

Determinazione e differenziazione sessuale

Paola Grammatico, Silvia Majore

Genetica, Ospedale San Camillo-Forlanini, Università Sapienza, Roma

INTRODUZIONE

Lo “sviluppo sessuale” definisce l’insieme degli eventi biologici che conducono all’acquisizione differenziale, morfologica e funzionale, dei caratteri sessuali negli individui di sesso femminile e maschile, prerogativa necessaria a garantire la riproduzione e, con questa, il mantenimento della specie. Si realizza attraverso complesse reti di segnali sequenziali geneticamente determinati, dose- e tempo-dipendenti, che nell’uomo differiscono nei due sessi sin dalla VII settimana dello sviluppo embrionale, e termina alla pubertà con l’acquisizione della capacità riproduttiva (1,2).

Nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, prima che la differenziazione delle gonadi diverga in senso maschile o femminile, ha luogo, in entrambi i sessi, la formazione di strutture primordiali bipotenti a controllo genico sesso-indipendente (3).

Lo sviluppo sessuale dimorfico comprende due processi, distinti ma sequenziali (4,5):

- la “determinazione sessuale” indirizza la differenziazione sesso-specifica della gonade in relazione al sesso cromosomico stabilitosi al momento della fecondazione;
- la “differenziazione sessuale”, che dipende dalla presenza o meno del testicolo nella fase dello sviluppo intra-uterino (differenziazione primaria), comprende la formazione dei dotti genitali e dei genitali esterni e, in seguito, le modificazioni sesso-specifiche che si verificano alla pubertà.

SVILUPPO DELLA GONADE INDIFFERENZIATA

Le gonadi si formano, in entrambi i sessi, nell’ambito del sistema uro-genitale in via di sviluppo. Quest’ultimo, a sua volta, origina dal mesoderma intermedio, da cui si differenziano in sequenza cranio-caudale il pronefro, il mesonefro e il metanefro. La morfogenesi del primordio gonadico bipotente ha inizio in entrambi i sessi intorno alla IV settimana di gestazione, quando compare la cresta genitale, struttura pari costituita da un ispessimento della regione mediale del mesonefro e dalla proliferazione dell’epitelio celomatico sovrastante.

Il primordio gonadico, morfologicamente identico nei due sessi, è costituito da cellule celomatiche che formano uno strato superficiale (*cortex*) e da una regione interna, detta *medulla*.

Quest'ultima contiene cellule provenienti dal mesonefro e cellule dell'epitelio celomatico, che, grazie alla frammentazione della membrana basale, invadono la *medulla* e si organizzano in cordoni compatti (cordoni sessuali primitivi). Infine, nell'ambito del primordio gonadico compaiono le cellule germinali primordiali (protogoni), migrate dalla parete del sacco vitellino verso la seconda metà della V settimana di gestazione (6).

Questa prima fase dello sviluppo gonadico si realizza grazie all'azione di molteplici geni, alcuni dei quali partecipano alla formazione di più organi, derivati o meno dal mesoderma intermedio. Tra questi, è stato a oggi attribuito un ruolo primario a (7):

- *GATA4*, che codifica per un fattore di trascrizione essenziale per l'iniziale sviluppo di molti organi, tra cui il cuore, è il gene che probabilmente dà inizio alla formazione della cresta gonadica;
- *EMX2* è coinvolto nella formazione del sistema nervoso centrale e dell'intero sistema urogenitale;
- *WT1* è un gene la cui azione è essenziale nelle prime fasi della nefrogenesi e che interviene attivamente nello sviluppo del testicolo, oltre che del primordio gonadico;
- *LHX9* svolge il suo ruolo a monte di *SF1*, gene inizialmente attivo nei primordi gonadici e surrenalici di entrambi i sessi e che in seguito, nel corso della formazione della gonade maschile e femminile, si esprime con modalità dimorfica;
- *CBX2* è anch'esso un gene correlato allo sviluppo del primordio gonadico, ma che si esprime anche nelle fasi successive della differenziazione gonadica.

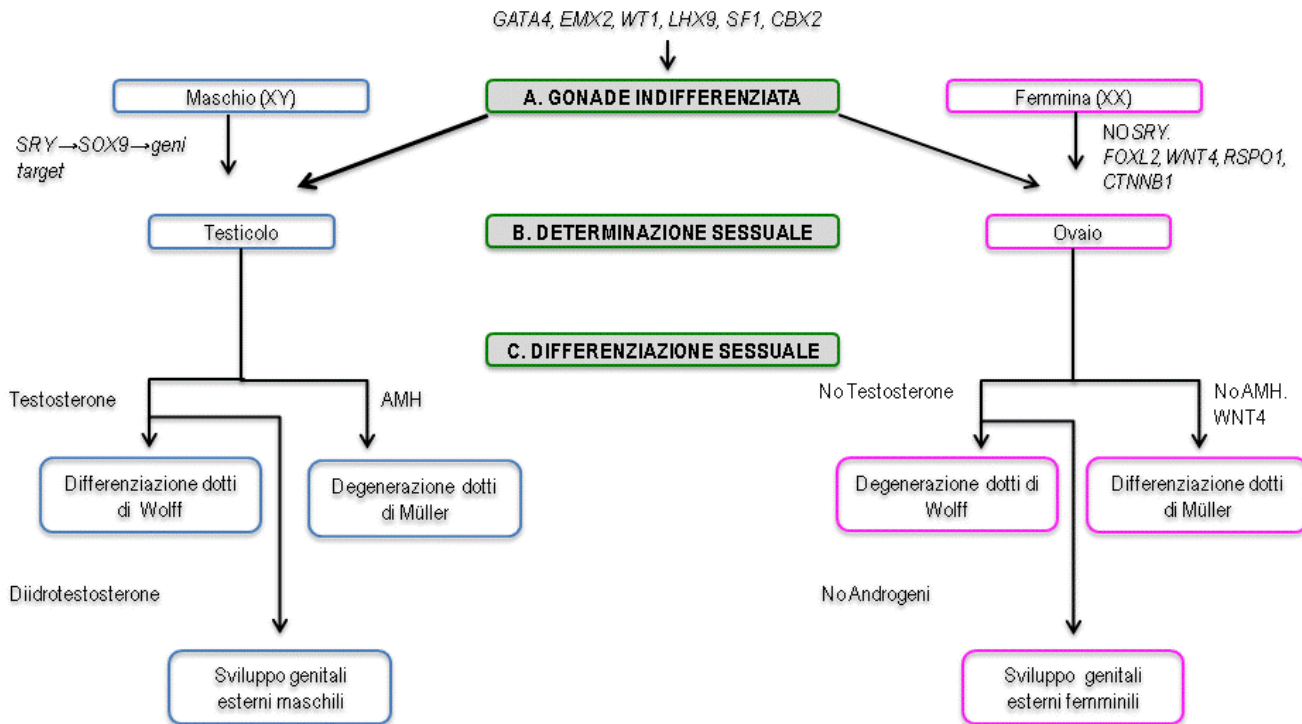


Figura 1. Sviluppo sessuale nel maschio e nella femmina. A: vengono indicati i principali geni coinvolti nella formazione del primordio gonadico bipotente. B: la determinazione sessuale è avviata nel maschio dal gene *SRY*, il cui principale bersaglio è *SOX9*. Questo, a sua volta, attiva l'espressione di molteplici geni target. In assenza di *SRY* e in presenza di 2 cromosomi X, l'azione di più geni determina lo sviluppo dell'ovaio. C: i fattori prodotti dal testicolo promuovono nel maschio lo sviluppo dei dotti di Wolff e dei genitali esterni e la degenerazione dei dotti di Müller. In assenza di ormoni maschili, in un ambiente estrogenizzato avviene la regressione dei dotti di Wolff e lo sviluppo differenziato dei dotti di Müller e dei genitali esterni femminili. Il gene *WNT4* e altri fattori sono coinvolti nello sviluppo dei dotti genitali femminili.

DETERMINAZIONE SESSUALE

La determinazione sessuale si riferisce a quel processo per cui lo stesso organo primordiale viene indotto, a seconda dell'assetto dei cromosomi sessuali, a differenziarsi in testicolo o ovaio. Nei mammiferi lo sviluppo differenziale delle gonadi è controllato da numerosi geni, la cui espressione, "dose- e tempo-specifica", promuove lo sviluppo di un sesso gonadico e/o antagonizza quello opposto. La successiva differenziazione sesso-specifica, che porta all'acquisizione fenotipica e funzionale dei caratteri maschili o femminili, dipende dalla corretta realizzazione di questo primo processo.

Determinazione testicolare

È noto da tempo (8,9) che *SRY*, localizzato nel braccio corto del cromosoma Y, rappresenta il gene della determinazione del sesso maschile. Infatti, la sua attivazione, ristretta a un preciso

spazio temporale e dose-dipendente, è in grado di avviare, nella cresta genitale di embrioni 46,XY, un peculiare pattern a cascata di espressione genica, che coinvolge molti fattori di trascrizione e che produce la progressiva differenziazione morfologica e funzionale del primordio gonadico in testicolo e, allo stesso tempo, inibisce lo sviluppo della gonade femminile. Al contrario, in assenza di *SRY* e in presenza di due cromosomi X, prendono il sopravvento i pattern molecolari femminili, consentendo lo sviluppo dell'ovaio. A partire dalla VI settimana dalla fecondazione nell'embrione XY, poco dopo l'inizio dell'attivazione del gene *SRY*, si compie rapidamente la progressiva differenziazione della gonade primordiale bipotente in testicolo (2). Tale processo, a differenza di quanto avviene nella differenziazione ovarica, non viene alterato dall'eventuale assenza dei protogoni, che, quando fisiologicamente presenti, nella gonade determinata in senso maschile migrano dal *cortex* nei cordoni sessuali primari della *medulla*. Morfologicamente, la differenziazione del primordio gonadico in testicolo è innanzitutto caratterizzata da un significativo aumento di dimensioni dei cordoni sessuali primari, i quali si organizzano in strutture che costituiscono l'abbozzo dei tubuli seminiferi. Nel contesto di tali cordoni le cellule epiteliali si differenziano progressivamente in cellule del Sertoli. L'interstizio tra i cordoni viene invece invaso da vari tipi cellulari provenienti dal mesonefro, quali cellule mioidi che circondano i cordoni sessuali, cellule endoteliali e cellule mio-epiteliali, che nell'insieme formano lo stroma testicolare. Cellule mesenchimali della gonade primordiale si differenziano a loro volta in cellule del Leydig. Le cellule del Sertoli, individuabili prima delle cellule del Leydig, agiscono come centro organizzatore della gonade maschile, producono varie sostanze e, tra queste, l'ormone anti-Mülleriano (AMH) e l'inibina B. Successivamente (IX-X settimana), le cellule steroidogeniche del Leydig producono a loro volta steroidi androgeni e Insulin Like Factor 3 (INSL3) (10). Altri eventi fondamentali nell'organo-genesi testicolare sono la formazione della rete testis, a partire dalla porzione più interna dei cordoni sessuali, e la differenziazione dei duttuli efferenti, derivati dai tubuli mesonefrici (che conetteranno la rete testis ai derivati del dotto mesonefrico). Infine, i cordoni sessuali perdono il loro contatto con il *cortex*, tramite la formazione di un denso strato connettivo, denominato tunica albuginea.

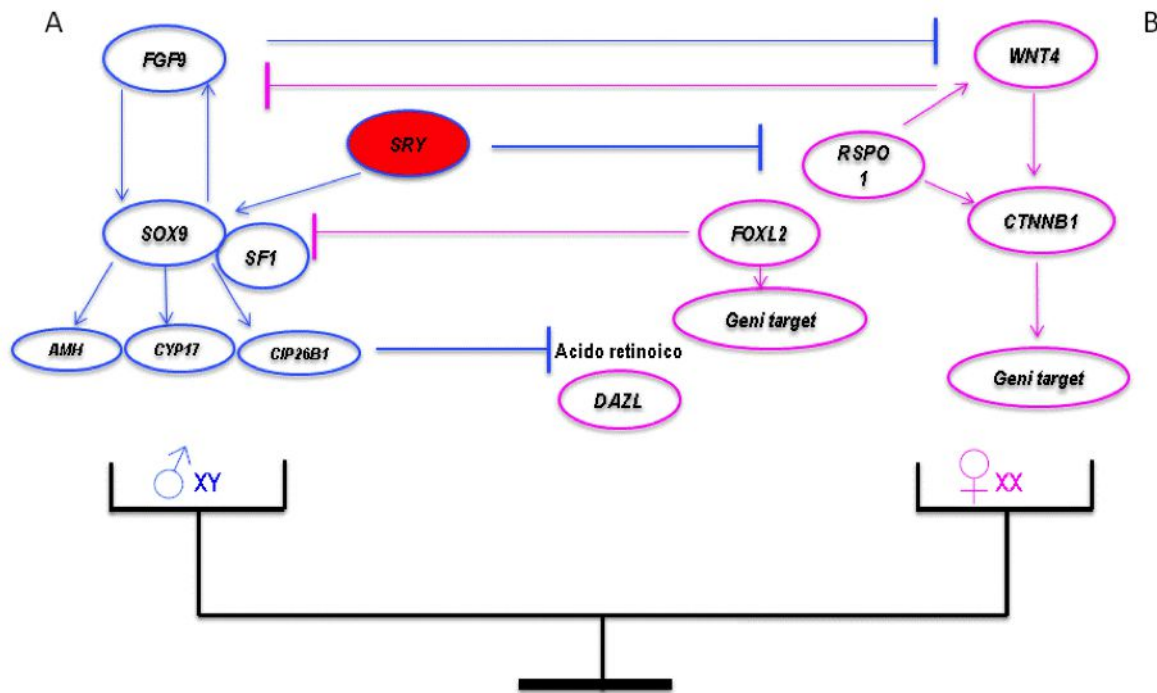


Figura 2. Segnali opposti regolano la determinazione del sesso nel primordio gonadico o bipotente XY e XX. A: nel maschio *SRY* agisce da interruttore genetico e dà inizio al pathway differenziativo in direzione maschile, creando uno sbilanciamento fra segnali opposti, mediato dall'attivazione di *SOX9*. *SOX9* upregola positivamente *FGF9*, il quale mantiene a sua volta l'espressione di *SOX9*, formando un circuito positivo nelle gonadi XY. In aggiunta *FGF9* inibisce *WNT4*, gene coinvolto nella formazione dell'ovaio. Diversi segnali molecolari, tra cui il prodotto di *SRY*, reprime l'espressione di *RSP01*, uno degli induttori dello sviluppo ovarico. *CYP26B1* si oppone all'inizio della meiosi mediata dall'acido retinoico, determinandone la degradazione. B: nella determinazione ovarica, verosimilmente non indotta da un unico gene, l'assenza di un segnale positivo per il circuito fra *SOX9* e *FGF9* permette l'iper-espressione di *WNT4* e del suo gene target *CTNNB1*. *WNT4* reprime *FGF9*, permettendo quindi l'attivazione di pattern molecolari di tipo femminile. L'inibizione dello sviluppo testicolare è anche mediata dall'azione di *FOXL2*, che reprime *SOX9* e *SF1*. La mancata espressione di *CYP26B1*, in grado di degradare l'acido retinoico, rende possibile l'entrata in meiosi delle cellule germinali dell'ovaio durante lo sviluppo intra-uterino.

Le vie molecolari che regolano la differenziazione testicolare sono state in buona parte messe in luce e comprendono, dopo l'attivazione del gene *SRY* e il raggiungimento di una soglia critica della sua proteina nel corso di una stretta finestra temporale, l'attivazione di un articolato pattern genico specifico per il sesso maschile. Il principale bersaglio di *SRY* è oggi ritenuto essere *SOX9* (17q24.3-q25.1), gene che gioca un ruolo chiave nello sviluppo testicolare e viene espresso con modalità distintamente dimorfica nel corso dell'intera gonado-genesi sesso-specifica. La sintesi della proteina *SOX9*, espressa a bassi livelli nel primordio gonadico bipotente, aumenta considerevolmente nella gonade XY poco dopo l'attivazione di *SRY* e si mantiene elevata anche dopo il breve periodo in cui agisce quest'ultimo gene. Nella gonade XX, al contrario, l'espressione di *SOX9* si esaurisce con l'inizio della determinazione ovarica, giacché regolata negativamente da molteplici geni, compreso *DAX1*, che promuovono il differenziamento ovarico. A sua volta, la proteina *SOX9*, prodotta prevalentemente nelle cellule del Sertoli, dà inizio all'espressione di geni che codificano per molecole segnale attive a livello

testicolare, quali *FGF9*, *FGFR2*, *AMH*, *VNN*, *PGDS*, *CBLN4* e *DHH*, e regola in senso maschile quella di alcuni dei geni già coinvolti nello sviluppo del primordio gonadico, come ad esempio *WT1* e *SF1* (7,11).

Il compimento della differenziazione testicolare viene reso possibile anche dal fatto che nella gonade specificata in senso maschile si stabiliscono circuiti a feed-back positivo (es. tra *SOX9* e *FGF9*) che mantengono l'espressione di *SOX9*, e quindi dei suoi numerosi geni target, e inibiscono quella di geni coinvolti nello sviluppo dell'ovaio (es *WNT4*).

Determinazione ovarica

L'inizio dello sviluppo delle ovaie dal primordio gonadico bipotente ha inizio una settimana più tardi rispetto ai testicoli. È un processo notevolmente più lento, che si realizza solo in presenza dei protogoni, necessari per la formazione dell'unità anatomico-funzionale dell'ovaio stesso, ovvero il follicolo.

Gli eventi morfologici che segnano la determinazione in senso ovarico della gonade primordiale sono, innanzitutto, la netta diminuzione delle dimensioni della *medulla*, nell'ambito della quale i cordoni sessuali primari si disgregano e vengono sostituiti da stroma vascolare. Al contrario, a livello del *cortex* le cellule dell'epitelio celomatico continuano a proliferare e si organizzano in cordoni sessuali secondari (corticali) che in seguito circondano i protogoni. Questi ultimi, a differenza di quanto avviene nella testicolo-genesi, tendono a non migrare nella *medulla* e sono inizialmente raggruppati in aggregati. In aggiunta, nelle fasi precoci della morfogenesi ovarica le cellule germinali mostrano una vivace attività mitotica (ovogoni). Verso la fine del III mese gli ovogoni vengono circondati da cellule epiteliali derivate dai cordoni sessuali secondari, che progressivamente si differenziano in cellule della granulosa (ritenute l'equivalente femminile delle cellule del Sertoli). Si costituiscono quindi i follicoli primordiali, strutture inizialmente composte da uno o più ovogoni uniti tra loro da ponti citoplasmatici e da un singolo strato di cellule della granulosa in via di differenziazione. A circa 24 settimane dopo la fecondazione, nelle cellule germinali ha inizio la prima divisione meiotica, che si blocca allo stadio di diplotene. Gli ovogoni si differenziano quindi in ovociti di prim'ordine, il cui destino è, nella maggior parte dei casi, la degenerazione apoptotica. I follicoli residui, all'interno dei quali tende man mano a essere presente un singolo oocita, entrano invece in uno stato di quiescenza, che perdura fino alla pubertà. A partire da questa fase della vita post-natale, in occasione di ciascun ciclo ovulatorio lo sviluppo di alcuni follicoli progredisce attraverso successivi stadi e si completa in una singola unità funzionale, nell'ambito della quale

l'ovocita porta a termine la prima divisione meiotica.

Anche la differenziazione ovarica viene attivamente regolata da molteplici segnali molecolari: l'espressione di alcuni geni favorisce lo sviluppo ovarico e allo stesso tempo inibisce la comparsa di componenti proprie della gonade maschile (12). Non sembrerebbe però esistere, come nel testicolo, un singolo gene in grado d'innescare una specifica cascata ovaio-specifica. Le più recenti acquisizioni suggeriscono che l'espressione dei geni coinvolti nella differenziazione ovarica si espliciti, invece, perlopiù parallelamente e attraverso circuiti indipendenti, che permettono ciascuno il realizzarsi di un diverso aspetto del suo sviluppo (11,13). Le conoscenze dei geni coinvolti nella determinazione e nella differenziazione della gonade femminile sono comunque ancora piuttosto limitate e frammentarie. È degno di nota il fatto che alcuni dei geni espressi a elevati livelli durante lo sviluppo ovarico non rimangono inattivi durante la testicolo-genesi. Ciò va a sostegno del concetto che la determinazione del sesso si realizza grazie a un raffinato e complesso controllo nella regolazione quantitativa oltre che qualitativa dell'espressione genica.

Il primo gene che risulta attivato all'inizio della gonado-genesi femminile è *DAZL*, il cui tradotto è verosimilmente coinvolto nell'induzione della meiosi negli ovogoni, quest'ultima principalmente mediata dall'acido retinoico (14). *FOXL2* è uno dei geni maggiormente espressi nelle gonadi XX e sembra esercitare un ruolo fondamentale nel promuovere lo sviluppo dell'ovaio e nel reprimere la formazione di elementi propri del testicolo, grazie a un meccanismo di antagonismo reciproco, che viene mantenuto nel corso di tutta la vita. Un importante ruolo nella formazione dell'ovaio è stato inoltre attribuito ai geni *WNT4*, *RSPO1* e *CTNNB1*, coinvolti in una cascata di segnali che produce l'attivazione della β -catenina (codificata da *CTNNB1*) e la conseguente regolazione positiva o negativa di una varietà di altri geni, molti ancora da identificare (15,16).

DIFFERENZIAZIONE SESSUALE

Con il processo di differenziazione sessuale si realizza lo sviluppo delle caratteristiche fenotipiche che contraddistinguono il sesso maschile e quello femminile. La sostanziale differenza nei due sessi risiede nel fatto che la fase intra-uterina della differenziazione del fenotipo sessuale, ovvero la morfogenesi degli ovidotti e dei genitali esterni, può realizzarsi, per il sesso maschile, solo a seguito della corretta formazione di un testicolo funzionante. Infatti, durante lo sviluppo embrionale il testicolo produce molteplici fattori, che dall'VIII settimana dirigono il successivo sviluppo dell'apparato riproduttivo in senso maschile. In mancanza di un

testicolo funzionante, indipendentemente da quale sia l'assetto dei cromosomi sessuali e finanche in assenza dell'ovaio, la differenziazione dell'apparato genitale avviene in senso femminile. Entrambi i tipi di gonade e i loro prodotti ormonali sono invece necessari, durante la pubertà, per lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari e per la funzionalità riproduttiva.

Sviluppo dei dotti genitali

Al pari di quanto avviene nelle gonadi, il processo di differenziazione sesso-specifica dei dotti genitali è preceduto dallo sviluppo, in entrambi gli embrioni XX e XY, di primordi sessualmente indifferenziati. Tali strutture, che originano dal mesonefro intorno alla VII settimana, sono rappresentate da due dotti pari e paralleli: il dotto mesonefrico di Wolff e il dotto para-mesonefrico di Müller.

Nel **testicolo** in via di sviluppo l'inizio della sintesi di AMH da parte delle cellule del Sertoli provoca la progressiva degenerazione e scomparsa dei dotti di Müller (17). Al contrario, il testosterone, che viene più tardi prodotto dalle cellule del Leydig, influenza positivamente lo sviluppo dei dotti di Wolff, che si differenziano in epididimi, vasi deferenti e vescichette seminali. A loro volta, gli epididimi si connettono al testicolo tramite i duttuli efferenti.

Durante lo sviluppo **femminile** non viene invece prodotto testosterone. Questo e probabilmente anche altri fattori provocano la regressione dei dotti di Wolff. Inoltre, in assenza di cellule del Sertoli produttrici di AMH, permangono i dotti di Müller. Dal loro successivo sviluppo, in parte mediato da *WNT4* (18), originano le tube (porzione prossimale) e, distalmente, l'abbozzo utero-vaginale, da cui si formano l'utero e il terzo prossimale della vagina.

Sviluppo dei genitali esterni

I genitali esterni, anch'essi inizialmente identici in tutti i feti, indipendentemente da quale sia il sesso cromosomico o gonadico, si sviluppano dal tubercolo genitale, dalle pieghe uro-genitali e dai rigonfiamenti genitali (labio-scrotali). La formazione di queste strutture indifferenziate, che avviene tra l'VIII e la XII settimana gestazionale, è in parte mediata dal gene *SHH* e coinvolge la cascata WNT/ β -catenina (19).

Nel feto di sesso **maschile**, sin dalla X-XIV settimana gestazionale e fino alla nascita, in presenza di adeguate quantità di diidro-testosterone (DHT), prodotto dalla conversione del testosterone ad opera dell'enzima 5 alfa-reduttasi, si viene a formare la prostata e si compie la progressiva mascolinizzazione dei genitali esterni (20): il tubercolo genitale dà origine al pene, le pieghe uro-genitali si fondono per formare l'uretra tubulare peniena e i rigonfiamenti genitali si

uniscono medialmente per formare la sacca scrotale. In questa, durante l'ultimo trimestre di gestazione si posiziona il testicolo, dopo la sua discesa, in parte guidata da INLS3 prodotto dalle cellule del Leydig (21). Oltre a essere il maggior determinante della differenziazione dei genitali esterni maschili (22), DHT è il principale responsabile, dalla pubertà in poi, dello sviluppo dei caratteri secondari nel maschio normale (23,24). Appare comunque ormai evidente che la differenziazione dei genitali esterni maschili non rappresenta un processo unicamente androgeno-dipendente, ma è controllata anche da altri ormoni, in particolare dagli estrogeni, e vede anche coinvolti meccanismi ormono-indipendenti (25).

Nella **femmina**, in assenza dell'effetto degli androgeni, il tubercolo genitale si trasforma nel clitoride, le pieghe uro-genitali si sviluppano nelle piccole labbra e i rigonfiamenti genitali danno origine alle grandi labbra. Il meato uretrale si colloca nel perineo e, infine, si formano i due terzi distali della vagina. Tutti questi eventi sono influenzati dall'ambiente materno, abbondantemente estrogenizzato.

Sebbene gli esatti meccanismi molecolari alla base della formazione dei genitali esterni non siano conosciuti in dettaglio, è indubbio che nell'acquisizione del fenotipo sessuale entrino in causa molti fattori e, tra questi, l'attività di diversi recettori steroidei (degli androgeni e degli estrogeni) e anche complesse interazioni epitelio-mesenchima, fondamentali per una coordinata e appropriata differenziazione dei genitali esterni (19).

BIBLIOGRAFIA

1. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* [2004, 5: 509-21](#).
2. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* [2007, 87: 1-28](#).
3. MacLaughlin DT, Donahoe PK. Sex determination and differentiation. *N Engl J Med* [2004, 350: 367-78](#).
4. Hughes IA. Intersex. *BJU Int* [2002, 90: 769-76](#).
5. Neri G, Opitz J. Syndromal (and nonsyndromal) forms of male pseudohermaphroditism. *Am J Med Genet* [1999, 89: 201-9](#).
6. Tanaka SS, Nishinakamura R. Regulation of male sex determination: genital ridge formation and Sry activation in mice. *Cell Mol Life Sci* [2014, 71: 4781-802](#).
7. Eggers S, Ohnesorg T, Sinclair A. Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat Rev Endocrinol* [2014, 10: 673-83](#).

8. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* [1990, 19: 240-4](#).
9. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, et al. 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* [1990, 346: 245-50](#).
10. Stukenborg JB, Colón E, Söder O. Ontogenesis of testis development and function in humans. *Sex Dev* [2010, 4: 199-212](#).
11. Schlessinger D, Garcia-Ortiz JE, Forabosco A, et al. Determination and stability of gonadal sex. *J Androl* [2010, 31: 16-25](#).
12. Hughes IA. Female development--all by default? *N Engl J Med* [2004, 351: 748-50](#).
13. Tevosian SG. Genetic control of ovarian development. *Sex Dev* [2013, 7: 33-45](#).
14. Lin Y, Gill ME, Koubova J, Page DC. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science* [2008, 322: 1685-7](#).
15. Chassot AA, Gregoire EP, Magliano M, et al. Genetics of ovarian differentiation: Rspo1, a major player. *Sex Dev* [2008, 2: 219-27](#).
16. Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Res* [2012, 20: 215-38](#).
17. Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* [1999, 99: 409-19](#).
18. Biason-Lauber A, Konrad D. WNT4 and sex development. *Sex Dev* [2008, 2: 210-8](#).
19. Blaschko SD, Cunha GR, Baskin LS. Molecular mechanisms of external genitalia development. *Differentiation* [2012, 84: 261-8](#).
20. Wilson JD, Griffin JE, George FW, Leshin M. The role of gonadal steroids in sexual differentiation. *Recent Prog Horm Res* 1981, 37: 1-39.
21. Hughes IA, Acerini CL. Factors controlling testis descent. *Eur J Endocrinol* [2008, 159 suppl 1: S75-82](#).
22. Wilson JD, George FW, Renfree MB. The endocrine role in mammalian sexual differentiation. *Recent Prog Horm Res* 1995, 50: 349-64.
23. Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [2011, 25: 221-38](#).
24. Bertelloni S, Dati E, Ghirri P, et al. Gestione clinica dei disturbi della differenziazione sessuale con cariotipo 46,XY: aspetti emergenti. *Prospettive in Pediatria* [2013, 41: 110-20](#).

25. Weiss DA, Rodriguez E Jr, Cunha T, et al. Morphology of the external genitalia of the adult male and female mice as an endpoint of sex differentiation. *Mol Cell Endocrinol* [2012, 354: 94-102](#).