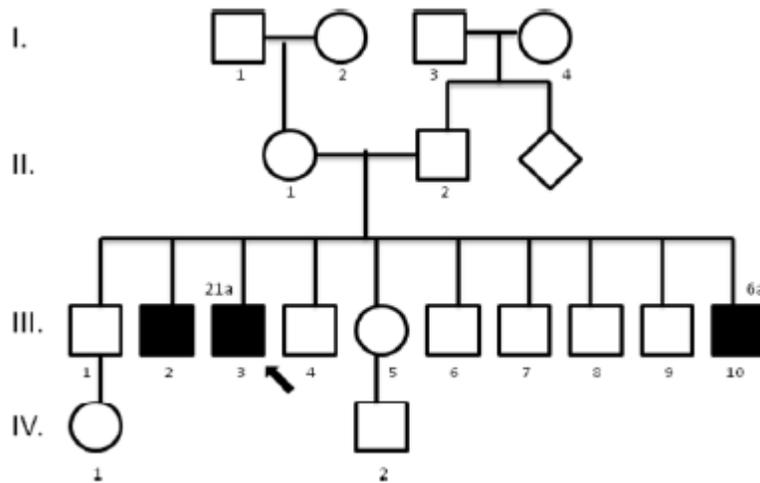
**Figura 5. Árbol genealógico del caso 3.**

A la exploración física se observa poco desarrollo de mamas, ausencia de vello púbico, genitales externos femeninos y presión arterial 170/110. El ultrasonido pélvico mostró la ausencia de estructuras Mülllerianas y el cariotipo fue 46, XY.

Se realizó prueba de estimulación con gonadotropina coriónica humana sin obtener respuesta. Los laboratorios reportan LH 36.4 UI/L (0.69-7.15), FSH 58.8 UI/L (0.81-8.18). Se realizó laparoscopia donde se encuentran testículos bilaterales en canal inguinal. Las gónadas fueron removidas y el análisis histológico reveló testículos bilaterales con escasas células de Leydig y atrofia tubular con ausencia de epidídimo y vasos deferentes. Posterior a la cirugía se documentó hipocalcemia (2.9 mEq/L) e hipernatremia (148 mEq/L), cortisol basal 2.8 µg/dL (3-21), testosterona < 20 ng/dL (220- 800), androstenediona 0.3 ng/mL (0.9-1.7), DHEA-s < 15 µg/dL (30-555), 11-deoxicorticoesterona 398 ng/dL (2-19), ACTH 75.3 pg/mL (10-60), aldosterona 240 pg/mL (10-160), actividad de renina plasmática 1 ng/ml/hr (3.2 ± 1), E2 <20 pg/mL (5-45), progesterona 10.4 ng/ml (0.3-1.5) y pregnenolona 300 ng/dL (10-150).

Se toma muestra de sangre periférica para estudio molecular a la paciente y ambos padres.

**Caso 4.** Familia procedente de la región de Xhenalho, Chiapas. El paciente II.3 con asignación de sexo masculino de 21 años, acude a consulta por hipertensión arterial y ambigüedad genital. Se documenta que no hay consanguinidad, sin embargo, proviene de una comunidad endogámica (Figura 6).



**Figura 6. Árbol genealógico del caso 4.**

El paciente presentó pubarca prematura a los 6 años, talla baja e hipertensión arterial de difícil control. A la exploración física se observó falo de 4 cm, sin gónadas palpables, hipospadias perineo-escrotales sin seno urogenital.

Los estudios de laboratorio se muestran en la tabla 3. Mediante tomografía axial computarizada (TAC, por sus siglas en inglés) de la región abdomino-pélvica mostró hiperplasia de glándulas adrenales así como la presencia de útero y gónadas con características de ovarios. El Cariotipo fue 46, XX con secuencias del cromosoma Y mediante PCR negativas.

Se tomó muestra de sangre periférica para estudio molecular.

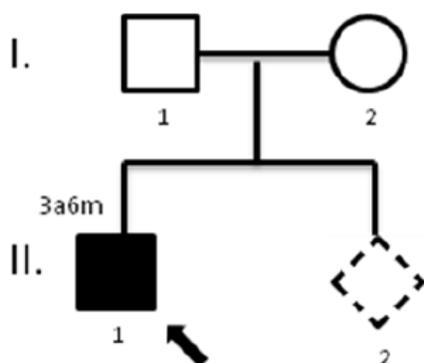
El paciente III.10 de 6 años de edad y hermano del caso III.3 acude a consulta con características clínicas y bioquímicas semejantes a su hermano. Presenta fenotipo, genitales e identidad masculinos, hipertensión arterial 140/90, talla alta y edad ósea de 14 años. Los exámenes de laboratorio se muestran en la tabla 3. Se realizó cariotipo con resultado 46,XX.

Se tomó muestra para realizar estudio molecular.

**Tabla 3. Valores de laboratorio de los pacientes III. 3 y III. 10**

<b>LABORATORIO</b>	<b>Valores</b>	<b>III. 3</b>	<b>III. 10</b>
17-hidroxiprogesterona	0.5 – 2 ng/ml	18.6	19.8
FSH	2 – 10 mUI/ml	10.0	11.4
LH	2 – 25 mUI/ml	5.0	4.6
Estrógenos	20 – 150 pg/ml	70	62
Testosterona	0.2 – 0.7 ng/ml	3.0	4.0
Progesterona	0.2 – 1.0 pg/ml	1.6	1.8
DHEAs	520 – 4200 ng/ml	1500	2160
DOCA	2-19 ng/dL	1010	1029

**Caso 5.** Familia originaria de Chicontepec, Veracruz. El paciente masculino II.1 de 3 años 6 meses de edad, con datos de pseudo-pubertad precoz e hipertensión arterial (Figura 7). A la exploración física se observó fenotipo masculino, acné en cara, genitales masculinos, pene de 9 cm y volumen testicular de 1.7 cm<sup>3</sup>. Los resultados relevantes de laboratorio incluyen desoxicorticosterona 403 ng/dL (4-49), 11-deoxicortisol >10,000 ng/dL (7-210).



**Figura 7.** Árbol genealógico del caso 5

Se toma muestra de sangre periférica para diagnóstico molecular.

Posteriormente, la madre del paciente II.1 acude a consulta con embarazo de 8.1 semanas de gestación calculado por ultrasonido. El médico endocrinólogo inició tratamiento prenatal con dexametasona a dosis de 20 µg/kg/día. La dexametasona es un potente glucocorticoide sintético con acción semejante a las hormonas esteroides, se usa en el contexto de la hiperplasia congénita adrenal para evitar la virilización de un

feto femenino. Durante la semana 17 de gestación, se realizó amniocentesis para la realización del estudio molecular prenatal

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Extracción de DNA a partir de linfocitos de sangre periférica.**

A partir de 3 ml de sangre periférica se extrajo DNA genómico utilizando PerfectPure™ DNA Blood Kit (5PRIME) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La concentración y pureza fueron determinadas por espectrofotometría, de la siguiente manera:

Concentración:  $1DO_{260} = 50 \mu\text{g de DNA/ml}$

Pureza:  $DO_{260}/DO_{280} = 1.8 - 2.0$

La integridad de la muestra fue verificada media electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

### **Extracción de DNA a partir de aminocitos.**

A partir de 6 ml de líquido amniótico se extrajo DNA genómico utilizando QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La concentración y pureza del DNA fue obtenida mediante espectrofotometría y la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

**PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).**

La PCR se utilizó para amplificar los 8 exones del gen *CYP17A1* y los 9 exones del gen *CYP11B1*.

A continuación se describen los oligonucleótidos y temperaturas utilizados.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración final</b>
Buffer	1 x
MgCl	1.5 mM
Oligonucleotidos	0.2 µM
dNTPs	100 µM
Taq DNApol	0.5 U
DNA	100 ng

**Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los 8 exones del *CYP17A1***

Exón	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
1	5' - CACTGCTGTCTATCTTGCC -3'	474	58
	5' - CCTCACATCATCCACTA -3'		
2	5' - AGGGACCAGAGGTGTAAG -3'	339	58
	5' - GCAGCAGTAGCCAAGAA -3'		
3	5' - AGGGTGCTGATTCATTTTC -3'	414	58
	5' - GCAGCGGAGGTAGAGGTG -3'		
4	5' - CGATTGATGTTTGATTGA -3'	396	58
	5' - CACCCTGATATTGTGATT -3'		
5	5' - ACAGAAGTATGGCAGGAGT -3'	593	58
	5' - CCAGAGTAGGTTGGAGGT -3'		
6	5' - ACTGGGAAGGGAAGTGGGA -3'	314	58
	5' - GGCTAGATGTCACTGGGAG -3'		
7	5' - AGTGGGAATGAGGGAGTA -3'	356	58
	5' - GTCAACAGGTCCGTATAGTT -3'		
8	5' - TCAACCAGGGCAGAACC -3'	446	58
	5' - GGAAGAATGGCGGAGAA -3'		

Para la amplificación de los 8 exones del gen *CYP11B1*, se realizaron solo 3 reacciones de amplificación abarcando de esta forma los 8 exones.

Para la reacción de secuencia se utilizaron, además, oligonucleótidos internos específicos para cada exón (Tabla 4).

**Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los 8 exones de *CYP11B1***

Exón	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
1-2	5' - TCGAAGGCAAGGCACCAG -3'	873	65
	5' - TCGACTCTCGACCCTCG -3'		
3-5	5' - AGAAAATCCCTCCCCCCTA -3'	1409	65
	5' - AGTGTGCCCGGGTGCACAG -3'		
6-9	5' - TGACCGTGCAGCTGTGTCT -3'	1541	65
	5' - CGGTAGTTGATTAGTGCAGAG -3'		
2	5' - GAGACAGTTTGGATTGGGACTGC -3'	Oligonucleótidos internos usado solo en la reacción de secuencia.	
3	5' - GGACAAGGAGGATGGGATA -3'		
4	5' - GGACTGAAGGGAGTGTG -3'		
5	5' - GGATGTTTCCCAGCACCAAAGTC -3'		
7	5' - GGTGCAGAGAGCACAGG -3'		
8	5' - CCTCGAGCTGAGAACCTCC -3'		
9	5' - TGCAACTTTGAGGGTCTGAGAAG-3'		

### **Purificación de productos de PCR.**

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit QIAEX II Gel Extraction Kit de QIAGEN®. Una alícuota de los productos purificados se hicieron migrar en un gel de agarosa al 1.5% junto a un marcador de peso molecular llamado Low DNA Mass (INVITROGEN) con el fin de verificar el peso molecular del producto y, además, estimar la concentración de la muestra. Los productos de PCR purificados por este método sirvieron para su posterior secuenciación.

### **Secuenciación automatizada por el método de Sanger.**

La secuenciación de los productos de PCR se realizó con BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit. El procedimiento se basa en el método de Sanger y Cols. Como cebadores para las reacciones de secuenciación se emplearon los mismos que para las amplificaciones más los oligonucleótidos internos mencionados anteriormente para el caso del gen *CYP11B1* a una concentración de 0,10  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ .

**Tabla XXX. Condiciones de la reacción de secuencia**

Reactivo	Mezcla		Incubación	
	Vol. ( $\mu\text{l}$ )		Temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
Producto PCR	1-3		96	1 min
Terminator big Dye	2		96	30 seg
Agua	Llevar a 6	25 ciclos	50	15 seg
			60	3 min

### **Purificación de productos**

Al terminar la reacción de secuencia, se purificaron los productos marcados utilizando columnas CentriSep de Applied Biosystems® y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

Para estudiar la expresión y localización de la proteína 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa mutada en tejido gonadal se realizó inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

#### **a) Preparación de tejidos.**

Biopsia testicular del paciente, testículo adulto sano y glándula adrenal, usada como control positivo, fueron fijados con formol al 3.5% en PBS 1x durante 24 horas. Se deshidrataron con una serie de alcoholes graduales, se eliminó el exceso de parafina con xileno y se incluyeron en Paraplasto (Oxford Labware).

Se realizaron cortes de 5 $\mu$ m, se desparafinaron con xileno y se rehidrataron en una serie gradual de etanol. Los tejidos rehidratados se lavaron con agua destilada y con solución salina de fosfatos (PBS 1x, pH 7.2) con el propósito de preservar los antígenos del tejido. Posteriormente fueron tratados con buffer de citratos 1x (DakoCytomation, Target Retrieval Solution) y sometidas de 20 a 25 libras de presión y 121°C durante 5min. El peróxido endógeno fue bloqueado con una solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron con PBS- Tween 20 (PBS-T20) y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA).

Los tejidos fueron incubados con el anticuerpo primario en una dilución 1:100 (DakoCytomation, Antibody Diluent cat. S0809) durante 20 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

**b) Inmunoperoxidasa.** Al término de la incubación con el anticuerpo primario los tejidos fueron lavados con PBS-Tween20 e incubados con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón/conejo/cabra conjugado con estreptavidina-peroxidasa (Dako, USA) por 20 minutos. La reacción enzimática fue revelada empleando la solución de sustrato-cromógeno durante 10 minutos (kit LSAB+Sys/HRP, Dako-Cytomation, Carpenter, CA, cat K0679) contrastadas con hematoxilina, usando entellan como medio de montaje.

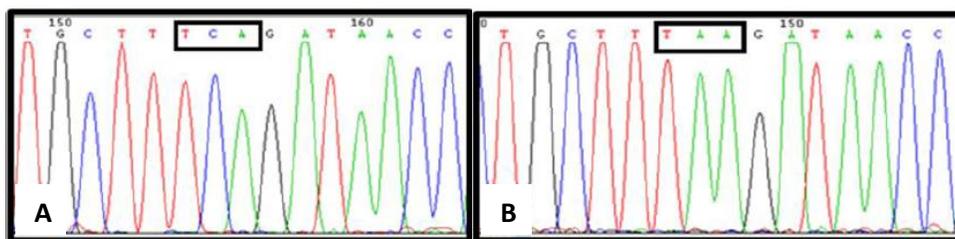
**c) Inmunofluorescencia.** Al término de la incubación con el anticuerpo primario los tejidos fueron lavados con PBS-Tween 20 y e incubados con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra y acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las muestras fluoreceínadas fueron tratadas con RNAsa 20 minutos y lavadas con una solución SSC 2x. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio y los tejidos fueron montados con vectashiel (Vector, USA).

## RESULTADOS

Se amplificaron por PCR y secuenciaron los 8 exones del gen *CYP17A1* de 3 pacientes con cariotipo 46,XY y con características clínicas de deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa. Así como de los 9 exones del gen *CYP11B1* de 3 pacientes con cariotipo 46,XY con fenotipo masculino o ambiguo.

**CYP17A1.** El estudio molecular del gen *CYP17A1* en los pacientes 46,XY con fenotipo femenino.

**Caso 1.** Se encontró una transversión homocigota de una citosina por una adenina en el exón 5. Esta sustitución provoca un cambio de Serina (TCA) por un codón de paro (TAA) en el aminoácido 288 (S288X) (Figura 8).



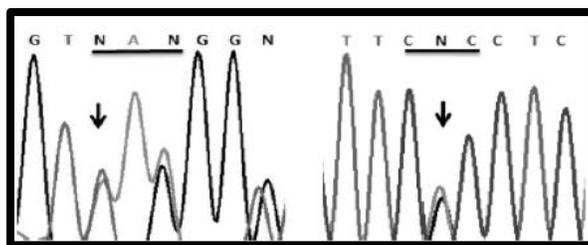
**Figura 8. Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP17A1***

**A. Corresponde a una secuencia de referencia. B. Secuencia del paciente II.5 del Caso 1**

**Caso 2.** Se estudió el caso III.13 con datos clínicos compatibles con hiperplasia suprarrenal congénita pro deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa; se secuenciaron los 8 exones del gen *CYP17A1* encontrando la mutación S288X.

**Caso 3.** Se estudió la familia nuclear se identificó que la madre era heterocigota para la mutación K110X y el padre heterocigoto para la mutación R362H y el caso índice fue un heterocigoto compuesto. Ambas mutaciones no han sido reportadas en la literatura.

La primera es una mutación sin sentido que consiste en la inserción de un timina en la posición 2758 del exón 2 que cambia una lisina (AAG) por un codón de paro (TAA) designada como K110X (Figura 9). El segundo alelo contenía una mutación de sentido equivocado que consiste en la transición de una Guanina por una adenina en la posición 5555 en el exón 6 que cambia una Arginina (CGC) por Histidina (CAC) designada como R362H (Figura 9). También se encontró que la paciente era heterocigoto para 4 polimorfismos previamente descritos, 2 en el exón 1 (rs 6162 [T/C]), rs 6163 [G/T]), otro en el intrón 3 (rs1004467 [T/C]) y uno en el intrón 6 (rs17115100 [C/A]).



**Figura 9. Electroferograma parcial de la secuencia del gen *CYP17A1*  
Secuencia del paciente II.1 del caso 3, donde se muestran las dos mutaciones presentes  
[2757^2758 insT]+[555G>A].**

Con el fin de determinar la expresión y localización de la proteína mutante en el tejido gonadal de la paciente, se realizó inmunohistoquímica, utilizando como controles positivos tejido testicular adulto sano y glándula adrenal (Figura 10).

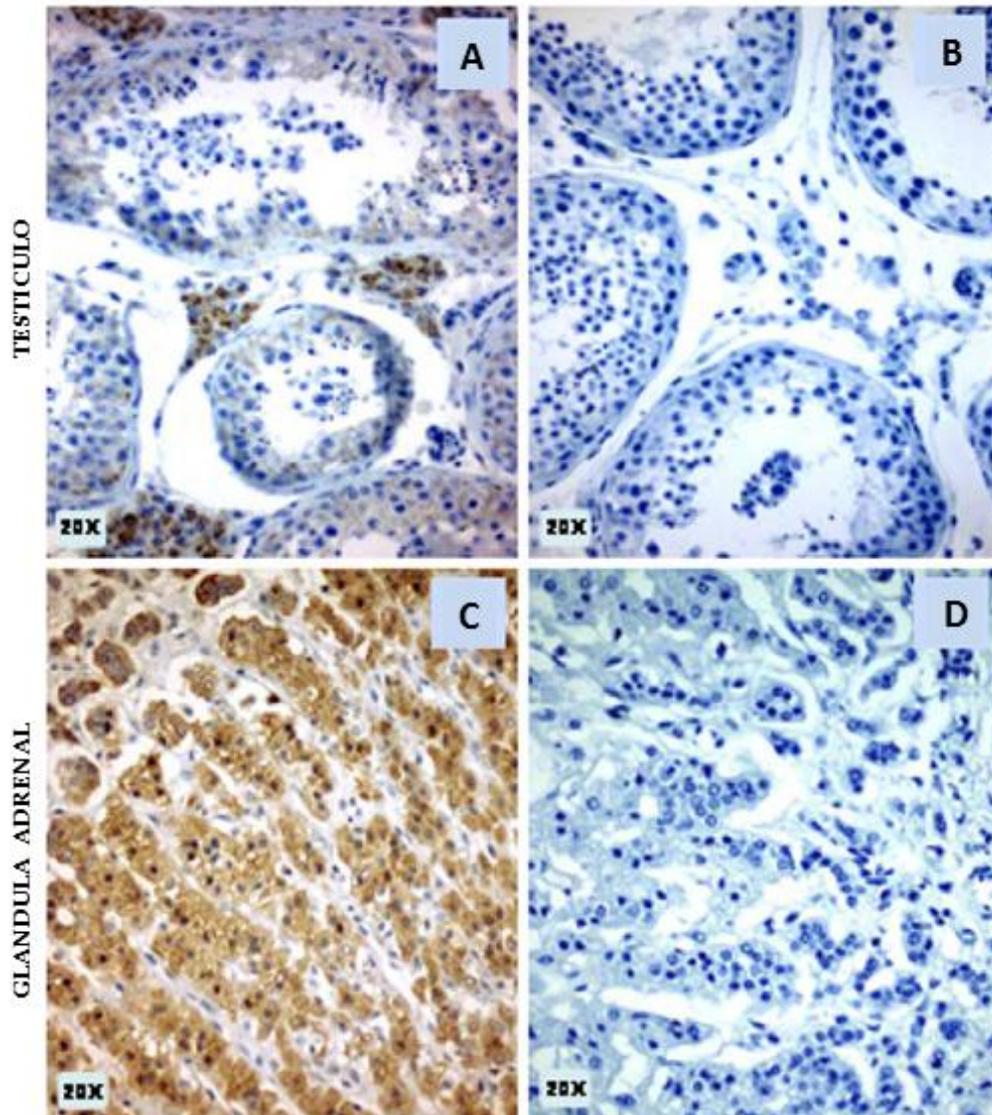
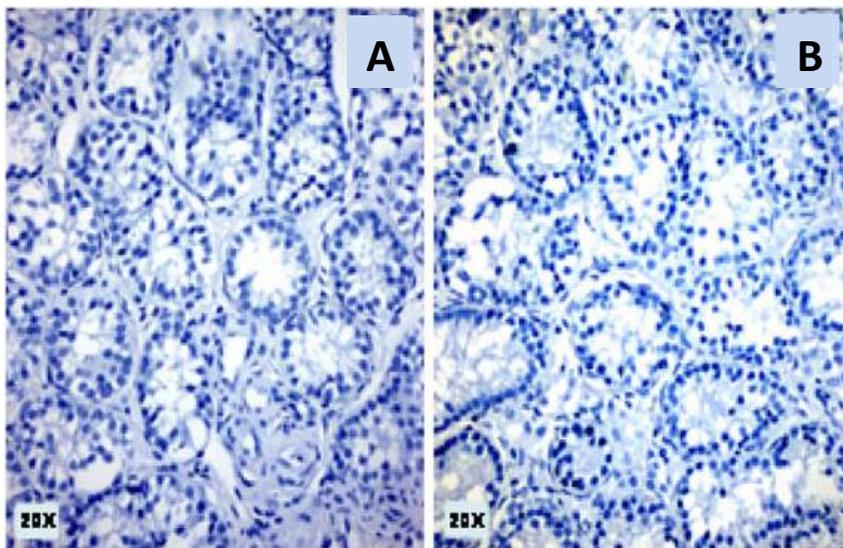


Figura 10. Inmunohistoquímica para detectar la proteína codificada por el gen *CYP17A1*. Se utilizaron como tejidos control positivos testículo (A) y glándula adrenal (C), Controles negativos sin anticuerpo primario de testículo (B) y glándula adrenal (D).

Se observó que el tejido gonadal de la paciente fue negativo en el análisis de inmunohistoquímica para *CYP17A1*, demostrando que la proteína mutante está ausente (Figura 11).



**Figura 11. Inmunohistoquímica para detectar la proteína codificada por el gen *CYP17A1* en el tejido gonadal de la paciente (Caso 3). A. Corresponde a tejido incubado con y B sin anticuerpo primario.**

Debido a que el tejido gonadal de la paciente histológicamente corresponde a un testículo disgenético, fue necesario demostrar que la ausencia de la proteína mutante  $17\alpha$ -hidroxilasa no se debe a la atrofia del tejido. Para ello, se realizó inmunohistoquímica para detectar  $3\beta$ -HSD, encontrándose que el testículo de la paciente es funcional ya que se demostró la presencia de  $3\beta$ -HSD en las células esteroideogénicas o células de Leydig (Figura 12).

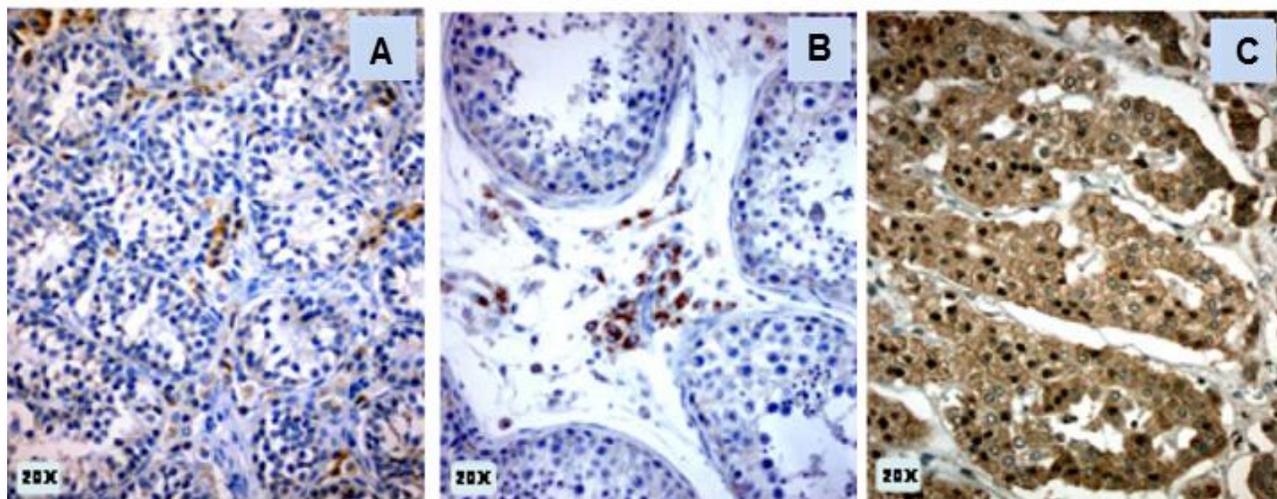
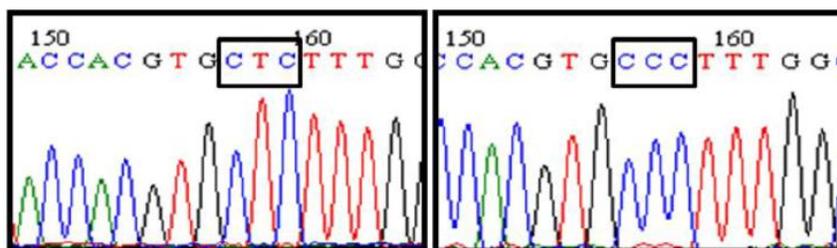


Figura 12. Inmunohistoquímica para detectar 3 $\beta$ -HSD. A. Testículo de la paciente del caso 3. B. Testículo control y C. Glándula adrenal como control positivo.

*CYP11B1*. Estudio molecular del gen *CYP11B1* en los pacientes 46,XX con fenotipo masculino.

**Caso 4.** En esta familia se estudiaron 2 casos, II.3 y III.10. En ambos casos se presentó una transición homocigota de citosina (CCC) por timina (CTC) en la posición 4791 del exón 8, esta sustitución provoca un cambio de una prolina por una leucina en el aminoácido 442 (Figura 13).



**Figura 13.** Electroferograma de la secuencia del gen *CYP11B1* representativo de los pacientes III.3 y III.10 del caso 4. A. Corresponde a la secuencia de referencia y B. Se muestra la mutación de los pacientes de manera heterocigota C4791T que provoca un cambio de Prolina por Leucina en la posición 442 de la proteína.

**Caso 5.** Se estudió el paciente II.1 donde se identificó una inserción homocigota de 11 nucleótidos ACAGTACACCA en la posición 3467 del exón 5 (Fig. XX). Además se realizó diagnóstico prenatal en el caso II.2 utilizando DNA extraído de líquido amniótico, encontrando la misma mutación (Figura 14). Sin embargo, el cariotipo del bebé fue 46,XY y aunque fue homocigoto para la misma mutación que el hermano, el tratamiento con dexametasona fue suspendido, ya que éste fármaco se utiliza para evitar la virilización de un bebé femenino y al ser varón ya no fue necesario.

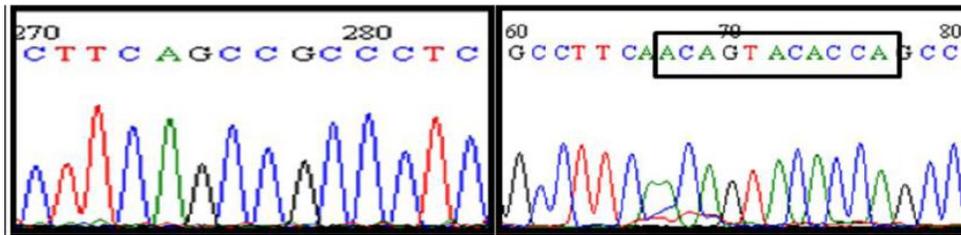


Figura 14. Electroferograma de la secuencia del gen *CYP11B1* representativo de los pacientes II.1 y II.2 del caso 5. A. Corresponde a la secuencia de referencia y B. Se muestra la mutación de los pacientes que corresponde a una inserción de 11 bases en el exón 5, lo que provoca un cambio en el marco de lectura.

## DISCUSIÓN

En esta tesis se informa de 5 familias con un total de 6 casos afectados. En dos de las familias se llegó al diagnóstico clínico y molecular de Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) por deficiencia de 11 $\beta$ -hidroxilasa. Clínicamente esta patología se caracteriza por presentar elevación en la tensión arterial en edad temprana por sobreproducción de desoxicorticosterona (DOCA).

En los casos 46,XX se observa ambigüedad genital secundaria a virilización de los genitales externos (Li-Qiang *et al.*, 2008). Existen 68 mutaciones reportadas en la literatura, las dos mutaciones encontradas en los casos 4 y 5 no han sido previamente reportadas.

La porción del sulfhidrilo de Cys450 en P450c11 compone el quinto sitio de coordinación de la zona de unión al hierro. Este residuo se encuentra altamente conservado en el sistema del citocromo P450, y los péptidos cercanos también se encuentran conservados. Se ha visto que mutaciones de sentido equivocado cerca de esta región llevarían a pérdida de la actividad enzimática de 11hidroxilasa (Li-Qiang *et al.*, 2008). Por lo tanto, podemos suponer que la mutación P442L, encontrada en el caso 4 se comporta de manera similar.

Por otro lado, las inserciones pueden causar alteraciones en la transcripción del DNA debido al cambio en el marco de lectura y por tanto cambiar la secuencia del péptido resultante, como sucedería en el caso 5 donde se presenta una mutación por la inserción de 11 nucleótidos.

La deficiencia de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa es una causa poco frecuente de HSC y las mutaciones descritas en el gen *CYP17A1* causan deficiencia aislada o combinada de 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa. Los pacientes 46,XY están considerados dentro del grupo de DSD XY

que antes eran denominados como pseudohermafroditas masculinos, ya que de acuerdo a la actividad enzimática residual presentan diversas alteraciones en la virilización y ausencia de desarrollo puberal (Brooke *et al.*, 2006).

Hasta el momento han sido reportadas 72 mutaciones en la literatura y las encontradas en nuestros casos no corresponden a ninguna de éstas.

La mutación S288X encontrada en los casos 1 y 2 es una transversión que genera un codón de alto prematuro, truncando la proteína y de esta manera disminuyendo su función. Debido a que sólo una de las pacientes presentó crisis hipocalémica en la edad adulta, podemos suponer que existe cierta actividad residual de la enzima.

En el caso 3 el estudio molecular mostró una mutación heterocigota compuesta, K110X/R362H, y ninguna de las dos mutaciones ha sido reportada previamente.

El codón de alto prematuro en K110X generó una pérdida de 399 aminoácidos, dejando posiblemente, una proteína trunca de 109 aminoácidos sin actividad enzimática. La sustitución de arginina por histidina en la posición 362 en la mutación R362H se localiza en un espacio tridimensional contiguo al extremo terminal de la proteína. Este sitio tiene 2 importantes funciones: es crítico para la unión del grupo hemo y juega un papel estructural en el mantenimiento del dominio de plegamiento. R362 es parte del motivo ExxR en el extremo C-terminal de la hélice K, un motivo conservado en todas las enzimas del citocromo P450 conocidos (Costa-Santos *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2007).

El análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia orientan a pensar que el alelo con el codón de alto genera una proteína pequeña e inestable que no se traduce, y también sugieren

que la sustitución de sentido equivocado no sólo tiene un impacto negativo en la función de la proteína, sino que también afecta la estructura de la proteína, al alterar el dominio de plegamiento y favoreciendo la degradación de la proteína.

Es importante destacar que los casos 1, 2 y 4 provienen de comunidades endogámicas para las enfermedades diagnosticadas. Es por esto que podemos suponer que existe un efecto fundador.

En la literatura se encuentran reportadas mutaciones específicas para diferentes poblaciones étnicas alrededor del mundo, y en todas se sospecha la presencia de un efecto fundador (Yang *et al.*, 2006).

## CONCLUSIONES:

- ◆ El diagnóstico clínico de deficiencia de  $11\beta$ -hidroxilasa o deficiencia de  $17\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa basado en características clínicas y valores de laboratorio, fue corroborado mediante el estudio molecular.
- ◆ Se identificaron 3 nuevas mutaciones en el gen *CYP17A1*: S288X y K110X/R362H en pacientes con deficiencia de la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa.
- ◆ Se identificaron 2 nuevas mutaciones en el gen *CYP11B1*: P442L y 3467<sup>^</sup>3468ins ACAGTACACCA en pacientes con deficiencia de la enzima  $11\beta$ -hidroxilasa.
- ◆ Las mutaciones identificadas en este trabajo y el antecedente de la procedencia de las familias, sugiere un efecto fundador en los Estados de Oaxaca y Chiapas para la deficiencia de las enzimas  $11\beta$ -hidroxilasa y  $17\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa.
- ◆ El diagnóstico molecular prenatal es una herramienta viable que permite aplicar el tratamiento adecuado y oportuno (*in útero*), con el que pueden evitar efectos irreversibles en los genitales del bebé y por tanto en el desarrollo sexual en la vida de los pacientes.

## REFERENCIAS

- Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Shoot PJ, Hoogerbrugger Jw, de Winter JP, Uilenbroek JT, Karels B, Wilming LG, Meijers JH, Themmen PN and Grootegoed JA. 1994. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development*; 120:189-197.
- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M, 1994. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet.* 7(4): 497-501.
- Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. 1994. Müllerian Inhibiting substance function during sexual development. *Cell.* 79: 415-425.
- Brooke AM, Taylor NF, Shepherd JH, Gore ME, Ahmad T, Lin L, Rumsby G, Papari-Zareei M, Auchus RJ, Achermann JC, Monson JP. 2006. A Novel Point Mutation in P450c17 (CYP17) Causing Combined 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17, 20-Lyase Deficiency, *J Clin Endocrinol Metab* 91(6):2428-2431.
- Berta P, Hawkins J, Sinclair A, Taylor A, Griffiths B, Goodfellow P, Fellous M. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis determining factor. *Nature.* 348: 448-450.
- Capel B, Albrecht KH, Washburn LL, Eicher EM. 1999. Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech Dev.* 84(1-2):127-131.
- Capel B. 2000. The battle of the sexes. *Mechanisms of Development*, 92:89-103.
- Costa-Santos M, Kater CE, Auchus RJ. 2004. Two Prevalent CYP17 Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in 24 Brazilian Patients with 17-Hydroxylase Deficiency, *J Clin Endocrinol Metab.* 89(1):49-60.

- Da Silva SM, Hacker A, Goodfellow P, Lovell Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics*. 14: 62-68.
- Dominice S, Corrêa RV, Costa EMF, Nishi MY, Vilain E, Arnold I JP, Mendoca BB. 2004. Mutations in the SRY, DAX1, SF1 and WNT4 genes in Brazilian sex-reversed patients. *Brazilian J. Med. Biol. Res*. 37: 145-150.
- Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD. 1993. The role of the sex determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness. *J Clin Endocrinol Metab*. 76:690-695.
- Federman D. 2006. The Biology of Human Sex Differences. *N Engl J Med*. 354: 1507-1514.
- Ford CE, Jones KW, Polan PE, de Almeida JC, Briggs JH. 1959. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal sex digenesis (Turner's syndrome). *Lancet*: 711-713.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Schafer AJ. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 372: 525-530.
- Grumbach MM, Conte FA. 1998. Disorders of Sex Differentiation en *Williams Textbook of Endocrinology*. 9a ed. Wilson J, Foster D, Kronenberg H, Larsen P. eds. W.B. Saunders Company. E.U.A. 1303-1425 pp.
- Gubbay J, Collingnan J, Koopman P, Capel B, Economou A. 1990. A gene mapping to the sex determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 346: 245-250.

- Hanley NA, Hagan DM, Clement Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas Cortés L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI. 2000. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev.* 91(1-2):403-407.
- Harley VR, Layfield S, Mitchell CL, Forwood JK, John AP, Briggs LJ, McDowall SG, Jans DA. 2003 defective importin beta recognition and nuclear import of the sex-determining SRY are associated with XY sex reversing mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 7045-7050.
- Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD. 1992. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am. J. Hum. Genet.* 51:979-984.
- Hsiao HP, Tsai LP, Chao MC, Tseng HI, Chang YC. 2006. Novel SOX9 gene mutation in campomelic dysplasia with autosomal sex reversal. *J Formos Med Assoc.* 105 (12): 1013-1016.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet.* 87(4): 349-353.
- Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. 2006. LWPES Consensus Group; ESPE Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch. Dis. Child.* 91(7): 554-563.
- John M, Menon SK, Shah NS, Menon PS. 2009. Congenital adrenal hyperplasia 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency: two cases managed with bilateral adrenalectomy, *Singapore Med J* 50(2): e68-70.
- Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR, Vilain E. 2001. Up regulation of WNT 4 signaling and dosage sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet.* 68(5): 1102-1109.

- Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet J. 1973. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec. Progr. Horm. Res.* 29: 141.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P. 1996. A male specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.* 122(9): 2813-2822.
- Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. *Development.* 2004. 131(3): 539-49.
- Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell Badge R. 1990. Expression of a candidate sex determining gene during mouse testis differentiation. *Nature.* 348(6300):450-452.
- Kriedberg J, Sariola H, Loring J, Maeda M, Pelletier J. 1993. Wt-1 is required for early kidney development. *Cell.* 174: 679-691.
- Li-Qiang Z, Su Han, Hao-Ming T. 2008. Progress in molecular-genetic studies on congenital adrenal hyperplasia due to 11-hydroxylase deficiency, *Gynecol Endocrinol.* 25(8): 485-90.
- Makridakis N, Reichardt JK. 2005. Pharmacogenetic analysis of human steroid 5 alpha-reductase type II: comparison of finasteride and dutasteride. *J. Mol. Endocrinol.* 34(3): 617-623.
- Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell Badge R, Capel B. 1997. Male specific cell
- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. 1993. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3368-3372.
- Mendez JP, Ulloa Aguirre A, Imperato McGinley J, Brugmann A, Delfin M, Chavez B, Shackleton C, Kofman Alfaro S, Perez Palacios G. 1995. Male pseudohermaphroditism due to primary 5-alpha reductase deficiency: variation in gender identity reversal in seven Mexican patients from five different pedigrees. *J Endocrinol Invest.* 18: 205-213.
- migration into the developing gonad. *Curr Biol.* 712: 958-968.

- Morohashi K, Zanger UM, Honda S, Hara M, Waterman MR, Omura T. 1993. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell specific transcription factor, Ad4BP. *Mol Endocrinol.* 7(9): 1196-1204.
- Nimkarn S, Lin-Su K, New M. 2009. Steroid 21Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin N Am* 38:699-718.
- Oosterhuis JW, Looijenga LH. 2005. Testicular germ cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer.* 5(3): 210-222.
- Ottolenghi C, Veitia R, Quintana Murci L, Torchard D, Scapoli L, Souleyreau Therville N, Beckmann J, Fellous M, McElreavey K. 2000. The region on 9p associated with 46,XY sex reversal contains several transcripts expressed in the urogenital system and a novel doublesex related domain. *Genomics.* 64(2): 170-178.
- Ozisik G, Achermann JC, Jameson JL. 2002. The role of SF1 in adrenal and reproductive function: insight from naturally occurring mutations in humans. *Mol Genet Metab.* 76(2): 85-91.
- Palmer SJ and Burgoyne PS. 1991. In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX/XY chimeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development.* 112:265-268.
- Petersen C, Boitani C, Fröysa B, Söder O. 2001. Transforming growth factor alpha stimulates proliferation of rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 181(1 -2):221-227.
- Petersen C, Söder O. 2006. The Sertoli cell a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res.* 66(4): 153-161.
- Rimoin D, Connor J. 2007. Emery and Rimoin's. Principles and Practice of Medical Genetics, Ed. Elsevier, 5<sup>a</sup> ed.

- Sanlaville D, Vialard F, Thépot F, Vue Droy L, Ardalán A, Nizard P, Corré A, Devauchelle B, Martin Denavit T, Nouchy M, Malan V, Taillemite JL, Portnoi MF. 2004. Functional disomy of Xp including duplication of DAX1 gene with sex reversal due to t(X;Y)(p21.2;p11.3). *Am J Med Genet A*. 128(3): 325-330.
- Scherer G, Held M, Erdel M, Meschede D, Horst J, Lesniewicz R, Midro AT. 1998. Three novel SRY mutations in XY gonadal dysgenesis and the enigma of XY gonadal dysgenesis cases without SRY mutations. *Cytogenet Cell Genet*. 80(1-4): 188-92.
- Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. 2000. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*. 127:65-73.
- Sekido R, Bar I, Narváez V, Penny G, Lovell Badge R. 2004. SOX9 is up regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol*. 274(2): 271-279.
- Sinclair A, Berta P, Palmere M, Hawkins J, Griffiths B, Dmith M J, Friscauf A, Lovell Badge R, Goodfellow P. 1990. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature*. 77: 240-244.
- Tevosian S, Albrech K, Crispino J, Fujiwara Y, Eicher E, Orkin S. 2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 y FOG2. *Development*. 129: 4627-4634.
- Tian Q, Yao F, Sha G, Huang S, Tseng H, Schindler AE. 2009. Genotyping of a Chinese family with 46, XX and 46, XY 17-hydroxylase deficiency, *Gynecol Endocrinol* 25(8): 485-490, 2009.
- Tilmann C, Capel B. 1999. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development*. 126(13): 2883-2890.

- Vilain E. 2002. Anomalies of human sexual development: clinical aspects and genetic analysis. *Novartis Found Symp.* 244: 43-53; discussion 53-6, 79-85, 253
- Vincent Guguère. 1999. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocrine Reviews*; 20(5): 689-725.
- Wagner P, Kernen P, Hegner M, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120..
- Wilson J, Foster D, Williams Textbook of Endocrinology, Ed. Saunders, 9<sup>a</sup> ed, 1819 pp.
- Yang J, Cui B, Yang J, Cui B, Sun S, Shi T, Zheng S, Bi Y, Liu J, Zhao Y, Chen J, Ning G, Li X. 2006. Phenotype-genotype correlation in eight chinese 17-Hydroxylase/17,20 lyase-deficiency patients with five novel mutations of CYP17A1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 91(9):3619–3625.
- Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER, 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X linked adrenal hypoplasia congenital. *Nature.* 372(6507): 635-641.
- Zarkower D. 2001. Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet.* 2(3): 175-185.
- Zenteno-Ruiz JC, Kofman-Alfaro S, Mendez JP. 2001. 46,XX sex reversal. *Arch. Med. Res.* 32: 559-566