

Análisis del perfil de metilación CpG del ADN genómico de una población con incongruencia de género

Autora: Karla del Valle Ramírez Olivero

Tesis doctoral UDC / 2021

Directores: Eduardo J. Pásaro Méndez y Rosa M^a Fernández García

Tutora: Rosa M^a Fernández García

Departamento de Psicología. Área Psicobiología

Programa de doctorado en Desarrollo Psicológico, Aprendizaje y Salud
(Interuniversitario)



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Los directores de la tesis doctoral titulada *Análisis del perfil de metilación CpG del ADN genómico de una población con incongruencia de género*, realizada por la licenciada en Biología Karla del Valle Ramírez Olivero, acreditan que cumple los requisitos para optar al grado de doctor por la Universidad de A Coruña.

Dr. Eduardo J. Pásaro Méndez
Catedrático de Universidad
Departamento de Psicología. UDC

Dra. Rosa M^a Fernández García
Profesora Titular de Universidad
Departamento de Psicología. UDC

A Coruña, 25 de julio de 2021

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Psicobiología del departamento de Psicología, en la Facultad de Ciencias de la Educación de la UDC. La investigación fue financiada a través de las siguientes ayudas:

Proyecto “Estudio genético y epigenético del tratamiento hormonal cruzado en una población transexual: Un estudio longitudinal”. Código: PGC2018-094919-B-C22. Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación MINCIN.

Proyecto “Ayudas para la consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del Sistema Universitario de Galicia (modalidad de Grupos de Potencial de Crecimiento). Códigos: ED431B 2016/013 y ED431B 2019/02. Entidad financiadora: Xunta de Galicia-Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria.

El conjunto de datos de microarray utilizados en la presente investigación se han subido al repositorio GEO: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE173382> y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE173717>

Los resultados de esta investigación fueron publicados como **artículos científicos** en las siguientes revistas:

Rosa Fernández, **Karla Ramírez**, Esther Gómez-Gil, Joselyn Cortés-Cortés, Mireia Mora, Gloria Aranda, Enrique Delgado-Zayas, Isabel Esteva, MariCruz Almaraz, Antonio Guillamon and Eduardo Pásaro (2020): Gender-affirming hormone therapy modifies the CpG methylation pattern of the ESR1 gene promoter after six months of treatment in trans men. *The Journal of Sexual Medicine*. 17:1795-1806. doi: <http://doi.org/10.1016/j.jsxm.2020.05.027>

Karla Ramírez, Rosa Fernández, Sarah Collet, Meltem Kiyar, Enrique Delgado-Zayas, Esther Gómez-Gil, Guy T'Sjoen, Antonio Guillamon, Sven Mueller and Eduardo Pásaro. (2021): Epigenetics is implicated in the basis of gender incongruence. An epigenome-wide association analysis. *Frontiers in Neuroscience*. *Enviada, pendiente de evaluación*

Karla Ramírez, Rosa Fernández, Meltem Kiyar, Sarah Collet, Enrique Delgado-Zayas, Esther Gómez-Gil, Guy T'Sjoen, Antonio Guillamon, Sven Mueller and Eduardo Pásaro. (2021): Six months of gender affirming hormone therapy modifies the epigenome in the transgender population. *Frontiers in Neuroscience*. *Enviada, pendiente de evaluación*.

Y como comunicaciones en los siguientes congresos:

Rosa Fernández, Sarah Collet, **Karla Ramírez**, Meltem Kiyar, Enrique Delgado-Zayas, Guy T'Sjoen, Antonio Guillamon, Sven Mueller and Eduardo Pásaro. The (epi)genetic basis of gender incongruence. eECE 2021, 23rd European Congress of Endocrinology, 22-26 mayo 2021. *Endocrine Abstracts* (2021) 73 AEP451 | DOI: 10.1530/endoabs.73.AEP451

Rosa Fernández, **Karla Ramírez**, Meltem Kiyar, Sarah Collet, Enrique Delgado-Zayas, Esther Gómez-Gil, Guy T'Sjoen, Antonio Guillamon, Sven C. Mueller, Eduardo Pásaro. (2021). A prospective global CpG methylation analysis in a transgender population pre vs post six months of gender-affirming hormone treatment. 23rd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience (ISDN2021). 25-27 mayo 2021.

Rosa Fernández, Meltem Kiyar, **Karla Ramírez**, Sarah Collet, Enrique Delgado-Zayas, Esther Gómez-Gil, Guy T'Sjoen, Antonio Guillamon, Sven Mueller and Eduardo Pásaro (2021): A prospective global CpG methylation analysis in a transgender population pre vs post six months of cross-sex hormone therapy. 2021 IASR (International Academy of Sex Research) Conference, 27-29 julio 2021.

Rosa Fernández, **Karla Ramírez**, Enrique Delgado-Zayas, Joselyn Cortés-Cortés, Esther Gómez-Gil, Isabel Esteva, MariCruz Almaraz, Antonio Guillamon and Eduardo Pásaro. An updated interpretation of sexual differentiation of the brain in mammals: genetic, epigenetic and sexual hormone mechanisms. I Jornada del Grup de Treball en Psiconeuroendocrinologia (PNECAT): Actualització en esteroides sexuals i psicopatologia. Barcelona, 21 febrero 2020.

Karla Ramírez, Rosa Fernández, Enrique Delgado Zayas, Joselyn Cortés-Cortés y Eduardo Pásaro. La adolescencia vista desde la epigenética. XV Congreso Internacional Gallego-Portugués de Psicopedagogía. A Coruña, 4-6 septiembre 2019.

Enrique Delgado, Esther Gómez-Gil, Rosa Fernández, **Karla Ramírez**, Joselyn Cortés-Cortés, Isabel Esteva, MariCruz Almaraz, Antonio Guillamon and Eduardo Pásaro. Quality of life and Personality analysis in a transsexual population. XV Congreso Internacional Gallego-Portugués de Psicopedagogía. A Coruña, 4-6 septiembre 2019.

Rosa Fernández, Enrique Delgado-Zayas, **Karla Ramírez**, Joselyn Cortés-Cortés, Esther Gómez-Gil, Isabel Esteva, MariCruz Almaraz, Antonio Guillamón and Eduardo Pásaro. Estrogen receptor alpha gene (ESR1) promoter region analysis in a population with Gender Dysphoria. III International Congress of Psychobiology. doi: 10.13140/RG.2.2.12052.76166. Granada, 29-31 de mayo de 2019.

Karla Ramírez, Rosa Fernández and Eduardo Pásaro. Analysis of the CpG methylation profile of the promoter regions of the *ESR1* gene in a population with Gender Dysphoria. Training Session in Psychobiology (Spanish Society of Psychobiology). Madrid, 05 octubre 2018.

Andrea Diez Juan, **Karla Ramírez**, Joselyn Cortés-Cortés, Rosa Fernández, Antonio Guillamón, Esther Gómez-Gil, Mireia Mora, Gloria Aranda and Eduardo Pásaro. Methylation analysis of the estrogen receptor alpha (ESR1) promoter region in a population with Gender Dysphoria undergoing hormone replacement. 2018 IASR (International Academy of Sex Research) Conference. Madrid, 17-20 julio 2018.

Rosa Fernández, Andrea Diez Juan, **Karla Ramírez**, Joselyn Cortés-Cortés, Esther Gómez-Gil, Mireia Mora, Gloria Aranda, Antonio Guillamón A. El tratamiento hormonal cruzado modifica el grado de metilación de la región promotora del gen *ESR1* en la población con Disforia de Género. I Foro clínico de identidad de género y últimos avances en cirugía Trans. Valencia, 14-15 junio 2018.

Dedicatoria

*A mis padres y abuelos
A mis hijos
A Karola y a Alberto
A Coco y Mila*

Agradecimientos

Desde que decidí comenzar este camino, no me imaginé que sería un camino con muchos obstáculos pero que a la vez me permitiría fortalecer mis habilidades, tanto a nivel académico como profesional. Es por esta razón que quisiera expresar mi agradecimiento a:

A mis directores por ofrecerme todo el apoyo académico, científico y administrativo que necesitaba para iniciar mi recorrido académico.

Al doctor Eduardo Pásaro, ejemplo de serenidad y de poder resolutivo, gracias por darme la oportunidad de entrar al laboratorio y alentarme a seguir mi camino hacia el doctorado sin desvanecerme a pesar de todas las dificultades.

A la doctora Rosa Fernández ejemplo de lucha, constancia y dedicación. Gracias por ser esa mano amiga que siempre estaba allí para sujetarme cuando el camino se me hacía empinado. Gracias por darme ese apoyo tanto a nivel académico como personal.

Al doctor *Antonio Guillamón* del departamento de Psicobiología, de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), por ser el apoyo crítico para la discusión de los resultados obtenidos.

A la doctora *Esther Gómez-Gil* de la Unidad de Identidad de Género del Hospital Clínic de Barcelona, por ser el apoyo incondicional al que siempre se puede recurrir para la discusión de los resultados aportando esa objetividad analítica.

A las doctoras Mireia Mora y Gloria Aranda del departamento de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínic de Barcelona, por su apoyo en la obtención de las muestras españolas.

A Sarah Collet, Meltem Kiyar, Guy T'Sjoen y Sven Mueller del Department of Experimental and Clinical Health Psychology, de la Universidad de Ghent (Bélgica), por proporcionarnos las muestras de origen belga y por su inestimable colaboración en la discusión de los resultados.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por darme la oportunidad de continuar con este recorrido académico.

Al laboratorio de Neurofisiología del IVIC por enseñarme a dar mis primeros pasos en el recorrido científico y enseñarme a conocer mi pasión por la investigación.

A la familia Vázquez Rodríguez por adoptarme sin ningún tipo de condición y hacerme sentir como uno más de ellos desde el principio. Sin ustedes no hubiese podido alcanzar esta meta... GRACIAS

Al Doctor Vázquez por recordarme cada día de mi vida que los proyectos no se posponen, y que se deben salir de las preocupaciones lo más rápido posible.

A la familia Pardo Díaz por su empatía ante mis planteamientos, y por hacerme sentir como en casa.

Y, por último, le agradezco a todas las personas que formaron, o forman, parte de mi vida porque sin su aporte no hubiese podido llegar a este momento.

RESUMO	17
RESUMEN	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. La genética y la epigenética	25
1.2. Mecanismos epigenéticos.....	27
<i>Factores de transcripción</i>	27
Dirigida por el ARN no codificante.....	28
<i>Arquitectura de la cromatina</i>	29
Modificaciones de las histonas	29
La remodelación de los nucleosomas	30
Metilación del ADN.....	31
1.3. Dimorfismo cerebral	32
<i>Determinación del sexo</i>	33
Relación de las hormonas sexuales y el dimorfismo cerebral	34
Dimorfismo cerebral y testosterona.....	37
Dimorfismo cerebral y estrógeno	38
<i>Dimorfismo cerebral, neurotransmisores y neuroesteroides</i>	40
<i>Dimorfismo cerebral vs teoría del mosaico</i>	42
<i>Relación entre el dimorfismo cerebral y la metilación del ADN</i>	43
<i>Género y sexo</i>	45
1.4. Incongruencia de género	46
<i>Evolución conceptual de la incongruencia de género</i>	46
<i>Prevalencia de la incongruencia de género</i>	47
<i>Origen de la incongruencia de género</i>	48
<i>Tratamientos masculinizantes o feminizantes</i>	48
1.5. La incongruencia de género y la metilación del ADN	50
2. OBJETIVOS	53
PRIMER ESTUDIO	55
<i>Objetivos específicos</i>	55
SEGUNDO ESTUDIO	55
<i>Objetivos específicos:</i>	55
TERCER ESTUDIO.....	56
<i>Objetivos específicos:</i>	56
3. MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1. Primer estudio de metilación. doi: 10.1016/j.jsxm.2020.05.027.....	59

<i>Sujetos</i>	59
<i>Tratamiento hormonal para la afirmación de género (GAHT)</i>	60
<i>Extracción de sangre</i>	60
<i>Secuenciación genómica por bisulfito</i>	61
<i>Amplificación del fragmento RIII por PCR</i>	61
<i>Clonación y Secuenciación</i>	63
<i>Análisis Estadístico</i>	63
3.2. Estudios de metilación del ADN global mediante microarray	64
<i>Sujetos</i>	64
<i>Tratamiento hormonal cruzado para la reafirmación de género (GAHT)</i> ..	65
<i>Análisis de metilación del ADN genómico</i>	65
<i>Análisis estadístico</i>	67
<i>Controles aplicados para excluir asociaciones con el tabaquismo y la edad</i>	67
<i>Análisis de enriquecimiento funcional y regulatorio</i>	68
4. RESULTADOS	69
4.1. Estudio de metilación del fragmento RIII de la región promotora del gen del receptor de estrógenos α	71
Análisis comparativo del grado de metilación entre hombres y mujeres cis	76
Análisis comparativo del grado de metilación en mujeres y hombres trans, antes del tratamiento hormonal cruzado.....	77
Análisis comparativo del grado de metilación en las mujeres y los hombres trans, antes y después del tratamiento hormonal cruzado	78
Análisis comparativo del grado de metilación entre ambas poblaciones cis frente a las mujeres trans, antes y después del tratamiento hormonal.....	79
Análisis comparativo del grado de metilación entre ambas poblaciones cis y hombres trans, antes y después del tratamiento hormonal	80
4.2. Estudios de metilación del ADN global mediante microarray	82
<i>Estudio de metilación global CpG antes del GAHT</i>	82
Análisis de los hombres cis versus trans, según la variable sexo natal asignado.....	85
Análisis de las mujeres cis versus trans, según la variable sexo natal asignado.....	89
Análisis de enriquecimiento funcional y regulatorio	90

<i>Estudio de metilación global CpG, antes vs después del GAHT</i>	95
Hombres trans: antes vs después del GAHT	97
Mujeres trans: antes vs después del GAHT	97
Hombres cis vs mujeres trans (antes y después de GAHT).....	114
Mujeres cis frente a hombres trans (antes y después del GAHT).....	119
Análisis de enriquecimiento funcional y regulatorio	129
5. DISCUSIÓN	131
5.1. Estudio de metilación del fragmento RIII de la región promotora del receptor de estrógenos α	133
5.2. Estudios de metilación del ADN global mediante microarray.....	136
<i>Estudio de metilación antes del GAHT</i>	136
<i>Estudio de metilación antes vs después del GAHT</i>	140
6. CONCLUSIONES	145
7. BIBLIOGRAFÍA	149

RESUMO

A incongruencia de xénero no CIE-11 (Clasificación Internacional de Enfermedades-11) caracterízase por “unha incongruencia persistente entre a experiencia individual de xénero e o sexo asignado ao nacer”. A súa orixe é complexa e multifactorial.

Obxectivo: A primeira parte da investigación centrouse na análise retrospectiva da metilación CpG (citosina-fosfato-guanina) do fragmento III (RIII) da rexión promotora do receptor de estróxenos α , nunha poboación de homes e mulleres con incongruencia de xénero, antes vs despois de seis meses de tratamento hormonal de afirmación de xénero (GAHT). A segunda parte da investigación centrouse na análise da metilación global utilizando o BeadChip de metilación de 850K de Illumina© Infinium, antes vs despois de seis meses de GAHT.

Material e métodos: A análise do perfil de metilación do RIII realizouse mediante secuenciación por bisulfito en 20 persoas cis xénero e 20 persoas trans xénero. Os ADNs tratáronse con bisulfito, se amplificaron, clonaron e secuenciaron. A análise estatística realizouse co programa QUMA (QUantification tool for Methylation Analysis).

A análise global de metilación realizouse en 16 persoas cis xénero e 16 trans xénero antes vs despois de seis meses de GAHT co BeadChip de metilación de 850K de Illumina© Infinium, despois da conversión con bisulfito. Os perfís de metilación analizáronse co programa Partek® Genomics Suite® mediante un ANOVA de 3 vías, comparando as poboacións por grupo, sexo e tratamento. Finalmente realizouse unha análise de enriquecemento co programa Partek® Pathway e a WebGestalt.

Resultados: A primeira parte do estudo mostrou (i) que en ambas poboacións (cis e trans), os homes e as mulleres tiñan patróns de metilación do RIII diferentes; (ii) que antes do tratamento GAHT, ambos grupos trans (homes e mulleres) presentaban perfís de metilación intermedios, non coincidentes coas poboacións cis; (iii) que o GAHT modificou o patrón de metilación do RIII cara a perfís máis similares ao xénero correspondente.

En canto ao estudo global de metilación, o principal resultado é que as poboacións cis e trans difiren no grao de metilación global antes do tratamento GAHT. Na poboación masculina (segundo a asignación ao nacer), atopáronse 22 illas CpGs que superaron ambos criterios estatísticos (FDR $p < 0,05$; *fold change* o incremento do cambio $\geq \pm 2$). Os CpGs máis significativos relacionáronse cos xenes *WDR45*, *SLC6A20*, *NHLH1*, *PLEKHA5*, *UBALD1*, *SLC37A1*, *ARL6IP1*, *GRASP* e *NCOA6*. Respecto a poboación feminina (segundo a asignación ao nacer) atopáronse 2 CpGs que pasaron ambos criterios estatísticos, pero ningún deles estaba situado en illas. Un destes CpGs, o relacionado co xene *MPPED2*, é compartido por homes e por mulleres trans. A análise de enriquecemento mostrou que estes xenes están involucrados en funcións importantes como a regulación negativa da expresión xénica (GO:0010629), o desenvolvemento do sistema nervioso central (GO:0007417), o desenvolvemento do cerebro (GO:0007420), a unión de ribonucleótidos (GO:0032553) e a unión do ARN (GO:0003723).

Ademais, o estudio do metiloma antes *vs* despois de seis meses de GAHT, revelou un descenso significativo da metilación en ambas poboacións trans. Os homes trans mostraron variacións en 95 illas CpGs, das cales o 72,63% diminuíron no grao de metilación despois do tratamento. Respecto as mulleres trans, seis meses de GAHT modificaron a metilación en 78 illas CpGs, das cales o 85,9% estaban hipometiladas tras o tratamento. Por tanto, en ambas poboacións trans, o GAHT induciu unha redución significativa da metilación.

Palabras Crave: disforia de xénero, incongruencia de xénero, epixenética, *ESRI*, metilación, RIII.

RESUMEN

La incongruencia de género en el CIE-11 (Clasificación Internacional de Enfermedades-11) se caracteriza por “una incongruencia persistente entre la experiencia individual de género y el sexo asignado al nacer”. Su origen es complejo y multifactorial.

Objetivo: La primera parte de la investigación se centró en el análisis retrospectivo CpG (citosina-fosfato-guanina) del fragmento III (RIII) de la región promotora del receptor de estrógenos α , en una población de hombres y mujeres con incongruencia de género, antes vs después de seis meses de tratamiento hormonal de afirmación de género (GAHT). La segunda parte de la investigación se centró en el análisis de la metilación global CpG utilizando el BeadChip de metilación de 850k de Illumina© Infinium.

Material y métodos: El análisis del perfil de metilación del RIII se realizó mediante secuenciación por bisulfito en 20 personas cis género y 20 personas trans género antes vs después del GAHT. Los ADNs se trataron con bisulfito, se amplificaron, clonaron y secuenciaron. El análisis estadístico se realizó con el programa QUMA (QUantification tool for Methylation Analysis).

El análisis global de metilación se realizó en 16 personas cis género y 16 personas trans género con el BeadChip de metilación de 850K de Illumina© Infinium, después de la conversión con bisulfito. Los perfiles de metilación se analizaron con el programa Partek® Genomics Suite® mediante un ANOVA de 3 vías comparando las poblaciones según grupo, sexo y tratamiento. Finalmente se realizó un análisis de enriquecimiento con el programa Partek® Pathway y la WebGestalt.

Resultados: La primera parte del estudio mostró (i) que en ambas poblaciones, cis y trans, los hombres y las mujeres presentan patrones de metilación diferentes del RIII; (ii) que antes del tratamiento GAHT, ambos grupos trans (hombres y mujeres) presentaban perfiles de metilación intermedios, no coincidentes con las poblaciones cis; (iii) que el GAHT modificó el patrón de metilación del RIII hacia perfiles más similares al género correspondiente.

En cuanto al estudio de metilación global, el principal resultado es que las poblaciones cis y trans difieren en el grado de metilación antes del tratamiento GAHT. En la población masculina (según el sexo natal asignado), se encontraron 22 islas CpGs que pasaron los criterios estadísticos (FDR $p < 0.05$; *fold change* o incremento del cambio $\geq \pm 2$). Los CpGs más significativos se relacionaron con los genes *WDR45*, *SLC6A20*, *NHLH1*, *PLEKHA5*, *UBALD1*, *SLC37A1*, *ARL6IP1*, *GRASP* y *NCOA6*. En cuanto a la población femenina (según el sexo natal asignado), se encontraron 2 CpGs que pasaron los criterios estadísticos, pero ninguno de ellos se ubicaba en islas. Uno de estos CpGs, el relacionado con el gen *MPPED2*, es compartido por hombres y mujeres trans. El análisis de enriquecimiento mostró que estos genes están involucrados en funciones importantes como la regulación negativa de la expresión génica (GO: 0010629), el desarrollo del sistema nervioso central (GO: 0007417), el desarrollo del cerebro (GO: 0007420), la unión de ribonucleótidos (GO: 0032553) y la unión de ARN (GO: 0003723).

Además, seis meses de tratamiento GAHT produjo una disminución significativa en la metilación en ambas poblaciones trans. Los hombres trans mostraron variaciones en 95 islas CpG, de las cuales el 72,63% disminuyó el grado de metilación después del tratamiento. En cuanto a las mujeres trans, seis meses de GAHT modificaron la metilación en 78 islas CpG, de las cuales el 85,9% estaban hipometiladas tras el tratamiento. Por tanto, en ambas poblaciones trans, el tratamiento GAHT indujo una reducción significativa de la metilación.

Palabras clave: disforia de género, epigenética, *ESRI*, incongruencia de género, metilación, RIII.

ABSTRACT

Gender incongruence in the ICD-11 (International Classification of Diseases-11) is characterized by “a persistent incongruence between the individual's experience of gender and the sex assigned at birth”. The origin of gender incongruence is complex and multifactorial.

Aim: The first part of the research focused on the prospective CpG (cytosine-phosphate-guanine) analysis of the fragment III (RIII) of the estrogen receptor α promoter, in a population with gender incongruence before *vs* after six months of gender affirming hormone treatment (GAHT). The second part focused on the prospective global CpG methylation using the Illumina© Infinium Human Methylation 850k BeadChip.

Material and Methods: The analysis of the CpG profile of the RIII of the estrogen receptor α promoter was carried out using bisulfite genomic sequencing in 20 cis gender and 20 trans gender people before *vs* after six months of GAHT. DNAs were bisulfited, amplified, cloned, and sequenced. The statistical analysis was carried out with the QUMA (QUantification tool for Methylation Analysis) program.

The global CpG analysis was performed on blood from 16 trans gender people before *vs* after GAHT, in comparison to 16 cis gender people using the Illumina© Infinium Human Methylation 850k BeadChip, after bisulfite conversion. Global methylation profiles were analyzed with the Partek® Genomics Suite® program by a 3-way ANOVA test comparing populations by group, sex and treatment. An enrichment analysis was performed with the Partek® Pathway® program and the WebGestalt.

Results: The first part of this study showed (i) that in cis and trans populations, men and women had different RIII methylation patterns; (ii) that before the GAHT, both transgender groups showed a characteristic RIII methylation profile, which did not match any of the cisgender groups; (iii) that GAHT modified the RIII methylation pattern towards more similar methylation profiles to the corresponding gender.

The main result of the global methylation study is that the cis and trans populations differ in the degree of methylation before GAHT treatment. In the male population (according to the assignment at birth), 22 CpG islands were found that passed the statistic criteria (FDR $p < 0.05$; fold change $\geq \pm 2$). The most significant CpGs were related to the genes *WDR45*, *SLC6A20*, *NHLH1*, *PLEKHA5*, *UBALD1*, *SLC37A1*, *ARL6IP1*, *GRASP* and *NCOA6*. Regarding the female population (according to the assignment at birth), 2 CpGs were found that passed the statistical criteria, but none of them were located in islands. One of these CpGs, the one related to the *MPPED2* gene, is shared by both trans men and trans women. Enrichment analysis showed that these genes are involved in important functions such as negative regulation of gene expression (GO: 0010629), development of the central nervous system (GO: 0007417), brain development (GO: 0007420), ribonucleotide binding (GO: 0032553) and RNA binding (GO: 0003723).

Furthermore, six months of GAHT treatment modified the methylome in both trans populations. The before vs after methylome study revealed a significant decrease in methylation in both trans populations. Trans men showed variations in 95 CpG islands, of which 72.63% decreased the degree of methylation after treatment. Regarding trans women, six months of GAHT modified the methylation in 78 CpGs islands, of which 85.9% were hypomethylated after treatment. Thus, in both trans populations, GAHT induced a significant reduction in methylation.

Key Words: gender dysphoria, gender incongruity, epigenetics, *ESRI*, methylation, RIII.

1.INTRODUCCIÓN



1.1. La genética y la epigenética

La genética estudia, entre otros, los cambios hereditarios debidos a la alteración directa de la secuencia del ADN. Tales alteraciones incluyen mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y translocaciones (Moore, Le & Fan, 2013). Numerosos estudios apuntan a que las modificaciones en la secuencia del ADN son las causantes de los cambios en el genotipo y por consiguiente de los cambios en el fenotipo de los individuos; algunas veces estos cambios son beneficiosos para la especie, pero en otros casos son perjudiciales y pueden originar enfermedades.

Existen varios niveles de regulación de la expresión génica. El más común es durante la transcripción, aunque también existe una regulación post-transcripcional, traduccional y post-traduccional (Cavagnari, 2012).

Estos tipos de regulación en la expresión génica que están presentes en una célula no son suficientes por sí solos para definir el espectro de la actividad génica. Pero sin lugar a dudas, la forma de regular la expresión génica que ha revolucionado este concepto desde finales del siglo pasado es la regulación de los genes por la interacción con el medio ambiente, la epigenética, término acuñado por el biólogo escocés Conrad Hal Waddington. Actualmente, este concepto cada vez toma más fuerza en el ámbito científico (Portela & Esteller, 2010).

Para la biología molecular, el dogma central establecía que la información genética fluye del ADN al ARN y luego a la proteína. Pero con las modificaciones epigenéticas reversibles que se producen en el ADN genómico y en las proteínas histónicas, se puede regular la expresión de los genes que caracterizan a las células y que afectan a su diferenciación y desarrollo (Fu, Dominissini, Rechavi & He, 2014). El nacimiento de la epigenética en el campo científico indica que no siempre el ADN, o no sólo el ADN, tendrá la responsabilidad de la expresión genética. Funcionalmente, la epigenética explica cómo los gemelos monocigóticos, aunque idénticos a nivel genómico, se desarrollan como dos individuos con rasgos fenotípicos distintos. En otras palabras, esta rama de estudio surge como punto de encuentro entre los genes y el ambiente.

La epigenética es el estudio de los cambios hereditarios en la actividad o función genética que no están asociados con cambios en la secuencia de ADN. Es un término que literalmente significa "además de la genética", aunque también se le conoce como "por encima del genoma". En cualquier caso, se refiere a cambios en el ADN y proteínas asociadas, que alteran el funcionamiento del gen sin alterar la secuencia de nucleótidos (Alam, Abdolmaleky & Zhou, 2017).

La epigenética es un reflejo de los cambios ambientales en el funcionamiento del ADN de un individuo. Estos cambios implican una variedad de procesos que incluyen modificaciones en la expresión del ADN, mediante cambios en su metilación o modificaciones en las histonas asociadas.

Inicialmente, se definió a la epigenética como el estudio de los cambios hereditarios del fenotipo que no implican alteraciones en la secuencia del ADN. En el transcurso de las investigaciones el término "heredable" se fue perdiendo para redefinir a la epigenética como la información que transporta el genoma que no está codificada por el ADN. Sin embargo, en la actualidad se vuelve a incluir en la definición "cambios hereditarios", ya que define una memoria no genética que se transmite de generación en generación (Kouzarides, 2007). Cabe señalar, que una modificación epigenética anormal puede intervenir en diversas alteraciones, como tumores, procesos inflamatorios, envejecimiento y anomalías neuropsiquiátricas (Xie, Yuan, Li, Li & Lu, 2021).

La investigación contemporánea dirigida a explorar la etiología de ciertas enfermedades y rasgos de la conducta, se ha centrado principalmente en la variación de la secuencia del ADN, que ha sido un gran avance para la ciencia, pero el aumento del conocimiento sobre la biología del genoma ha sugerido un papel importante de la variación epigenética, en la salud y en las enfermedades humanas. Los avances metodológicos recientes indican que ahora puede ser factibles involucrar a la epigenética en enfermedades complejas como el Alzheimer (Lunnon et al., 2014) o para entender ciertos trastornos cognitivos (López, Hecking & White, 2020).

Muchos mecanismos epigenéticos han sido estudiados para explicar la regulación de la expresión génica entre los que destacan: la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas, los ARN no codificantes y la edición del ARN (Alam et al., 2017). El proceso de metilación puede estar influenciado por una serie de factores genéticos, condiciones de salud y factores ambientales que van desde la exposición a toxinas hasta el estrés, el entorno físico y químico, las drogas, los productos farmacológicos, la edad o la dieta (Logue et al., 2020). Por lo tanto, la metilación del ADN está involucrada en diversos procesos del desarrollo mediante el silenciamiento de genes concretos o cambios conformacionales en el ADN o en su empaquetamiento dentro de la célula (Aylwin, Toro, Shirtliff & Lomniczi, 2019).

1.2. Mecanismos epigenéticos

Desde hace algunos años, diferentes grupos de investigación se han dedicado a analizar los mecanismos que se han asociado a la modificación de la expresión génica sin la modificación en la secuencia del ADN. Estos mecanismos son: factores de transcripción, ARN no codificante y arquitectura de la cromatina (Bošković & Rando, 2018).

Factores de transcripción

Para que se inicie el proceso de transcripción del ADN al ARN y obtener la expresión de un gen, se necesitan de unos factores de transcripción que son complejos y muy específicos. Un factor de transcripción es, por definición, cualquier proteína necesaria para iniciar el proceso de transcripción (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology).

Los factores de transcripción, que se unen al ADN y que se acoplan a las regiones promotoras de los genes para la activación o represión transcripcional, son los determinantes cruciales de los patrones de expresión génica (Bird, 2002).

Múltiples evidencias sugieren que la cooperatividad entre los diferentes factores de transcripción se establece a nivel de unión al ADN. Se ha demostrado experimentalmente que la alteración de las secuencias de reconocimiento de algunos factores de transcripción

puede causar la pérdida de unión de otros cofactores que imposibiliten la síntesis de la proteína (Reiter, Wienerroither & Stark, 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que un único factor de transcripción, como Nfib, es capaz de inducir cambios en el estado de la cromatina a nivel global tras una alta expresión de ese factor, y de esta forma, puede promover múltiples pasos de la cascada metastásica en el cáncer de pulmón en un modelo de ratón (Denny et al., 2016).

En otros trabajos se concluyó que la actividad coordinada de los factores de transcripción, junto con otros modificadores epigenéticos, pueden establecer y mantener identidades celulares estables al impulsar programas de expresión génica específicos en células previamente diferenciadas (Sindhu et al., 2012), lo que ha colaborado en demostrar la notable plasticidad con la que las células diferenciadas pueden ser redirigidas a cumplir funciones diferentes, siempre y cuando existan los factores de transcripción adecuados para ello.

Dirigida por el ARN no codificante

Además de los ARN codificantes, en las células también existen ARN no codificantes, por lo que en conjunto desempeñan un papel crucial en los sistemas biológicos, no sólo al pasar la información genética del ADN a las proteínas, sino también regulando diversos procesos biológicos (Fu et al., 2014). Convencionalmente, los ARN no codificantes se clasifican por su longitud, ARN largos si son de 200 nucleótidos o mayores, y los ARN cortos de hasta 200 nucleótidos. Este último grupo incluye los microARNs (Mongelli et al., 2020). Estas diferentes especies de ARN no codificante están implicadas de una forma indirecta en la síntesis de proteínas ya que se pueden acoplar con el ARNm y evitar que este continúe el proceso para la síntesis de proteínas.

Por otro lado, la literatura reciente ha destacado el papel de la metilación del ARN, que se produce principalmente en las adenosinas, y que da lugar a una mayor inestabilidad del ARNm, originando la represión de la síntesis de proteínas en células del miocardio (Kmietczyk et al., 2019).

Con todas las evidencias que están constantemente surgiendo se puede comprobar que cada vez se está actualizando el dogma central de la biología molecular.

Arquitectura de la cromatina

El complejo macromolecular formado por ADN y proteínas histónicas se conoce como cromatina. Una conformación cerrada de la cromatina, es decir, con los nucleosomas fuertemente empaquetados, puede bloquear la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a un locus específico, silenciando así, la transcripción de los genes. Pero si, por el contrario, existe una conformación más abierta en las regiones reguladoras de los genes, la maquinaria transcripcional se acopla con mayor facilidad (Batie & Rocha, 2020). Por lo tanto, la arquitectura de la cromatina se identifica como uno de los principales sustratos del cambio epigenético.

La cromatina puede modificarse mediante tres mecanismos distintos: la modificación de las histonas, la remodelación de los nucleosomas y la metilación del ADN (Fane, Harris, Smith & Piper, 2017).

Modificaciones de las histonas

En los últimos años, las investigaciones han señalado que las proteínas histónicas pueden modificarse químicamente, lo que origina una alteración en la estructura de la cromatina, siendo esto un mecanismo adicional para regular la transcripción de los genes.

Las histonas son un grupo de proteínas, altamente conservadas evolutivamente, que juegan un papel crítico en el empaquetamiento del ADN dentro del núcleo eucariota. Debido a su estrecha asociación con el ADN, se ha postulado durante mucho tiempo que las histonas participan directamente en los procesos de transcripción, replicación y recombinación (Lian Zhang, Lu & Chang, 2020). Numerosos estudios han puesto en evidencia que el control del nivel general de histonas es un sistema regulador para la expresión génica durante el desarrollo, diferenciación o procesos de des-diferenciación (Prado, Jimeno-González & Reyes, 2017).

Se ha reportado que existen dos mecanismos bien caracterizados para la función de las modificaciones a nivel de las histonas, estos son: la interrupción de los contactos entre los nucleosomas para "desenredar" la cromatina y el reclutamiento de proteínas no histónicas (Kouzarides, 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que las modificaciones de las histonas no se producen de forma aislada, ya que la fosforilación de una histona como la H3S10, promueve la acetilación de las histonas en múltiples residuos de lisina, ocasionando poca accesibilidad al material genético (López et al., 2020).

La remodelación de los nucleosomas

Las moléculas de ADN son normalmente muy largas, es por esta razón que el ADN tiene que estar muy condensado para que encaje en la célula. En los eucariotas, las proteínas histónicas se utilizan para condensar el ADN en la cromatina. La estructura básica de la cromatina es el nucleosoma, un nucleosoma contiene ADN envuelto casi dos veces alrededor del octámero de histonas, posterior a este nivel de empaquetamiento del ADN se pasa al siguiente nivel que es cuando los nucleosomas se pliegan sobre sí mismos para formar la fibra de 30 nm, ésta se vuelve a plegar para formar la 300 nm (Minchin & Lodge, 2019).

Por lo tanto, el nucleosoma es la unidad básica de la cromatina y consta de aproximadamente 147 pares de bases de ADN agrupadas en torno a un octámero. Los nucleosomas pueden fluctuar entre varios niveles de compactación, y su estado es un factor crítico y limitante para permitir que la maquinaria de transcripción acceda a los genes de interés (López & Wood, 2015).

Las modificaciones a este nivel se llevan a cabo mediante complejos de modelado de nucleosomas (NRC), los cuales pueden propiciar la remodelación del nucleosoma. Para que exista tal remodelación, son necesarios complejos enzimáticos dependientes del ATP (por ejemplo, nBAF, SWI/SNF, INO80, ISWI, NURD) que intervienen en la accesibilidad

del nucleosoma influyendo así en la regulación transcripcional (Li, Carey & Workman, 2007).

Por ejemplo, uno de los NRCs es el conocido como *nBAF*, el cual puede tener efectos en la expresión de genes específicos de las neuronas. Los estudios de secuenciación del exoma humano han vinculado las mutaciones en los genes del complejo *nBAF* a los trastornos de la discapacidad intelectual y al trastorno del espectro autista (TEA) ya que afecta al modelado del nucleosoma (López & Wood, 2015).

Metilación del ADN

Se introduce el término metilación del ADN desde el mismo momento que se descubre el ADN como material genético; al principio se pensó que ese grupo metilo que se encontraba en la secuencia, formaba parte de él (Avery, Macleod & McCarty, 1944; McCarty & Avery, 1946). La metilación del ADN es un mecanismo estable y en algunos casos heredable, que puede persistir a través de las divisiones celulares incluso en ausencia de los estímulos originales.

Este mecanismo epigenético consiste en la metilación de la base nitrogenada citosina en la secuencia del ADN. Esta metilación es catalizada por una familia de metiltransferasas de ADN (Dnmts) que transfiere un grupo metilo de la S-adenilmetionina (SAM) al quinto carbono de un residuo de citosina para formar 5mC (Moore et al., 2013). La metilación del ADN (ADNm) se produce casi exclusivamente en el contexto de los dinucleótidos CpG, que se encuentran en regiones de 1–2 kb llamadas islas CpG. Típicamente una isla CpG tiene al menos 200pb con más de 50% de contenido de guaninas y citosinas, y una razón observada/esperada de CG mayor de 60% (Robles, Ayala Ramírez & Perdomo Velásquez, 2012). Estas regiones se solapan con regiones promotoras en 50-60% de los genes en humanos; es decir, que estas islas se encuentran principalmente en las regiones promotoras, o en el primer exón de los genes, o en sus cercanías (Salinas, Connolly & Song, 2020). Aunque existen diferencias en la frecuencia de dichas islas CpGs en los diferentes genes, se ha podido demostrar que la regulación genética depende del silenciamiento o activación de genes concretos mediante la metilación.

Uno de los objetivos de los estudios de metilación es la obtención de la cuantificación de los grupos metilo en la región promotora de un gen (hipo o hiper metilación), pues la ADN_m tiende a correlacionarse negativamente con la expresión del gen.

Estudios recientes sobre la metilación global del ADN y su relación con el trastorno del espectro autista identificaron hipermetilación en algunos de los casos, mientras que en otros no encontraron evidencias de diferencias entre los grupos de estudio y los controles. Del mismo modo, se han notificado resultados mixtos en los patrones globales de metilación del ADN de individuos afectados por trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson, y otras enfermedades crónicas (Dall’Aglia et al., 2018).

La metilación del ADN también se ha asociado con ciertos tipos de cáncer, ya que algunos estudios han puesto en evidencia que la hipermetilación que ocurre en las islas CpG de las regiones promotoras de los genes supresores de tumores produce el silenciamiento de estos genes originando con ello una progresión de los cánceres hematológicos (Sánchez-Álvarez & Acevedo-Toro, 2015).

1.3. Dimorfismo cerebral

Una de los interrogantes que ha sido objeto de estudio, desde hace décadas, es la explicación de la existencia del dimorfismo cerebral entre hombres y mujeres, aunque estos grupos pueden ser más parecidos que diferentes, no se puede dudar que existen diferencias en las capacidades cognitivas, en la morfología cerebral, en el procesamiento de las emociones y en la vulnerabilidad a los trastornos psiquiátricos, entre otros (Bakker, 2018).

El desarrollo del cerebro de los mamíferos requiere una compleja red de interrelaciones dinámicas en la expresión de diferentes genes para generar la diversidad celular necesaria para la función cerebral. En el sistema nervioso central existen estructuras que están claramente diferenciadas en machos y en hembras; por ejemplo, en ratas se ha demostrado que hay estructuras en los machos que tienen mayores medidas morfológicas que en las hembras, mientras que en otras estructuras ocurre lo contrario (García-Falgueras et al.,

2006). Por lo general en los mamíferos, las diferencias de sexo en el cerebro se han reportado en algunas áreas cerebrales como el área preóptica (POA), el núcleo de la estría terminal, y también los núcleos hipotalámicos (McCarthy & Konkle, 2005).

Los mamíferos nacen con un cerebro sexuado, pudiendo diferenciar en cada individuo tres tipos de sexo: a) un sexo cromosómico (46, XY o 46, XX) que se da en el mismo momento de la fecundación; b) un sexo gonadal (testículos u ovarios) que se inicia tras varias semanas de la embriogénesis y c) un sexo cerebral (masculino o femenino) que comienza a tomar forma en la etapa prenatal y que continua después del nacimiento (Arnold, 2009; Díaz-Hernández & Merchant-Larios, 2017; McCarthy & Konkle, 2005).

Determinación del sexo

El sexo, en mamíferos, viene determinado fundamentalmente por los cromosomas sexuales, XY para machos y XX para hembras. El cromosoma Y induce la formación de los testículos, concretamente el gen *SRY*, que codifica una pequeña proteína del factor de transcripción llamada factor determinante del testículo (TDF), que inicia una cascada de expresiones génicas que dirigen el desarrollo de la gónada bipotencial para convertirse en testículos (Sinclair et al., 1990).

El gen *SRY* crea el ambiente ideal tras su expresión génica para que se produzca los siguientes eventos: Las células de Leydig de los testículos producen testosterona que promoverá el desarrollo de los conductos de Wolff en las estructuras genitales masculinas internas como el epidídimo, los conductos deferentes y las vesículas seminales, mientras que la hormona antimülleriana secretada por las células de Sertoli en los testículos provoca la regresión de los conductos müllerianos típicos de la mujer (McCarthy & Arnold, 2011). El pene y el escroto se desarrollan bajo la influencia de la dihidrotestosterona, que se forma a partir de la testosterona mediante la enzima 5α -reductasa. En la diferenciación femenina típica, es decir, en ausencia del cromosoma Y y, en consecuencia, del gen *SRY*, las gónadas indiferenciadas se convertirán en ovarios. Los conductos müllerianos se desarrollan sin ningún aporte hormonal aparente en el útero, las trompas de Falopio y la porción distal de la vagina, mientras que los conductos wolffianos retroceden y desaparecen en ausencia de

estimulación androgénica y los genitales formarán un clítoris, labios y la porción restante de la vagina (McCarthy & Konkle, 2005).

En algunos casos se evidencia la existencia de condiciones congénitas en las que el desarrollo del sexo cromosómico, gonadal o anatómico es atípico. Esta condición es definida como diferencias del desarrollo sexual (DSD) (Beek, Cohen-Kettenis & Kreukels, 2016). En otras palabras, cualquier alteración de origen medioambiental o genético, que afecte al desarrollo adecuado de gónadas, de los genitales internos (ausentes o que no deberían estar presentes) o de los genitales externos (insuficientemente o excesivamente desarrollados) se cataloga como DSD (Audi Parera et al., 2019). Por otra parte, es importante para diagnosticar DSD que tales manifestaciones se deben detectar en el nacimiento del individuo en forma de ambigüedad genital o discordancia entre el genotipo y el fenotipo sexual.

Relación de las hormonas sexuales y el dimorfismo cerebral

Desde los años 50 se ha tratado de determinar la causa de la existencia de comportamientos dimórficos en las especies. Uno de los primeros trabajos que trató de explicar tales diferencias estudiando el comportamiento sexual de cobayas machos y hembras nacidos de madres tratadas con propionato de testosterona (TP) durante la gestación. Se puso de manifiesto que el andrógeno administrado prenatalmente tiene una acción organizadora o diferenciadora en los tejidos neurales que median el comportamiento sexual, y que durante la edad adulta las hormonas gonadales tienen una función activadora (Phoenix, Goy, Gerall & Young, 1959).

Gracias a los avances científicos, cada vez hay más pruebas de que la organización del cerebro se ve afectada por las hormonas sexuales circulantes y la expresión de genes específicos durante el desarrollo temprano; lo que sugiere que las diferencias de sexo en la estructura y organización del cerebro ya están presentes desde el nacimiento. Después de la pubertad, se produce un aumento de las hormonas sexuales en circulación en ambos sexos, y estas hormonas modulan el funcionamiento fisiológico (acción activadora de las hormonas sexuales) de los circuitos neuronales necesarios que permiten el despliegue de

comportamientos sociales sexualmente dimórficos (Knoedler & Shah, 2018). Por otro lado, también se ha reportado que las hormonas sexuales son importantes para la plasticidad neuronal en el cerebro adulto (Marrocco & McEwen, 2016).

Se ha señalado que múltiples genes en regiones del hipotálamo y la amígdala de los ratones estaban regulados por las hormonas esteroides circulantes y además mostraban una expresión sexualmente dimórfica, la cual afectaba a componentes específicos de los comportamientos sociales sexualmente dimórficos de los adultos (Knoedler & Shah, 2018).

El proceso de producción de las hormonas sexuales es un paso importante para la determinación del sexo y la diferenciación sexual (McCarthy, Davis & Mong, 1997) Durante este proceso existe un lapso de tiempo (en los primeros estadios de vida), que es muy importante para el desarrollo del cerebro. Este periodo se denomina periodo crítico, y comienza con la producción de testosterona por los testículos, y finaliza en el momento en que la inhibición de los andrógenos (en los varones), o el tratamiento con estrógenos (en las mujeres), deja de tener efecto sobre el dimorfismo cerebral (McCarthy, 2019). El nivel de las hormonas sexuales, en el cerebro, alcanza su máxima concentración en E19 del desarrollo fetal, pero desciende precipitadamente en E21, alcanzando en la mayoría de los casos su punto más bajo entre el día P10 y P12, después del nacimiento de individuo. (Konkle & McCarthy, 2011).

Muchos de los efectos biológicos de las hormonas sexuales están mediados por la activación de dos vías, la vía genómica y la vía no genómica. La vía genómica se produce a través de la activación de los respectivos receptores nucleares, que se encuentran en el citosol, los cuales activan o reprimen el proceso de transcripción (Charlier, Seredynski, Niessen & Balthazart, 2013); el efecto por esta vía puede durar horas o días (Schwartz, Verma, Bivens, Schwartz & Boyan, 2016). La vía no genómica es el resultado de la unión a receptores extranucleares específicos, que residen principalmente en la membrana celular. Cuando se activan, estos receptores desencadenan cascadas de señalización que implican quinasas, fosfolipasas, flujo de calcio y otros mensajeros secundarios (Schwartz et al., 2016). Los efectos producidos por esta vía son rápidos ya que no se retrasan por la inhibición de la transcripción o la traducción. Por tanto, los receptores de hormonas

sexuales pueden ejercer sus efectos organizativos y de activación en el cerebro a través de diversos mecanismos.

Las hormonas sexuales como los estrógenos y los andrógenos actúan uniéndose a receptores específicos, los receptores de estrógenos ER (Métivier et al., 2003), y el receptor de andrógenos, AR (Wåhlin-Jacobsen et al., 2018). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares (NR) que son factores de transcripción activados por ligando (Charlier, 2009). Una vez unidos a sus ligandos, los receptores dimerizan, entran en el núcleo, e interactúan con las regiones promotoras de los genes diana, modulando la expresión de múltiples genes en colaboración con algunos coactivadores de esteroides (Kraus, Manning & Kadonaga, 1999; Yi et al., 2015).

Un ejemplo clásico del efecto genómico de las hormonas es la inducción de la expresión del gen *PR* por el estradiol. Esta inducción se ha demostrado en una variedad de tejidos sensibles a la hormona, incluido el cerebro. Esta inducción de la expresión del gen *PR* ocurre a través de un elemento de respuesta al estrógeno en la región promotora del gen. En el cerebro, el estrógeno, induce la expresión del gen *PR* en el área preóptica medial (mPOA) y en el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMN) (Molenda, Griffin, Auger, McCarthy & Tetel, 2002). Estas áreas supracerebrales son sitios conocidos por regular el comportamiento reproductivo de los mamíferos.

Las hormonas sexuales, como la testosterona y el estrógeno, influyen en el desarrollo de numerosas regiones del cerebro y la médula espinal, afectando a la supervivencia y la diferenciación de poblaciones específicas de neuronas y de la glía. Las acciones de estas hormonas resultan en cambios permanentes, tanto en la estructura como en la función del sistema nervioso, por lo que en la actualidad se continúan estudiando sus funciones relacionadas con el dimorfismo cerebral (Limei Zhang, Neme-Bechara, Escobar & Irls, 2013).

Dimorfismo cerebral y testosterona

Los testículos en desarrollo segregan andrógenos, las hormonas masculinas, sobre todo la testosterona. Es la acción de la testosterona, segregada por las células de Leydig, la que se une a los receptores de andrógenos y que dirige la diferenciación de los conductos mesonéfricos y paralelamente, estabiliza la cascada de desarrollo (Lephart, Lund & Horvath, 2001).

La hormona esteroidea testosterona desempeña un papel fundamental en la regulación del desarrollo, fisiología y comportamiento en casi todas las especies de vertebrados (Charlier et al., 2013). Se ha confirmado que esta hormona es la principal hormona sexual masculina e influye significativamente en la formación y la morfología de las estructuras cerebrales, teniendo además cierta influencia en la función de estas estructuras (Filová, Ostatníková, Celec & Hodosy, 2013).

La testosterona y las hormonas producidas a partir de ella, afectan a la estructura del cerebro de los mamíferos. Los estudios realizados con material de autopsias humanas han encontrado algunas diferencias de sexo en el cerebro humano similares a las observadas en otras especies, y también se ha encontrado que esta hormona influye en el comportamiento de los machos de las diferentes especies (Hines, 2020).

El cerebro es un órgano pluripotencial, lo que sugiere que va a depender del microambiente en el cual se está desarrollando para su formación y caracterización. Así, las hormonas esteroideas, como la testosterona y/o sus principales metabolitos, como la dihidrotestosterona y el estradiol, pueden influir en la formación de las estructuras cerebrales durante los períodos críticos del desarrollo cerebral intrauterino (Filová et al., 2013). En otras palabras, la exposición de los varones a la testosterona es un requerimiento esencial para la masculinización cerebral (McCarthy, Schlenker & Pfaff, 1993); en cambio la ausencia de esta hormona promueve por defecto el desarrollo de neurocircuitos femeninos (Sánchez and Vilain, 2010).

Un ejemplo claro de la masculinización cerebral se evidencia en la región denominada núcleo sexualmente dimórfico (SDN) de la POA (SDN-POA), la cual es varias veces mayor en las ratas macho que en las hembras. La testosterona influye en el desarrollo del SDN-POA ya que se ha demostrado que el tratamiento de las hembras con testosterona en etapas tempranas de la vida aumenta el volumen del SDN-POA, mientras que la eliminación de la testosterona en los machos, lo reduce (Hines, 2020).

En los machos, la testosterona se produce en el retículo endoplásmico de las células de Leydig de los testículos, a partir del colesterol mediante una conversión enzimática. La testosterona se transporta al cerebro a través de la circulación sanguínea. La evidencia científica ha demostrado que todas las enzimas necesarias para su biosíntesis, como la P450 aromatasas, la 17β -HSD, la 3β -HSD y la 5α -reductasa se encuentran en el cerebro humano (Beyenburg et al., 2001). La presencia de estas enzimas en centros supraespinales indica que la síntesis de esteroides puede producirse en el cerebro (Filová et al., 2013). La enzima P450 aromatasas convierte a la testosterona en estradiol, el cual es el ligando de los receptores de estrógeno (Balthazart, Absil, Gérard, Appeltants & Ball, 1998; Filová et al., 2013), lo que significa que esta hormona puede actuar indirectamente a través de los receptores de estrógeno tras su conversión en estradiol (Filová et al., 2013). Por esta razón, surge un conflicto porque la medición del posible efecto de la testosterona se complica por el hecho de que el estradiol también puede modular algunas funciones cerebrales y estos efectos deben separarse de los efectos de la testosterona (Zitzmann, 2006).

Dimorfismo cerebral y estrógeno

El estrógeno ejerce una amplia variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo, la función de los sistemas reproductivos y la regulación del sistema nervioso central (Cooke, Nanjappa, Ko, Prins & Hess, 2017). Se han descrito tres isoformas de los receptores de estrógeno (ER), receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), receptor de estrógeno beta ($ER\beta$), y recientemente el receptor de estrógeno acoplado a una proteína G de membrana (GPR30/GPER-1) (Eyster, 2016). La estructura de los receptores $ER\alpha$ y $ER\beta$ es muy similar, sin embargo, tanto su ubicación como las funciones de ambos pueden diferir considerablemente en los sistemas celulares (Cooke et al., 2017).

El mecanismo de acción clásico del ER α y ER β consiste en la unión con su ligando para obtener la dimerización del receptor, originar los cambios conformacionales necesarios en el dominio de unión del ligando (LBD) (Eyster, 2016) y acoplarse con el elemento de respuesta al estrógeno (ERE) (Björnström & Sjöberg, 2005) en los genes que son regulados por el estrógeno (Fig. 1).

El estradiol (E₂) es el compuesto biológicamente más prevalente y activo de los estrógenos, y ejerce efectos potentes y de gran alcance en el cerebro en desarrollo (McCarthy, 2008). Actúa sobre el receptor de estrógenos ER α o ER β , masculinizando y desfeminizando regiones cerebrales específicas; promoviendo activamente el desarrollo de neurocircuitos masculinos y suprimiendo el desarrollo de neurocircuitos femeninos (Sánchez & Vilain, 2010).

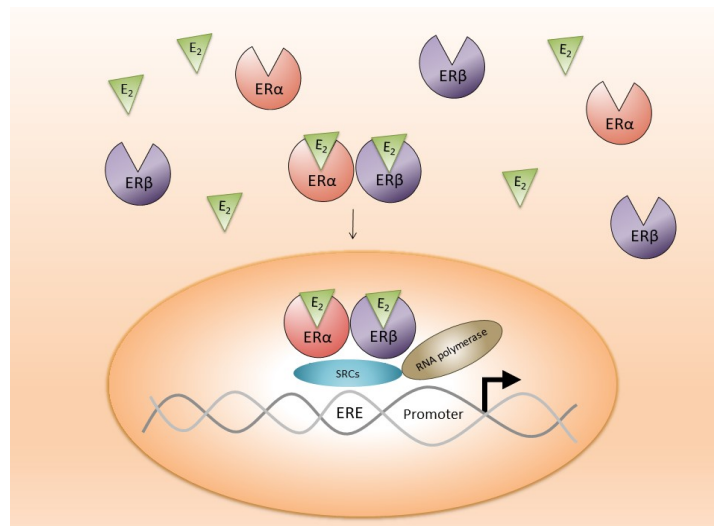


Fig 1.- Mecanismo de acción de los receptores de estrógenos ER. La hormona 17 β -estradiol (E₂) se une al receptor nuclear ER α o ER β y, después de la dimerización y translocación al núcleo, el complejo del receptor nuclear se une a una secuencia específica de ADN conocida como elemento de respuesta a estrógenos (ERE). El complejo de ADN del receptor nuclear, a su vez, recluta coactivadores SRC que activan la transcripción de los genes diana (Ramírez et al., 2021).

La acción del estradiol se extiende más allá de la inducción del factor de transcripción de genes. Estas acciones pueden dividirse a grandes rasgos en tres líneas: 1) la activación "clásica" del ER que implica la dimerización, la translocación al núcleo y la transcripción; 2) acciones "nouveau" que implican al receptor nuclear actuando de forma novedosa fuera

del núcleo; y 3) efectos del estradiol que aparentemente no implican ningún receptor para el estradiol, sino que están mediada por otros receptores, como los de los neurotransmisores (McCarthy, 2008).

Diferentes estudios han demostrado que en los roedores machos recién nacidos, el estradiol aromatizado en el POA a partir de los andrógenos testiculares, induce cambios importantes que se generan en los primeros días después del nacimiento, afectando al volumen y al número de células, manteniéndose estos cambios hasta la edad adulta (Guo et al., 2011). Por otra parte, el estradiol promueve el crecimiento neurítico, así como cambios en la formación de sinapsis y espinas dendríticas en varias regiones del sistema nervioso central (Guo et al., 2011).

Además, el estradiol aumenta el tamaño de los cuerpos celulares y el volumen del núcleo ventromedial hipotalámico (Carrer & Aoki, 1982; Cohen & Pfaff, 1981) así como la densidad de la sinapsis en esta región (Cohen & Pfaff, 1981). La organización de las membranas de estas neuronas es sexualmente dimórfica, y la administración de altas dosis de estradiol prenatal a las ratas hembras borra irreversiblemente esta diferencia sexual existente entre los machos y las hembras (García-Segura, Perez, Jones & Naftolin, 1991).

Otro ejemplo sobre la función del estrógeno al acoplarse a su receptor se encuentra en el gen *BDNF* (factor neurotrófico derivado del cerebro). Este gen se relaciona con las sinapsis excitatorias e inhibitorias y regula la actividad sináptica y la plasticidad durante el desarrollo y en la etapa adulta de los mamíferos (Lu et al., 2014). Se ha identificado un ERE en el exón codificador del gen *BDNF*, lo que sugiere que este gen es una diana transcripcional directa de los receptores de estrógeno. De hecho, la eliminación de estrógenos en ratas hembras mediante la extirpación de los ovarios, disminuye drásticamente los niveles de ARNm del *BDNF* en el córtex y el hipocampo (Wei, Wang & Xu, 2017).

Dimorfismo cerebral, neurotransmisores y neuroesteroides

En la actualidad se tienen amplios conocimientos de la intervención de los neurotransmisores, los segundos mensajeros y los neuroesteroides en la organización de las

diferencias en el sexo del cerebro y el comportamiento reproductivo. Por ejemplo, se ha demostrado la participación del neurotransmisor inhibitorio GABA en el dimorfismo cerebral. La administración perinatal del agonista del GABA, muscimol, redujo significativamente en los machos el volumen del núcleo sexualmente dimórfico (SDN) situado en el área preóptica medial (POA) del hipotálamo, mientras que el mismo tipo de exposición no afectó a las ratas hembras (Segovia et al., 1999).

En cuanto a los neuroesteroides y el dimorfismo cerebral, se ha demostrado que las hormonas esteroides circulantes también sirven como precursoras de los neuroesteroides (Baulieu & Robel, 1990). Los precursores de los esteroides entran fácilmente en el cerebro, y se sintetizan nuevos neuroesteroides que modulan la excitabilidad neuronal por medio de un rápido proceso no genómico (Reddy, 2010). La síntesis de neuroesteroides probablemente procede a través de algunas vías similares y otras diferentes a las utilizadas en las suprarrenales, las gónadas y la placenta. El cerebro contiene enzimas adicionales de metabolización de esteroides, incluidas las sulfotransferasas y las sulfhidrolasas, que convierten las hormonas esteroides clásicas en una variedad de compuestos neuroactivos (Compagnone & Mellon, 2000).

En general, los neuroesteroides modulan la excitabilidad cerebral a través de los receptores de la membrana neural y los canales iónicos, principalmente con los receptores del ácido γ -aminobutírico, específicamente del GABA-A. Por otro lado, los esteroides pueden potenciar la activación de los receptores del GABA-A y también pueden prolongar las corrientes postsinápticas inhibitorias GABAérgicas (Akk et al., 2004).

Además, los neuroesteroides tienen un efecto protector contra los acontecimientos adversos de la vida temprana cuando se administra a ratas neonatas, como por ejemplo la administración de allopregnanolona (un neuroesteroide que puede sintetizarse en el hipocampo y la médula espinal) suprimió las alteraciones de los mecanismos centrales que controlan el eje HPA en las crías sometidas a privación materna intermitente en la vida postnatal temprana, lo que sugiere que este neuroesteroide ejerce efectos protectores persistentes contra el estrés en el cerebro en desarrollo (Compagnone & Mellon, 2000).

Dimorfismo cerebral vs teoría del mosaico

La presencia de testosterona y su aromatización a estradiol hacen que el cerebro fetal del varón se organice de tal manera que resulte en un fenotipo. De forma opuesta, la ausencia de producción de testosterona por parte del feto femenino y la actividad de unión a estrógenos de la alfa-fetoproteína conducen a un fenotipo cerebral femenino (Nguyen et al., 2019).

Sin embargo, la distinción entre el cerebro femenino y el masculino no siempre es clara, y se puede hablar de un cerebro en mosaico, el cual consiste en que regiones del cerebro pueden estar más o menos programadas por los andrógenos y los estrógenos, lo que conllevaría a un mayor o menor grado de masculinización de varias regiones del cerebro durante el desarrollo prenatal y por consiguiente un menor o mayor grado de feminización/masculinización (Joel et al., 2015). Por esta razón algunos autores sugieren que en vez de pensar que los cerebros se dividen en dos clases, una típica de los hombres y otra típica de las mujeres, se debe apreciar la variabilidad del mosaico cerebral humano.

La multiplicidad de mecanismos por los que el sexo afecta al cerebro, junto con su susceptibilidad a factores externos, constituye la base de la hipótesis del mosaicismo cerebral: la expectativa de que el grado de "masculinidad"/"feminidad" de las diferentes regiones cerebrales dentro de un mismo cerebro, no sería internamente consistente, sino más bien muy variable (Joel, 2021; Joel, Garcia-Falgueras & Swaab, 2020).

McCarthy (2016) sugiere que algunas diferencias sexuales están programadas en las primeras etapas de la vida y persisten a lo largo de la vida, mientras que otras también pueden estar programadas tempranamente, pero que aparecen o desaparecen en función del contexto. Otras diferencias sexuales son transitorias, y pueden deberse al contexto o al resultado del entorno hormonal adulto, que difiere en los hombres y las mujeres, y que afecta profundamente al cerebro y al comportamiento. También hace referencia a que los dos sexos convergen en el mismo punto, a partir de comienzos divergentes y que todo esto sirve para relacionar la acción de las hormonas, los genes y el ambiente.

Bajo la óptica del mosaico, se sugiere que el cerebro humano se compone de una combinación de rasgos típicos femeninos y típicos masculinos, por consiguiente, la categoría de sexo sólo explica una pequeña parte de la variabilidad de la estructura del cerebro humano. Según Joel (2020) estos hallazgos conducen a un nuevo marco, no binario, según el cual los cerebros en mosaico residen en un espacio multidimensional que no puede reducirse significativamente a un continuo hombre-mujer o a una variable binaria.

Relación entre el dimorfismo cerebral y la metilación del ADN

Diferentes estudios muestran que la metilación del ADN en las regiones promotoras puede regular de una manera compleja la transcripción de los genes, siendo dependiente de la etapa de desarrollo, del tejido y del tipo de célula que se analiza. Baker-Andresen et al (2013) demostraron que los ratones hembra tenían una mayor metilación del ADN alrededor de la región promotora IV del locus *BDNF*, que corresponde a una disminución de la expresión del gen *BDNF* en la corteza prefrontal medial, y esto a su vez está asociado a una distinción general entre el cerebro masculino y el femenino que repercute en su comportamiento.

Huang et al., (2018) observaron en las células cerebrales adultas (neuronas de Purkinje) una metilación en mosaico, pero esa variación en el perfil de metilación no era la misma que la analizada en los astrocitos y las células madre neurales en la misma etapa del desarrollo.

Otro grupo de estudio demostró que la expresión coordinada de las Dnmts y su capacidad para regular el patrón de metilación del promotor de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP en sus siglas en inglés) influye en la organización y regulación del desarrollo neuronal. Ratones “knockout” para las Dnmts demostraron que, si existe una desmetilación de la región promotora de la GPAP en un periodo que coincide con la neurogénesis durante el desarrollo fetal, se origina un proceso de astroglosis, así como la hipometilación de las neuronas en diferenciación (Fan et al., 2001).

Por otra parte, en las ratas macho, la inhibición farmacológica de la actividad de la metiltransferasa del ADN, en el momento del nacimiento, aumenta la expresión del gen *ESRI* en dos núcleos hipotalámicos, lo que suprime la represión de la expresión del gen del receptor de estrógenos α . Esto sugiere que la metilación del ADN puede establecer o mantener la represión génica específica de este gen en los varones (Knoedler & Shah, 2018). Otros estudios demostraron que las ratas hembras neonatales tenían una mayor actividad de la metiltransferasa del ADN en el área preóptica (POA) (McCarthy, 2008).

Nugent et al., (2015) comprobaron que las hembras presentaban mayores niveles de metilación en un número significativamente mayor de sitios CpG que los varones. También demostraron que la disminución de actividad de la Dnmt da lugar a la masculinización del POA y del comportamiento copulatorio, lo que indica que la metilación del ADN en esta área debe ser mantenida activamente para su feminización. Esta dinámica expresión génica precisa de la metilación y desmetilación *de novo*, la cual es particularmente importante para la diferenciación y maduración del sistema nervioso central de los mamíferos (Moore et al., 2013).

Por otro lado, la actividad de la Dnmt puede verse alterada por la acción de los esteroides sexuales periféricos, es decir, esta alteración conlleva la modificación de la metilación del ADN en los sitios CpG (Nugent et al., 2015).

Adicionalmente se ha demostrado que la reducción de la metilación del ADN aumenta el número de genes regulados en las hembras en comparación con los machos (McCarthy, Nugent & Lenz, 2017). Esto es sorprendente porque un escenario en el que la transcripción inducida por los receptores de esteroides diferencia a los machos de las hembras predeciría una mayor expresión génica en los machos (de Vries et al., 2008). McCarthy et al., (2017) demostraron que el metiloma del ADN neuronal es altamente modificable por esteroides exógenos, con cambios rápidos en la metilación *de novo* que causan variaciones en la expresión de los genes asociados a la plasticidad neural.

Género y sexo

Hasta hace unas pocas decenas de años estaba establecido que en los individuos hacer referencia al sexo biológico y al género era casi sinónimo, pero a medida que pasan los años y que se avanza cada vez más en los conocimientos, las diferentes ramas de estudio han establecido que los dos conceptos no siempre son coincidentes.

Según Stoller (1964), en humanos no se puede confundir la definición de sexo y de género, ya que el género haría referencia a los aspectos psicosociales del individuo mientras que el sexo a los aspectos claramente biológicos (Drescher, Cohen-Kettenis & Winter, 2012; Stoller, 1964). Cada vez se afinan más las definiciones, y en la actualidad la literatura reporta que el sexo biológico de un individuo se refiere fundamentalmente a su genotipo y sus rasgos biológicos. Así, el sexo se asigna al nacer y suele acompañar a la persona durante el resto de su vida. Por otro lado, el término género tiene que ver con la forma en que alguien se identifica, cómo encaja una persona con las normas sociales, las actividades y los atributos que se asocian comúnmente con los hombres y las mujeres (Drescher et al., 2012).

Por otra parte, la identidad de género se refiere a cómo las personas se definen a sí mismas, como hombres, mujeres, una mezcla de ambos o ninguno (American Psychological Association, 2012; Gómez-Gil, 2019) lo que puede ser coincidente o no con el sexo asignado al nacer. Sentirse hombre o mujer es una base importante para las interacciones con los demás (Beek et al., 2016). Si las identidades o los comportamientos no están en consonancia con el sexo biológico de una persona, se utiliza el término incongruencia de género (IG) (World Health Organization, 2018). En este sentido, el término trans género describe a un amplio espectro de individuos cuya identidad de género difiere del sexo que les fue asignado al nacer. En contraposición, el término cis género hace referencia a las personas cuya identidad de género sí se corresponde con el sexo asignado en el nacimiento (Gómez-Gil, 2019; World Health Organization, 2018).

1.4. Incongruencia de género

Una amplia gama de estudios ha revelado que los efectos del sexo en el cerebro se ejercen tanto en las mujeres como en los hombres a lo largo de la vida, a través de las hormonas esteroides, así como por factores genéticos y ambientales (Cortés-Cortés, 2019; Cortés-Cortés et al., 2017; Fernández et al., 2014a, 2014b, 2015, 2016, 2018, 2020, 2021; Foreman et al., 2019; Hare et al., 2009; Henningsson et al., 2005; Ramírez et al., 2021). Sin embargo, tales efectos se ejercen a través de múltiples mecanismos independientes y pueden variar en función de factores internos y externos (Joel et al., 2020).

Se ha demostrado que los hombres y las mujeres difieren en varias características, pero la mayor diferencia puede encontrarse en la identidad de género: la mayoría de las mujeres se sienten mujeres, y la mayoría de los hombres se sienten hombres. La incongruencia de género (IG) se refiere a la sensación de que las características físicas del cuerpo no están en consonancia con el género experimentado (Kreukels & Guillamon, 2016). Esta discordancia entre las características físicas y el género puede estar asociada o no, con un sentimiento de angustia (Gómez-Gil, 2019).

Entre las personas trans género, el grado de discordancia puede ser muy diverso en intensidad, duración, y grado de repercusión emocional (Gómez-Gil, 2019). Cuando el grado de discordancia es leve, el malestar puede ser leve o estar ausente, y no precisar atención clínica. Pero cuando el grado de discordancia es mayor, puede provocar un malestar significativo. A este malestar que aparece cuando los deseos de tratamiento hormonal o reasignación no son posibles, se denomina disforia de género (American Psychiatric Association, 2013; Gómez-Gil, 2019).

Evolución conceptual de la incongruencia de género

La IG en el ICD-11 (World Health Organization, 2018) se manifiesta por una identificación intensa y persistente con el otro sexo. Por su parte la Organización Mundial de la Salud (OMS) no elimina la transexualidad de su Manual de Codificación (World Health Organization, 2018) pero la clasifica como “condiciones relativas a la salud sexual”, cambiando su nombre a "incongruencia de género". Con estos cambios, la OMS

ha querido alejarse de la connotación de trastorno mental y de comportamiento, pero sin dejar de reconocerla como una situación que requiere de los servicios sanitarios, de esta forma se garantiza la atención de esta población con políticas sanitarias públicas.

Para las personas trans género (abreviado trans), la identidad de género, la expresión (es decir, el género con el que uno se presenta a los demás) y/o el comportamiento (es decir, la forma en que la persona expresa su identidad de género a través de sus acciones) no coinciden con su sexo asignado en el nacimiento, tal y como lo definen las normas de una cultura determinada (Nguyen et al., 2019).

Actualmente una de las distinciones aceptadas para describir las características asociadas a la IG son las siguientes: el hombre transexual o trans men, posee un sexo cromosómico XX y un sexo gonadal femenino (ovarios). Fisiológicamente es mujer, pero su identidad o género son masculinos (Gómez-Gil, 2019; World Health Organization, 2018). La mujer transexual o trans women, posee un sexo cromosómico XY y un sexo gonadal masculino (testículos). Fisiológicamente es varón, pero su género es femenino. Tiene una marcada identificación con el sexo femenino en roles sociales (Gómez-Gil, 2019; World Health Organization, 2018).

Prevalencia de la incongruencia de género

Las tasas de prevalencia de la IG y el número de personas que se identifican como trans género han aumentado en todo el mundo en las últimas dos décadas. En 2016, el Instituto Williams estimó que aproximadamente un 0,6% de los adultos estadounidenses se identificaban como trans género (Nguyen et al., 2019). Según Zucker (2017) la prevalencia de la disforia de género (American Psychiatric Association, 2013) de hombre trans es de 5-14 por cada 1000 hombres adultos y para la mujer trans 2-3 por cada 1000 mujeres adultas.

Actualmente esta cifra está aumentando y no está claro si el aumento de la prevalencia refleja un cambio creciente en la aceptación social y la despatologización de la transexualidad. O también pudiera ser el reflejo de los avances científicos que ofrecen más opciones terapéuticas, como el apoyo psicológico en la transición social y la atención personalizada.

Origen de la incongruencia de género

Se desconocen los mecanismos causales de la incongruencia de género, pero se sugiere que los factores biológicos desempeñan un papel importante. Por ejemplo, estudios de resonancia magnética (MRI) muestran diferentes morfologías cerebrales en mujeres y hombres trans, lo que puede sugerir la existencia de diferentes fenotipos cerebrales que pueden originarse por la acción de las hormonas sexuales en regiones corticales específicas (Guillamón, Junque & Gómez-Gil, 2016; Kiyar, Collet, T'Sjoen & Mueller, 2020; Mueller et al., 2021; Uribe et al., 2020).

No es posible identificar una única causa de la IG, más bien su origen es multifactorial, pero la implicación de factores genéticos gana apoyos a partir de los estudios de gemelos y los estudios de hermanos (Gómez-Gil et al., 2010, 2011). Hasta la fecha, los genes analizados han demostrado la importancia de la producción de andrógenos y estrógenos en las etapas pre y neo natales para la diferenciación sexual del cerebro, viéndose implicados el gen de la aromataasa, el gen del receptor de andrógenos y los genes de los receptores de estrógenos α y β (Cortés-Cortés, 2019; Cortés-Cortés et al., 2017; Fernández et al., 2014a, 2014b, 2015, 2016, 2018, 2020, 2021; Foreman et al., 2019; Hare et al., 2009; Henningson et al., 2005; Ramírez et al., 2021). Esta vulnerabilidad genética se ha estudiado mayormente mediante estudios de polimorfismos genéticos. Recientemente, se ha demostrado que los coactivadores de esteroides NCOA-1, NCOA-2 y p300-CREBBP deberían ser considerados también entre los genes candidatos para el IG (Fernández et al., 2021; Ramírez et al., 2021).

Tratamientos masculinizantes o feminizantes

Las personas con IG pueden hacer una transición social de género mediante un tratamiento hormonal de afirmación de género (GAHT) y también mediante procedimientos quirúrgicos (Kreukels & Guillamon, 2016).

Las características de quienes buscan ayuda están cambiando. En el pasado predominaba la transición de hombre a mujer, pero cada día aumenta más la transición de mujer a hombre (Meyer, Boczek & Bojunga, 2020).

La práctica médica debe desarrollarse dentro de un marco sólido de derechos humanos en el que los pacientes siempre deben ser escuchados. Los médicos con experiencia en la atención integral de la persona, en el manejo de la incertidumbre y la complejidad, deben orientar a las personas y así mismo ofrecerle toda la información necesaria para tratar de aliviar tal preocupación (Bewley, Clifford, McCartney & Byng, 2019).

Al inicio la atención sanitaria para las personas con IG fue muy complicada por la poca información existente, pero en 1975 en los Países Bajos comenzó ~~con~~ la creación de la primera unidad multidisciplinar en Ámsterdam, y paulatinamente se ha ido implantando en muchos países europeos (Gómez-Gil et al., 2020). Estas unidades multidisciplinarias cuentan con un equipo multidisciplinar (psicólogos, ginecólogos, pediatras, cirujanos), y se rigen por las directrices éticas recomendadas por los estándares de atención de la Asociación Profesional Mundial para la Salud Trans género (WPATH) en el 2001 y actualizadas en el 2011 (Gómez-Gil et al., 2020). En España estas unidades se denominan Unidades de Identidad de Género (UIG), las cuales están incluidas en el Sistema Nacional de Salud.

La mayoría de los usuarios de las UIG solicitan tratamiento GAHT masculinizante o feminizante y algunos casos solicitan el tratamiento quirúrgico, pero debido a las complicaciones quirúrgicas que este tipo de procedimiento conlleva todavía, un porcentaje elevado de mujeres trans no solicitan la cirugía genital feminizante y desean preservar su genitalidad y su actividad sexual, y un porcentaje elevado de hombres trans no solicitan faloplastia (Gómez-Gil et al., 2020).

El GAHT es la primera opción recomendada para las personas con IG para lograr alinear sus características físicas con su identidad de género y para mejorar así su calidad de vida. Suppakitjanusant et al., (2020) reportaron que los riesgos a largo plazo del GAHT son bajos, pero pueden incluir una mayor incidencia de trombo embolismo venoso, accidentes cerebrovasculares (ACV) y enfermedades cardiovasculares (ECV) en las mujeres trans y policitemia, acné y alopecia androgénica en los hombres trans.

El GAHT provoca rápidamente cambios marcados y cambios en parte irreversibles (Suppakitjanusant et al., 2020), por eso es necesario el correcto diagnóstico por la UIG de

la IG (Gómez-Gil, Flo, Fernández, Esteva & Gómez-Gil, 2020). El GAHT puede iniciarse en torno a los 16 años, siempre que se obtenga un consentimiento informado, documentado y por escrito de los padres o tutores del adolescente y si el adolescente es lo suficientemente maduro para tomar esta decisión. En los niños y adolescentes más jóvenes, una terapia reversible de supresión de la pubertad con análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) puede iniciarse con el inicio de la pubertad (Meyer et al., 2020).

Se ha demostrado que las personas con IG que han recibido GAHT tuvieron una disminución de los síntomas depresivos, una reducción del malestar corporal y por consiguiente una disminución de la disforia en comparación con el estado previo al tratamiento (Meyer et al., 2020).

1.5. La incongruencia de género y la metilación del ADN

En los mamíferos el 60–70% de las islas CpG se encuentran metiladas. La metilación del ADN está involucrada en diversos procesos del desarrollo mediante el silenciamiento de genes concretos. Aunque existen diferencias en la frecuencia de dichas islas CpGs, se ha podido demostrar que la regulación genética depende del silenciamiento o activación de genes concretos mediante la metilación (Razin & Cedar, 1991).

La metilación del ADN en la IG no ha sido estudiada todavía en profundidad, aunque cada vez existen más evidencias que muestran un papel clave de la metilación del ADN en el desarrollo y la función del cerebro. Lister et al., (2013) demostraron, en primer lugar, que la metilación de las islas se acumula significativamente en las neuronas durante la primera infancia y la adolescencia, convirtiéndose en la forma dominante de metilación del ADN en las neuronas humanas maduras y la plasticidad del cerebro de los mamíferos.

Así cada vez existen más evidencias que indican que el incremento del grado de metilación en las islas CpG dentro de la región promotora del gen *ESRI*, está negativamente asociado a la expresión de dicho gen. McCarthy (2009) sugirió que el cambio en el perfil de metilación del promotor del gen *ESRI* podría participar en la conformación del dimorfismo cerebral en zonas específicas del cerebro.

Por otro lado, la influencia del GAHT en el nivel de metilación de los genes *ESR1*, *ESR2* y *AR* fue estudiado por (Aranda et al., 2017) en donde comparaba el grado de metilación antes y después del GAHT, encontrando un aumento en la metilación del gen *ESR1* en los hombres trans después de 6 y 12 meses de iniciado el GAHT. Aranda et al., (2017) no encontraron diferencias en el grado de metilación del *ESR1* en la población trans de mujeres, mientras que el grado de metilación en la población trans masculina aumentó a los 6 y 12 meses de GAHT. Por otro lado, el AR mostró un incremento significativo de la metilación en la población trans femenina a los 12 meses de tratamiento estrogénico. Los autores sugirieron que el GAHT pudiera estar relacionado con los cambios epigenéticos sufridos en los receptores hormonales. Seis meses de GAHT parece ser suficiente para modular los cambios epigenéticos en las regiones promotoras de los receptores ER y AR.

2. OBJETIVOS

El *objetivo general* de esta investigación fue el estudio de la base epigenética de la incongruencia de género según el ICD-11 (World Health Organization, 2018) en una población de mujeres y hombres trans género de origen caucásico. Para ello se realizaron tres estudios:

PRIMER ESTUDIO: Gender-affirming hormone therapy modifies the CpG methylation pattern of the ESR1 gene promoter after six months of treatment in transmen. *Journal of Sexual Medicine*. 2020; 17(9):1795-1806. doi: 10.1016/j.jsxm.2020.05.027.

Objetivos específicos:

1. Establecimiento de los perfiles de metilación CpG del fragmento III (RIII) de la región promotora del receptor de estrógenos α , en una población trans género española, antes y después de seis meses de GAHT, frente a una población cis género de igual origen geográfico, raza, sexo y edad.
2. Contraste de los perfiles de metilación CpG del RIII según grupo (cis vs trans), sexo asignado al nacer (hombre vs mujer) y tratamiento hormonal (antes vs después).

SEGUNDO ESTUDIO: Estudio de metilación antes del tratamiento hormonal de afirmación de género (GAHT). *Publicación enviada a Frontiers, pendiente de evaluación.*

Objetivos específicos:

1. Realizar el análisis de metilación CpG del ADN global en una población belga con incongruencia de género antes de comenzar el tratamiento GAHT, en contraste con una población cis género seleccionada según raza, origen geográfico y sexo.
2. Realizar los perfiles de metilación en cada población según las variables grupo (cis vs trans) y sexo asignado al nacer (hombre vs mujer).

TERCER ESTUDIO: Estudio de metilación después del tratamiento hormonal de afirmación de género (GAHT). *Publicación enviada a Frontiers, pendiente de evaluación.*

Objetivos específicos:

1. Realizar el análisis de metilación CpG del ADN global en una población belga con incongruencia de género antes *vs* después de seis meses de GAHT, en contraste con una población cis género seleccionada según raza, origen geográfico y sexo.
2. Realizar los perfiles de metilación en cada población según las variables grupo (cis *vs* trans), sexo asignado al nacer (hombre *vs* mujer) y tratamiento hormonal (antes *vs* después).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación corresponde a un diseño experimental con grupo control, que se llevó a cabo en el laboratorio de Psicobiología de la Universidad de A Coruña. El trabajo experimental se llevó a cabo tras obtener el consentimiento firmado de todos los participantes en el estudio, siguiendo los parámetros establecidos en la Declaración de Helsinki sobre los principios éticos para la investigación médica en seres humanos, aprobada por la Asociación Médica Mundial y el Convenio de Oviedo del Consejo de Europa para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la investigación social, biológica y médica. Todos los protocolos, datos y metodologías realizadas, se llevaron a cabo de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999 de la protección de datos.

3.1. Primer estudio de metilación. doi: 10.1016/j.jsxm.2020.05.027.

Sujetos

La muestra se compuso de una población española constituida por 10 hombres cis género, 10 mujeres cis género y 10 mujeres trans género y 10 hombres trans género con incongruencia de género (IG) según el ICD-11, antes y después de seis meses de GAHT. El diagnóstico, selección de la muestra y tratamiento hormonal de los individuos trans género fue realizado por especialistas de la Unidad de Género del Hospital Clínic de Barcelona. La muestra fue seleccionada entre los años 2015 y 2018. Todos los participantes trans género firmaron el consentimiento informado para la donación de las muestras para estudios de investigación médica.

Con el fin de obtener una muestra lo más homogénea posible y evitar así su estratificación (Michels et al., 2013) los criterios de selección de la muestra fueron los siguientes:

- i. Criterios de inclusión para la población trans género: presencia temprana de los primeros síntomas de incongruencia de género (antes de la pubertad), sentir atracción sexual por el otro género y ser mayor de edad para solicitar el GAHT por cambio de sexo.

ii. Criterios de exclusión para toda la población analizada: afección médica grave, historial de consumo de drogas, antecedentes de enfermedad cardiovascular, diabetes o VIH positivo. Se excluyeron asimismo aquellos individuos que habían iniciado previamente el GAHT y que posteriormente lo habían abandonado, así como aquellos que no se presentaron al control de los seis meses.

Respecto al grupo cis se seleccionaron de forma aleatoria hombres y mujeres a partir del estudio de censo Pizarra (Málaga, España) con un emparejamiento por origen geográfico, raza, sexo y edad. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: haber estado hospitalizado por cualquier razón en las cuatro semanas previas a la evaluación, estar embarazada, presencia de alteraciones endocrinas, afección médica grave, historial de consumo de drogas, antecedentes de enfermedad cardiovascular, diabetes o VIH positivo.

Los participantes del censo Pizarra firmaron el consentimiento informado para la donación de las muestras al biobanco del Hospital Regional Universitario de Málaga (antes Hospital Carlos Haya) para estudios de investigación médica. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínic (Barcelona) y del Hospital Regional Universitario (Málaga).

El rango de edad del grupo trans, al inicio de la investigación, fue de 18 a 38 años (media de 24,5) y de 18 a 40 años (media de 24,8) para el grupo cis género.

Tratamiento hormonal para la afirmación de género (GAHT)

El GAHT en la población de hombres trans consistió en la administración intramuscular de testosterona ciclopentilpropionato (cipionato) (250 mg cada 21- 28 días), mientras que la población de mujeres trans recibió valerato de estradiol (2-4 mg/día), asociado con acetato de ciproterona (50 mg/día). El tratamiento fue realizado por los especialistas de la Unidad de Género del Hospital Clínic de Barcelona.

Extracción de sangre

Se realizó en la Unidad de Género del Hospital Clínic de Barcelona en donde los especialistas obtuvieron de cada participante 5ml de sangre periférica en anticoagulante

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético C₁₀H₁₆N₂O₈). A cada participante se le extrajeron dos muestras de sangre: antes de iniciar el tratamiento y después de 6 meses de tratamiento. Estas muestras fueron enviadas al laboratorio de Psicobiología de la UDC mediante mensajería urgente para la posterior extracción de ADN. Las muestras no excedieron nunca las 24 horas desde la extracción hasta la obtención del ADN.

Secuenciación genómica por bisulfito

El ADN genómico de la población trans género se obtuvo usando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Madrid, España) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, entre 250 y 500 ng de ADN de cada individuo fue tratado con bisulfito utilizando el kit de conversión MethylCode (Invitrogen, Madrid, España) siguiendo las indicaciones del fabricante. En esta reacción, la citosina no metilada se transforma en uracilo, mientras que la citosina metilada permanece no reactiva, lo que permite el análisis de los perfiles de ADN metilado con alta resolución cuando la conversión por bisulfito va seguida de la secuenciación (Cokus et al., 2008). Lo que significa que tras la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realiza la conversión de las citosinas no metiladas como timinas y las citosinas metiladas aparecen como citosinas.

Amplificación del fragmento RIII por PCR

Se amplificó por PCR el fragmento RIII de la región promotora del gen del receptor de estrógenos α , gen *ESR1*, siguiendo las indicaciones de Asada et al., (2008) y Maekawa et al., (2016). Este fragmento se encuentra en la posición (-1298 to -731) (Fig. 2). En cuanto a los primers o cebadores utilizados fueron los diseñados por Asada et al., (2008):

Forward: 5'-TTGGGTGTTTGGGATAGTAATTA-3'

Reverse: 5'-CTTAATCCCATTAATAAATTCTCATA-3'

Los productos resultantes de la amplificación se examinaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1,8% y posteriormente fueron purificados usando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Madrid, España).

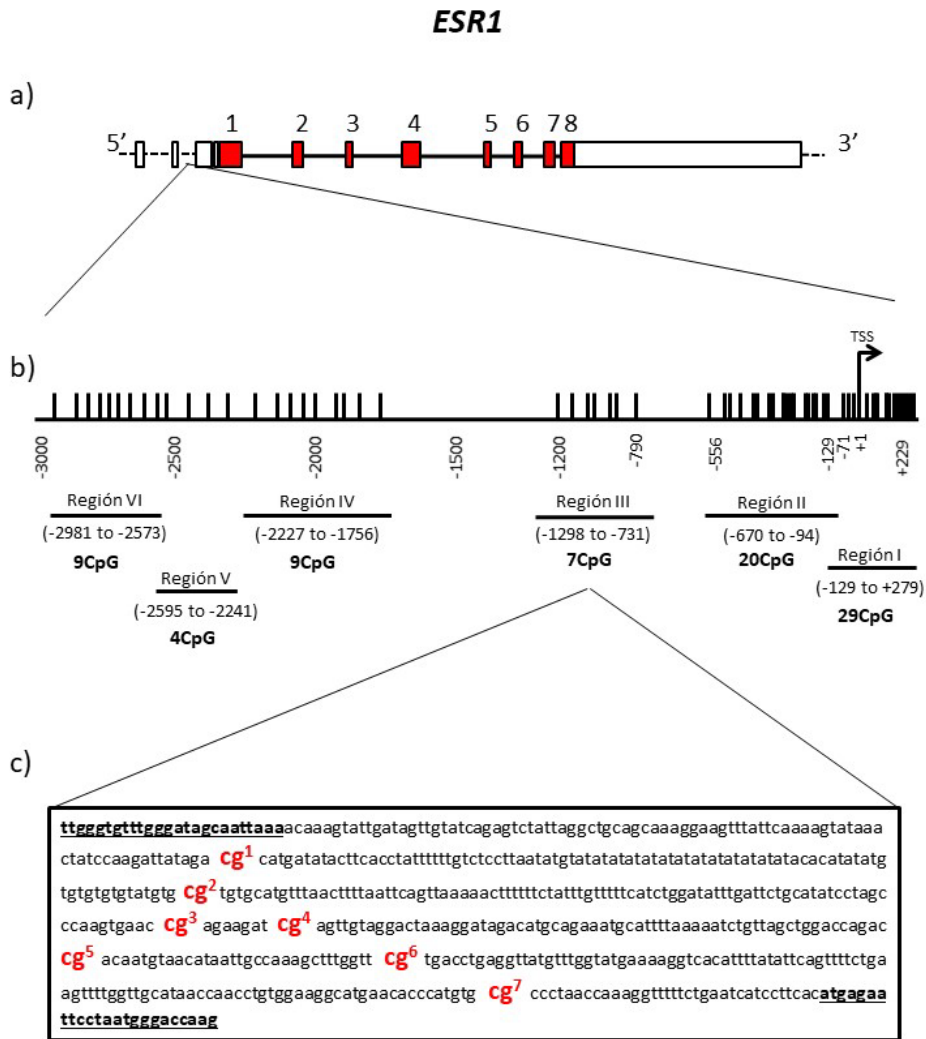


Fig 2.- Representación del gen ESR1 y su región promotora. a) Esquema del gen ESR1. Las cajas indican los exones y las líneas indican los intrones. b) Distribución de los sitios CpG en la región promotora del gen ESR1. La posición del inicio de la transcripción se designa como +1. Las líneas verticales indican las posiciones CpG y las líneas horizontales indican las regiones I a VI, su localización y el número de islas CpGs en cada una de las regiones. c) Secuencia de ADN de la Región III (N° de referencia de la secuencia NCBI: NG_008493.2). La figura muestra la localización de las siete islas CpG en rojo y la localización de los primers. TSS: Transcription Start Site o punto de inicio de la transcripción.

Clonación y Secuenciación

Los productos de las PCRs se clonaron en el plásmido T&A Cloning Vector plasmid (Yeastern Biotech Co, Ltd, Madrid, España), siguiendo las indicaciones comerciales. La posterior transformación se realizó en células competentes de *Escherichia coli* (Yeastern Biotech Co, Ltd, Madrid, España) y se sembró en medio LBA a 37 °C durante la noche.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las colonias blancas fueron seleccionadas y se examinó el tamaño del inserto mediante PCR. Posteriormente, los clones con el tamaño correcto (748 pb = 568 pb del fragmento + 180 pb del vector) fueron sembradas en medio LBA líquido a 37 °C durante toda la noche. Finalmente, previa secuenciación del ADN, los fragmentos se aislaron mediante la técnica de miniprep con el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Madrid, España) según el protocolo del fabricante.

Para definir los perfiles de metilación de cada individuo, se secuenciaron al menos 10 clones por individuo, procedentes de PCRs independientes, utilizando el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Madrid, España). Los ADNs fueron secuenciados en la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la UDC en ambos sentidos.

Análisis Estadístico

Para alinear, visualizar y cuantificar las CpGs metiladas de 671 secuencias de ADN previamente tratado con bisulfito, se empleó el software de acceso libre QUMA (QUantification tool for Methylation Analysis) <http://quma.cdb.riken.jp/>. Este software incluye las funciones de procesamiento de datos necesarias para el análisis de secuencias (Kumaki, Oda & Okano, 2008). Las muestras se agruparon y se contrastaron según el sexo asignado en el nacimiento.

Las diferencias estadísticamente significativas entre los sitios CpG se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher, ya que es adecuada para datos binarios en muestras no apareadas. La tabla 2 x 2 se utilizó para comparar los efectos de la metilación en los sitios

CpG en dos grupos. La significación entre grupos se evaluó mediante la prueba U de Mann-Whitney (du Prel, Röhrig, Hommel & Blettner, 2010).

Las condiciones de exclusión de secuencias de ADN de baja calidad fueron las siguientes: 5 bases como límite máximo de CpGs sin conversión, 95% como límite mínimo de CpGs con conversión, 10 bases como límite máximo de defectos de alineación y 90% como límite mínimo de porcentaje de identidad. Se resaltaron los resultados del análisis que alcanzaron significación estadística en base a $P < 0.05$ y también con un umbral de P corregido por Bonferroni más estricto ($P < 0.05/7 = 0.007$; en donde 7 se corresponde con el número de CpGs en RIII).

3.2. Estudios de metilación del ADN global mediante microarray

Sujetos

La muestra se compuso de una población belga constituida por 8 mujeres cis género, 8 hombres cis género, 7 mujeres trans género y 9 hombres trans género con IG según el ICD-11, antes y después de seis meses de GAHT. El diagnóstico, selección de la muestra y tratamiento de los individuos trans género fue realizado por especialistas del Center for Sexology and Gender, Department of Endocrinology en el Hospital Universitario de Ghent (Bélgica). La muestra fue seleccionada entre los años 2019-2021.

Con el fin de obtener una muestra lo más homogénea posible y evitar así su estratificación (Michels et al., 2013) los criterios de selección de la muestra fueron los siguientes:

- i. Criterios de inclusión para la población trans género: diagnóstico de IG según el ICD-11, sentir atracción sexual por el otro género y ser mayor de edad para solicitar el GAHT.
- ii. Criterios de exclusión para toda la población analizada: afección médica grave. Se excluyeron asimismo aquellos individuos que habían iniciado previamente el GAHT y que posteriormente lo habían abandonado, así como aquellos que no se presentaron al control de los seis meses.

Respecto al grupo cis se seleccionaron de forma aleatoria hombres y mujeres belgas con un emparejamiento por raza, origen geográfico y sexo.

La edad media del grupo cis al comienzo de la investigación fue 27.7 años (SD±7.58) y 34.1 años (SD±14.0) para el grupo trans. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes después de una explicación detallada de los procedimientos. El estudio fue aprobado por los comités de ética de la Universidad de Gent y la UNED.

Tratamiento hormonal cruzado para la reafirmación de género (GAHT)

El GAHT en hombres trans consistió en la administración intramuscular de undecanoato de testosterona (1 g una vez cada 12 semanas), mientras que las mujeres trans recibieron valerato de estradiol (2 x 2 mg / día), asociado con acetato de ciproterona (25 mg / día).

Análisis de metilación del ADN genómico

La extracción de sangre se realizó en el departamento de Endocrinología de la Universidad de Gent, en donde los especialistas obtuvieron de cada participante 5ml de sangre periférica en anticoagulante EDTA. A cada participante se le extrajo sangre dos veces: antes de iniciar el GAHT y después de 6 meses de tratamiento.

El ADN genómico fue extraído en el departamento de Endocrinología de la Universidad de Gent, a partir de sangre periférica mediante el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Bélgica) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las muestras se mantuvieron a -70°C hasta su análisis. Posteriormente las muestras de ADN fueron enviadas al laboratorio de Psicobiología de la UDC, por mensajería urgente en hielo seco para su análisis. A continuación, una alícuota de 1 µg de ADN por sujeto fue procesada para la conversión por bisulfito con el kit comercial Zymo Research EZ Methylation Kit (Zymo Research, España) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ADN tratado con bisulfito fue analizado con el microarray de Illumina © Infinium Human Methylation 850k BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) que evalúa 862,927 sitios CpG en todo el

genoma, y cubre el 99% de los genes conocidos, el 95% de las islas CpG y una alta cobertura de regiones potenciadoras.

Las placas fueron escaneadas con el sistema Illumina iScan SQ y las intensidades de imagen se extrajeron con el programa Genome Studio (2011.1). Los controles de calidad del ADN, la normalización de datos y los filtros estadísticos se realizaron con el módulo de metilación Partek® Genomics Suite® v7.19.1018. Siguiendo las recomendaciones comerciales, las sondas de los cromosomas X e Y se excluyeron del estudio, así como las sondas con $P > 0,05$ también se filtraron para excluir las sondas de baja calidad. En el análisis de loci diferencialmente metilados en humanos y ratones, a menudo se excluyen las sondas de los cromosomas X e Y debido a las dificultades causadas por la inactivación de un cromosoma X en las muestras femeninas. A continuación, se aplicó la normalización funcional, la corrección de fondo NOOB y la corrección de colorante. El análisis de los componentes principales (PCA) se empleó para visualizar las agrupaciones de los datos de metilación (Fig. 3) y también como un procedimiento de control de calidad.

La puntuación de metilación bruta para cada sonda se representó como valor de metilación β , en la que $\beta = \text{intensidad del alelo metilado (M)} / (\text{intensidad del alelo no metilado (U)} + \text{intensidad del alelo metilado (M)} + 100)$. Los valores β se presentaron en un rango entre 0 (no metilado) y 1 (totalmente metilado) siendo interpretado como el porcentaje de metilación CpG (Bibikova et al., 2011; Moran, Arribas & Esteller, 2016). Posteriormente los valores β fueron convertidos en valores M mediante la siguiente fórmula: $M = \log_2(\beta / (1 - \beta))$. Un valor de M cercano al 0 para un sitio CpG indica una intensidad similar para las sondas metiladas y las no metiladas, lo que se corresponde con un sitio CpG medio metilado. Los valores de M positivos indican la presencia de más moléculas metiladas que no metiladas, mientras que los valores de M negativos indican la presencia de más moléculas no metiladas que metiladas. Como sugirió Du et al., (2010), los valores β poseen una interpretación biológica más intuitiva, pero los valores M son valores más apropiados estadísticamente para el análisis diferencial de los grados de metilación. En el análisis de metilación diferencial, el programan Partek® Genomics Suite® calculó automáticamente los valores M que utilizaría en el análisis estadístico. En el presente trabajo, la distribución

de los valores M fue inspeccionado mediante un gráfico de barras y bigotes y la distribución de los valores β mediante un histograma.

Los análisis de metilación diferencial (variación de la media ΔM) ayudó a evaluar las diferencias en el grado de metilación entre las poblaciones. Las sondas fueron después filtradas individualmente basándose en los parámetros que establece la casa comercial Illumina: valor de $P < 0.05$, corrección de la falsa tasa de descubrimiento (FDR) $p < 0.05$ y *fold change* o incremento del cambio $\geq \pm 2$. Todos los análisis se realizaron con el software Partek® Genomics Suite®. El genoma de referencia utilizado para fijar la localización y características de los genes fue el GRCh37/hg19 mediante el navegador UCSC Genome (Kent et al., 2002).

Análisis estadístico

Para detectar la metilación diferencial en los sitios CpGs entre las poblaciones, se realizó una prueba ANOVA de 3 vías, comparando las poblaciones cis género vs trans género según la variable “grupo” (cis vs trans), según la variable “sexo natal asignado” (masculino vs femenino) y según la variable “tratamiento” (antes vs después). Se agregó además seis términos de interacción de contraste para encontrar los sitios CpGs de metilación que cambiaron específicamente en cada población. Para cada contraste, se generaron un valor P , una diferencia del valor Beta ($\Delta\beta$) y una diferencia del valor M (ΔM):

- Hombres trans (antes vs después del tratamiento)
- Mujeres trans (antes vs después del tratamiento)
- Hombres cis vs mujeres trans (antes y después del tratamiento)
- Mujeres cis vs hombres trans (antes y después del tratamiento)

Controles aplicados para excluir asociaciones con el tabaquismo y la edad

Existe una fuerte asociación entre la metilación del ADN y el tabaquismo. Los genes que han mostrado la asociación más fuerte son: *AHRR*, *2q37.1*, *6p21.33*, *F2RL3*, *GPR15*, *GFII*, *CYP1A1*, *MYO1G* y *CNTNAP2* (Flanagan, 2015). Hemos utilizado este

conocimiento para crear una lista de genes relacionados con el tabaquismo y los hemos eliminado de nuestra lista de genes con significación estadística. Esto se ha hecho porque las alteraciones de metilación debidas al tabaquismo son detectables en el ADN en sangre incluso en exfumadores que han dejado de fumar entre 10 y 20 años antes. Además, la población analizada no ha sido excluida según fuese fumadora o no.

Asímismo, varios genes aparecen constantemente asociados con la edad, incluidos los genes *ELOVL2*, *CCDC102B*, *OTUD7A* y *FHL2* (Flanagan, 2015). Por lo tanto, hemos utilizado esta lista de genes para excluirlos de nuestro estudio, antes del análisis de enriquecimiento.

Análisis de enriquecimiento funcional y regulatorio

Se examinó la distribución de CpG estadísticamente significativas a través de anotaciones funcionales y regulatorias. Los hallazgos de CpGs se asignaron a genes conocidos para el enriquecimiento de las clasificaciones de Ontología de genes (GO). El análisis de GO y el análisis de enriquecimiento se llevaron a cabo con el programa Partek® Pathway y la WebGestalt (Gene Set Analysis Toolkit basado en WEB) <http://www.webgestalt.org> (Liao, Wang, Jaehnig, Shi & Zhang, 2019) utilizando los genomas (KEGG) y las bases de datos Panther.

La ontología GO incluye tres divisiones independientes: procesos biológicos (BP), función molecular (MF) y componente celular (CC). El proceso biológico puede definirse como un objetivo biológico al que contribuye el gen o el producto génico. La función molecular se define como la actividad bioquímica de un producto génico, mientras que el componente celular se refiere al lugar de la célula donde el producto génico está activo (Draghici, 2012).

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de metilación del fragmento RIII de la región promotora del gen del receptor de estrógenos α

El fragmento RIII en la región promotora del gen *ESR1* tiene siete sitios CpGs en las posiciones 111, 203, 297, 306, 372, 405 y 509 (Fig. 2). En la Tabla 1 se muestra el grado de metilación de estas siete posiciones CpG, así como la metilación global del fragmento RIII en las poblaciones cis y trans de hombres y mujeres, antes y después de seis meses de GAHT. Las diferencias estadísticamente significativas entre sitios CpGs fueron analizados mediante el test exacto de Fisher por ser una prueba adecuada para datos binarios en muestras no apareadas (du Prel et al., 2010). Se usaron comparativas 2 x 2 para analizar los efectos del cambio de metilación entre dos grupos. La significación global entre dos poblaciones fue analizada mediante la prueba U de Mann-Whitney por ser valores no distribuidos normalmente en dos poblaciones no pareadas (du Prel et al., 2010). En la Tabla 2 se muestran las significaciones a nivel $P \leq 0.05$, $P \leq 0.005$ y $P \leq 0.0005$.

Tabla 1.- Grado de metilación en cada posición CpG y del fragmento total, en poblaciones cis y trans, antes y después de seis meses de tratamiento hormonal cruzado.

Grado de metilación (%)								
Sitios CpG en RIII de la región promotora del <i>ESR1</i>								
Grupos	111	203	297	306	372	405	509	Total
Cis mujer	86,8	89,5	81,6	92,1	94,6	78,9	78,9	86,0
Cis hombre	92,0	92,0	97,7	100,0	88,5	77,0	97,7	92,1
Trans mujer	96,2	87,7	93,8	99,2	86,2	68,5	86,2	88,2
Trans mujer (+6m)	91,5	91,5	95,7	95,7	78,7	74,5	83,0	87,2
Trans hombre	97,9	89,4	95,7	82,6	70,2	53,2	89,4	82,6
Trans hombre (+6m)	86,8	97,4	94,7	89,5	98,7	72,4	80,3	88,5

RESULTADOS

Tabla 2.- Valores P de la prueba exacta de Fisher y la prueba U de Mann-Whitney

CpGs	Grupos	Cis hombre	Trans mujer	Trans mujer (+6m)	Trans hombre	Trans hombre (+6m)
111	Cis mujer	0,509	0,048*	0,725	0,085	1,000
	Cis hombre	--	0,230	1,000	0,260	0,315
	Trans mujer		--	0,248	0,687	0,023*
	Trans mujer (+6m)			--	0,361	0,564
	Trans hombre				--	0,050*
	Trans hombre (+6m)					--
203	Cis mujer	0,734	0,791	1,000	1,000	0,176
	Cis hombre	--	0,374	1,000	0,753	0,177
	Trans mujer		--	0,597	0,802	0,020*
	Trans mujer (+6m)			--	1,000	0,201
	Trans hombre				--	0,105
	Trans hombre (+6m)					--
297	Cis mujer	0,003**	0,028*	0,071	0,071	0,040*
	Cis hombre	--	0,211	0,612	0,612	0,419
	Trans mujer		--	0,733	0,733	1,000
	Trans mujer (+6m)			--	1,000	1,000
	Trans hombre				--	1,000
	Trans hombre (+6m)					--
306	Cis mujer	0,026*	0,037*	0,652	0,330	0,749
	Cis hombre	--	1,000	0,121	0,0001***	0,002**
	Trans mujer		--	0,172	0,0001***	0,002**
	Trans mujer (+6m)			--	0,050*	0,315
	Trans hombre				--	0,407
	Trans hombre (+6m)					--

372	Cis mujer	0,347	0,251	0,058	0,005**	0,249
	Cis hombre	--	0,683	0,203	0,011*	0,011*
	Trans mujer		--	0,248	0,018*	0,002**
	Trans mujer (+6m)			--	0,478	0,0003***
	Trans hombre				--	0,0001***
	Trans hombre (+6m)					--
	405	Cis mujer	0,823	0,231	0,798	0,022*
Cis hombre		--	0,218	0,832	0,006*	0,588
Trans mujer			--	0,465	0,076	0,637
Trans mujer (+6m)				--	0,053	0,837
Trans hombre					--	0,034*
Trans hombre (+6m)						--
509		Cis mujer	0,001**	0,310	0,781	0,232
	Cis hombre	--	0,003**	0,004**	0,051	0,0003***
	Trans mujer		--	0,633	0,626	0,325
	Trans mujer (+6m)			--	0,552	0,814
	Trans hombre				--	0,217
	Trans hombre (+6m)					--

RESULTADOS

Total Fisher's exact test	Cis women	0,006*	0,339	0,716	0,2613	0,360
	Cis men	--	0,015*	0,020*	0,0001***	0,044*
	Trans women		--	0,692	0,0107*	0,932
	Trans women (+6m)			--	0,1030	0,590
	Trans men				--	0,019*
	Trans men (+6m)					--
Total Mann-Whitney U-test	Cis women	0,066	0,935	0,902	0,131	0,513
	Cis men	--	0,006*	0,095	0,0003***	0,154
	Trans women		--	0,881	0,021*	0,325
	Trans women (+6m)			--	0,121	0,670
	Trans men				--	0,020*
	Trans men (+6m)					--

* Diferencias significativas a nivel $P \leq 0.05$;

** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0.005$;

*** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0.0005$

Análisis comparativo del grado de metilación entre hombres y mujeres cis

Al comparar el grado de metilación entre hombres y mujeres cis se encontró que el grado de metilación fue significativamente mayor para los hombres respecto a las mujeres en las posiciones CpG 297 ($P \leq 0,003$), 306 ($P \leq 0,026$) y 509 ($P \leq 0,001$) y también a nivel global ($P \leq 0,006$) (Tablas 1-2; Figura 3).

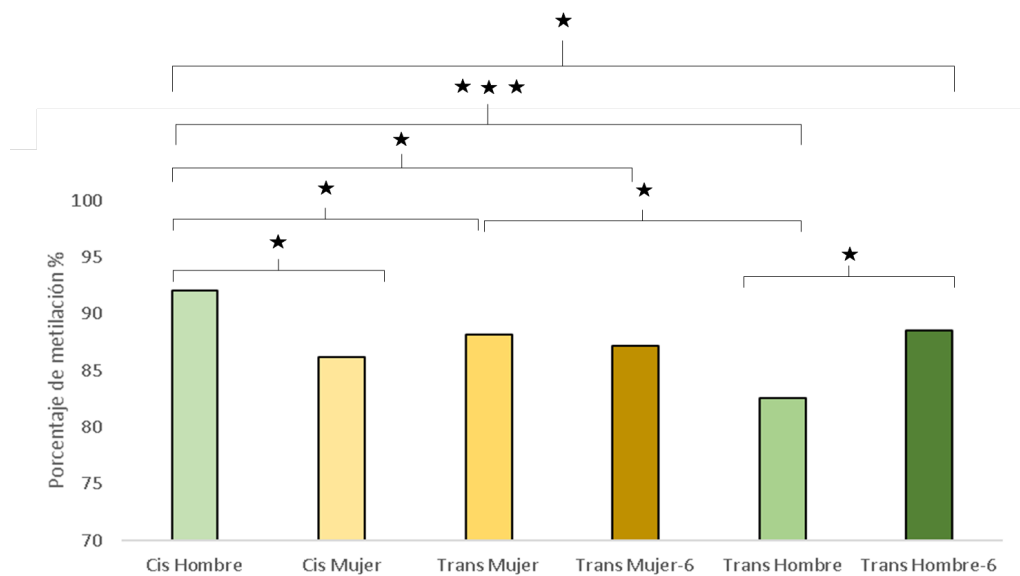


Fig 3.- Análisis del grado de metilación global del RIII en la población cis y trans, hombres y mujeres, antes y después del tratamiento GAHT. Los hombres cis mostraron un grado de metilación más alto que las mujeres cis. Las mujeres trans mostraron inicialmente un nivel de metilación intermedio entre los hombres y las mujeres cis. Después de seis meses de tratamiento mostraron una ligera desmetilación, pero aún se evidencia un grado de metilación intermedio entre ambas poblaciones cis. Los hombres trans, antes del tratamiento hormonal mostraban el nivel de metilación más bajo, pero después de seis meses de tratamiento hormonal mostraron un aumento importante del grado de metilación, alcanzando un nivel intermedio entre las mujeres cis y los hombres cis.

- * Diferencias significativas a nivel $P \leq 0.05$.
- ** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0.005$.
- *** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0.0005$.

Análisis comparativo del grado de metilación en mujeres y hombres trans, antes del tratamiento hormonal cruzado

El grado de metilación fue estadísticamente mayor en las mujeres trans que en los hombres trans en las posiciones CpG 306 ($P \leq 0,0001$) y 372 ($P \leq 0,018$). También se observaron diferencias significativas a nivel global ($P \leq 0,0107$) (Tablas 1-2, Figura 4).

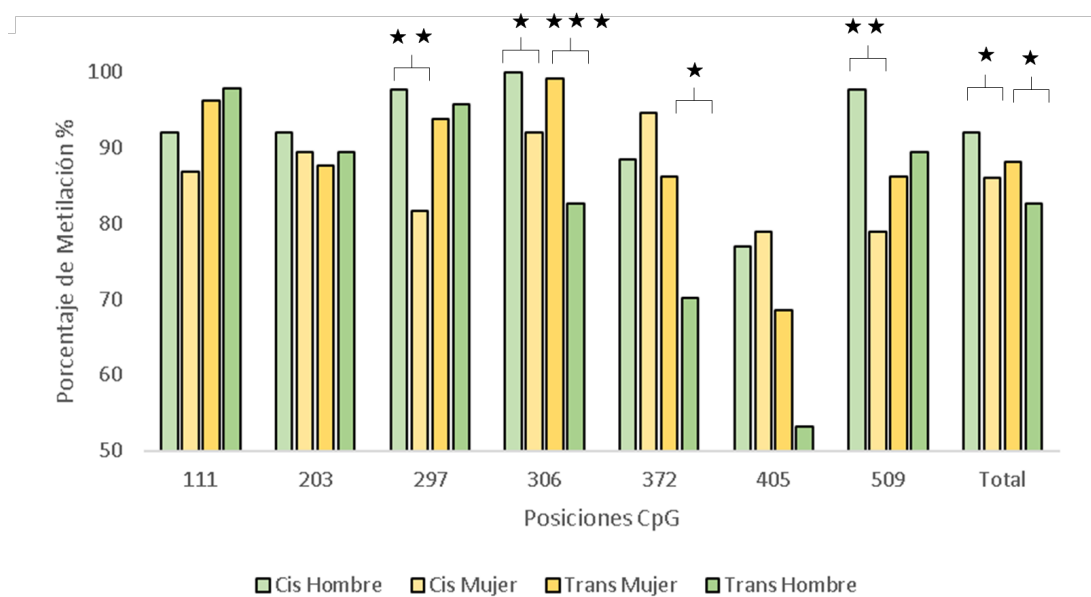


Fig 4.- Análisis comparativo del grado de metilación entre hombres y mujeres, cis y trans, antes del tratamiento hormonal cruzado. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las posiciones CpG 297, 306, 372, 509 y a nivel global del fragmento. El grado de metilación fue mayor en los hombres cis que en las mujeres cis en todos los CpG estadísticamente significativos y en el fragmento total. Al comparar mujeres trans y hombres trans, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las posiciones 306 y 372, y en el fragmento total. En ambas posiciones estadísticamente significativas (306 y 372), y también en el fragmento total, el grado de metilación fue mayor en las mujeres trans que en los hombres trans.

* Diferencias significativas a nivel $P \leq 0,05$,

** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0,005$

*** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0,0005$

Análisis comparativo del grado de metilación en las mujeres y los hombres trans, antes y después del tratamiento hormonal cruzado

Cuando se compararon las mujeres trans, antes y después del tratamiento hormonal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el perfil de metilación en ninguna posición CpG, ni en el fragmento total (Tablas 1-2; Figura 5). Sin embargo, la población de hombres trans, mostró un aumento estadísticamente significativo del grado de metilación global ($P \leq 0,019$) (Tablas 1-2; Figura 5). La posición CpG 111 mostró una disminución de la metilación estadísticamente significativa ($P \leq 0,050$), mientras que las posiciones 372 ($P \leq 0,0001$) y 405 ($P \leq 0,034$) mostraron un fuerte incremento.

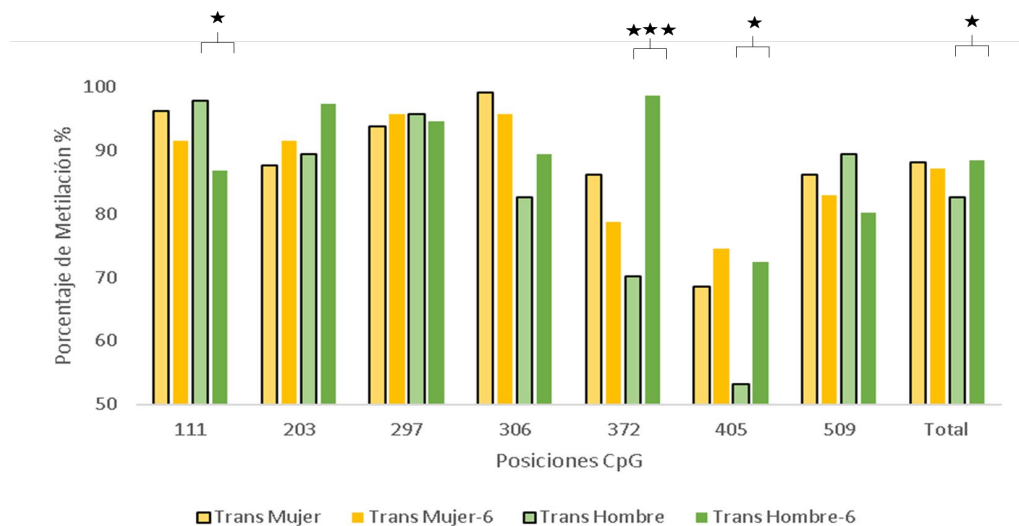


Fig 5.- Análisis comparativo del grado de metilación en poblaciones trans, antes y después del tratamiento hormonal. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna posición CpG, ni en el fragmento total, al comparar los perfiles de metilación en el grupo de mujeres trans antes y después del tratamiento hormonal. Respecto a la población de hombres trans se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las posiciones 111, 372, 405 y también a nivel global. Después del tratamiento hormonal, el grado de metilación en la posición 111 CpG disminuyó, mientras que en las posiciones 372 y 405, y en el fragmento total, el grado de metilación aumentó.

* Diferencias significativas a nivel $P \leq 0.05$

*** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0,0005$

Análisis comparativo del grado de metilación entre ambas poblaciones cis frente a las mujeres trans, antes y después del tratamiento hormonal

Antes del tratamiento hormonal cruzado, cuando se compararon las mujeres cis y trans, se pudo observar un mayor grado de metilación estadísticamente significativo en las mujeres trans en las posiciones 111 ($P \leq 0,048$), 297 ($P \leq 0,028$) y 306 ($P \leq 0,037$). Esta diferencia no fue significativa a nivel global del fragmento ($P \leq 0,339$).

Respecto a la población de hombres cis, las mujeres trans mostraron un menor grado de metilación estadísticamente significativo en la posición 509 ($P \leq 0,003$) y también a nivel global ($P \leq 0,015$) (Tablas 1-2, Figura 6).

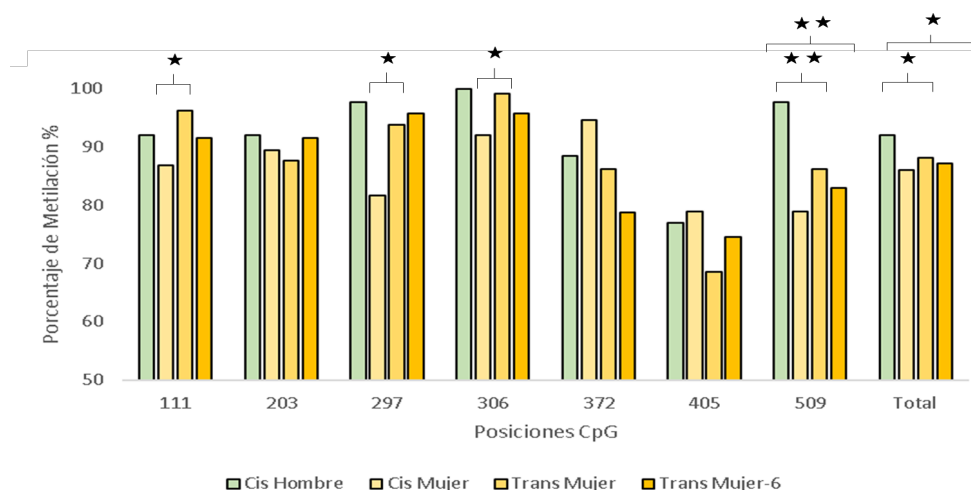


Fig 6.- Representación del grado de metilación en la población cis y en mujeres trans, antes y después del tratamiento hormonal. Antes del tratamiento hormonal, las mujeres trans mostraban un grado de metilación mayor estadísticamente significativo, que las mujeres cis, en las posiciones 111, 297 y 306. Respecto a los hombres cis, las mujeres trans mostraban un grado de metilación menor, estadísticamente significativo, en la posición 509 y también en el fragmento total. Después de seis meses de tratamiento hormonal, el grado de metilación en mujeres cis y trans no mostraba diferencias estadísticamente significativas en ninguna posición. Sin embargo, respecto a la población de hombres cis, las mujeres trans mostraban un menor grado de metilación, estadísticamente significativo, en la posición 509 y en el fragmento total.

* Diferencias significativas a nivel $P \leq 0,05$

** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0,005$

Tras seis meses de tratamiento hormonal cruzado, el grado de metilación entre mujeres trans y mujeres cis no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna posición, mientras que el análisis comparativo respecto a los hombres cis mostró un grado de metilación estadísticamente menor en la posición 509 CpG ($P \leq 0,004$) y en el fragmento total ($P \leq 0,020$) (Tablas 1-2; Figura 6). En general, la población de mujeres trans mostró una ligera disminución de la metilación tras el tratamiento hormonal, manteniéndose en un nivel intermedio de metilación entre las poblaciones cis de mujeres y hombres.

Análisis comparativo del grado de metilación entre ambas poblaciones cis y hombres trans, antes y después del tratamiento hormonal

Antes del tratamiento hormonal, la población de hombres trans mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a ambas poblaciones cis. El grado de metilación fue mayor en los hombres cis que en los hombres trans y esto se pudo observar en las posiciones CpG 306 ($P \leq 0,0001$), 372 ($P \leq 0,011$) y 405 ($P \leq 0,006$), así como en el fragmento total ($P \leq 0,0001$) (Tablas 1-2; Figura 7). Ahora bien, respecto a las mujeres cis, el grado de metilación fue estadísticamente mayor en las mujeres cis que en los hombres trans en las posiciones CpG 372 ($P \leq 0,005$) y 405 ($P \leq 0,022$), así como en el fragmento global, pero sin significación estadística (Tablas 1-2; Figuras 7).

Tras seis meses de tratamiento hormonal cruzado, el análisis comparativo entre hombres trans y cis mostró diferencias estadísticamente significativas en la posición CpG 306 ($P \leq 0,002$), 372 ($P \leq 0,011$), 509 ($P \leq 0,0003$) y en el fragmento total ($P \leq 0,044$) (Tablas 1-2, Figura 7). El grado de metilación fue menor en los hombres trans en las posiciones 306, 509 y también para el fragmento total, y fue mayor en la posición 372.

Al comparar los hombres trans con las mujeres cis, el grado de metilación fue mayor en los hombres trans sólo en la posición 297 ($P \leq 0,04$), pero después del tratamiento hormonal, los hombres trans mostraron un grado de metilación intermedio entre las mujeres cis y los hombres cis (Tablas 1-2; Figura 7).

RESULTADOS

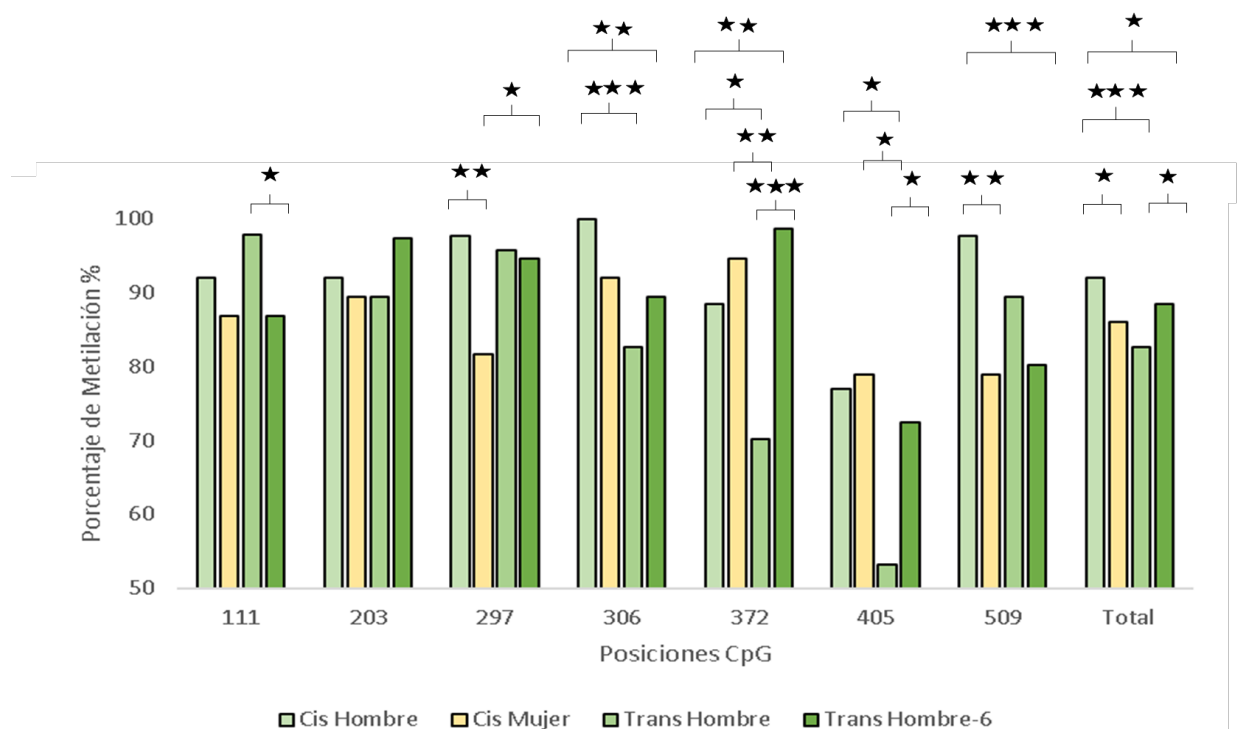


Fig 7.- Representación del patrón de metilación CpG en las poblaciones cis y en la población trans de hombres, antes y después del tratamiento hormonal. Antes del tratamiento hormonal, y respecto a los hombres cis, los hombres trans mostraron un menor grado de metilación en las posiciones 306, 372 y 405, y también en el fragmento total. Respecto a las mujeres cis, la población de hombres trans también mostró un menor grado de metilación estadísticamente significativo en las posiciones 372 y 405. Después del tratamiento hormonal, la población de hombres trans mostró, respecto a los hombres cis, un grado de metilación significativamente menor en las posiciones 306 y 509, y también en el fragmento total. En la posición 372, el grado de metilación fue mayor en los hombres trans después del tratamiento hormonal que en los hombres cis. Respecto a las mujeres cis, hubo diferencias estadísticamente significativas solo en la posición 297, y los hombres trans mostraron después del tratamiento hormonal, un mayor grado de metilación que las mujeres cis.

* Diferencias significativas a nivel $P \leq 0,05$

** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0,005$

*** Diferencias significativas a nivel $P \leq 0.0005$

4.2. Estudios de metilación del ADN global mediante microarray

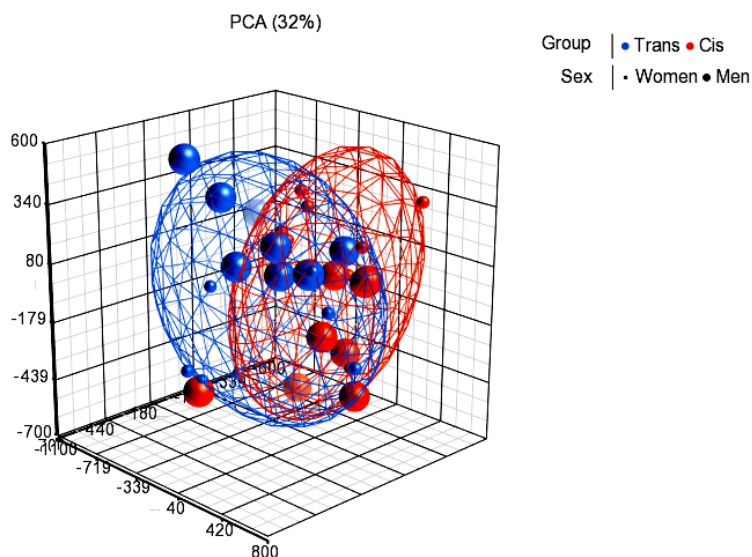
Estudio de metilación global CpG antes del GAHT

Se analizaron mediante microarray dieciséis personas trans género flamencas belgas (9 hombres trans y 7 mujeres trans) antes del GAHT, y dieciséis personas cis género flamencas belgas (8 hombres cis y 8 mujeres cis). La población fue reclutada en el Centro de Sexología y Género, Departamento de Endocrinología del Hospital Universitario de Gante (Bélgica). La edad media del grupo cis género al comienzo de la investigación fue 27,75 años (DE \pm 7,6) y 34,1 años (DE \pm 14,0) para el grupo trans género. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes después de una explicación completa de los procedimientos. El estudio fue aprobado por los comités de ética del Hospital Universitario de Gent y la UNED.

Primeramente, se procedió a la normalización de las muestras, para ello se aplicaron la corrección de fondo NOOB y la corrección de colorante. Posteriormente se realizó un análisis de los componentes principales (PCA) para visualizar los grupos de datos, así como procedimiento de control de calidad (Fig 8).

La puntuación de metilación bruta para cada sonda se representó como metilación beta (β), en la que $\beta = \text{intensidad del alelo metilado (M)} / \text{intensidad del alelo no metilado (U)} + \text{intensidad del alelo metilado (M)} + 100$. Los valores β oscilan entre 0 (sin metilar) y 1 (completamente metilado) y pueden interpretarse ampliamente como el porcentaje de metilación de CpG (Bibikova et al., 2011; Moran et al., 2016). Posteriormente, los valores β se convirtieron en valores M utilizando la siguiente ecuación: $\text{valor M} = \log_2 (\beta / (1 - \beta))$. Un valor M cercano a 0 para un sitio CpG indica una intensidad similar de las sondas metiladas y no metiladas, lo que significa que el sitio CpG está aproximadamente medio metilado (50%). Los valores M positivos significan que hay más moléculas metiladas que no metiladas, mientras que los valores M negativos significan que hay más moléculas no metiladas que metiladas.

A)



B)

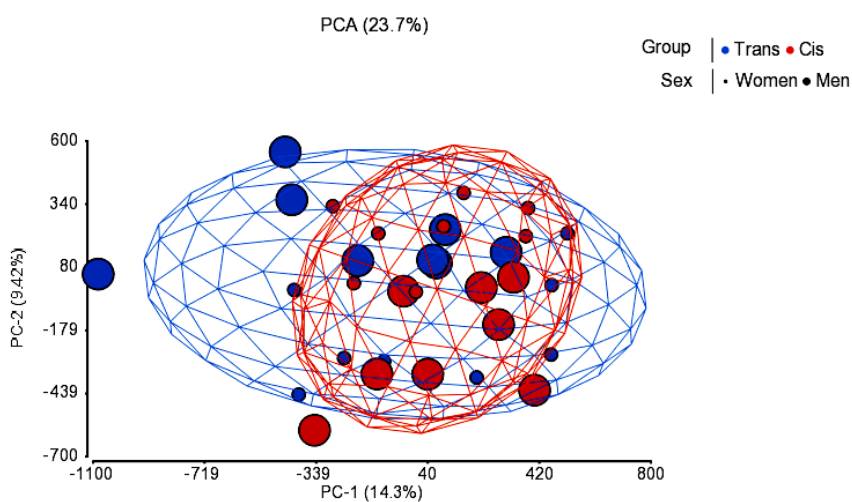


Fig 8.- Gráfico de análisis de los componentes principales (PCA) que muestra los perfiles de metilación de las muestras de estudio, en una representación 3D (A) y 2D (B). Cada punto del gráfico es una muestra única y representa el estado de metilación promedio en todos los loci CpG. Los ejes son los primeros tres PC, el número entre paréntesis indica la fracción de varianza explicada por cada PC. El número en la parte superior es la variación explicada por los tres primeros PC. Las muestras están coloreadas según la variable “grupo” (azul para trans y rojo para cis), y clasificadas según la variable “sexo natal asignado” (tamaño pequeño para mujeres y grande para hombres).

Debido a que se trata de un análisis diferencial, el programa Partek® Genomics Suite® crea automáticamente los valores M para emplearlos en el análisis estadístico. La distribución de los valores M se inspeccionó mediante un diagrama de cajas y bigotes (Figura 12) y la distribución de los valores beta mediante un histograma (Figura 13).

Para detectar la metilación diferencial entre las poblaciones cis y trans antes del GAHT, se realizó una prueba ANOVA de 2 vías, comparando los individuos según la variable “sexo natal asignado”. A continuación, se agregaron dos términos de interacción de contraste: i) varones (cis *versus* trans) según la variable “sexo natal asignado”. ii) mujeres (cis *versus* trans) según la variable “sexo natal asignado”. Para cada contraste se generaron un valor P, un valor diferencial β ($\Delta\beta$) y un valor diferencial M (ΔM).

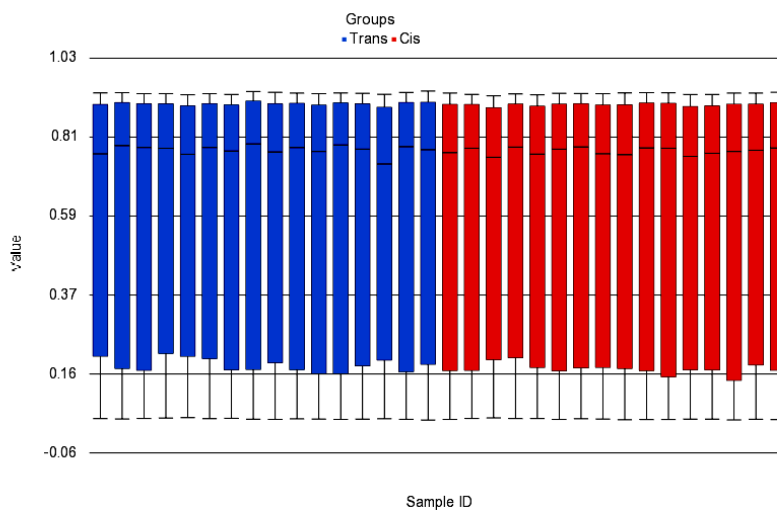


Fig 9.- Gráfico de cajas y bigotes que muestra la distribución de los valores M (eje Y) en las muestras de estudio (eje X). Las muestras están coloreadas según la variable “grupo” (azul para trans y rojo para cis). La línea media corresponde a la mediana, el cuadro representa el cuartil superior e inferior, mientras que los bigotes corresponden al percentil 90 y 10 de los datos.

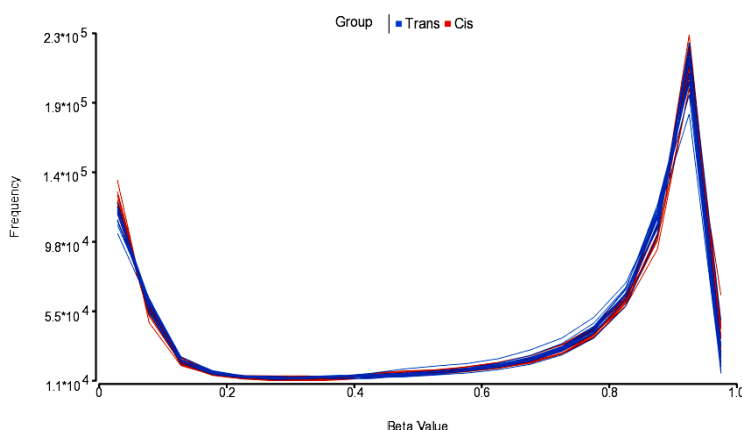


Fig 10.- Histograma de las muestras analizadas. Cada muestra es una línea, los valores beta están en el eje horizontal y sus frecuencias en el eje vertical. Los dos picos corresponden a los dos tipos de sonda (I y II) presentes en la matriz de metilación EPIC. Los colores de la muestra corresponden a la variable “grupo” (azul para trans y rojo para cis).

Cuando se comparó el grado de metilación del ADN entre las poblaciones cis y trans según la variable sexo natal asignado, se encontraron 71.515 CpGs que superaban el criterio estadístico FDR $P < 0,05$ (Figura 11). Además, el 28,5% de ellas se encontraban localizadas en islas CpG. Aproximadamente un tercio de estas posiciones (32,3%) estaban hipometiladas, mientras que el 67,66% estaban hipermetiladas en los hombres cis respecto a la población trans. En las mujeres cis, el 27,05% de los CpGs estaban hipometilados mientras que el 72,95% estaban hipermetilados respecto a la población trans. Estas CpGs estadísticamente significativas se encontraban dispersos por todo el genoma.

Análisis de los hombres cis vs trans, según la variable sexo natal asignado

Cuando se contrastó específicamente el metiloma en las personas con sexo natal masculino, se encontraron 87 CpGs que superaron ambos criterios estadísticos (FDR $P < 0,05$; y *fold change* $\geq \pm 2$), de los cuales 22 CpGs estaban localizados en islas: 14 estaban hipometilados mientras que 8 estaban hipermetilados en la población cis. Las 22 islas CpG que pasaron ambos criterios estadísticos se muestran en la tabla 3. Las islas CpG más significativas estaban relacionadas con los genes *WDR45B*, *SLC6A20*, *UBALD1*, *GRASP*, *NHLH1*, *PLEKHA5*, *SLC37A1*, *NCOA6* y *ARL6IP1* (Tabla 3; Figura 12).

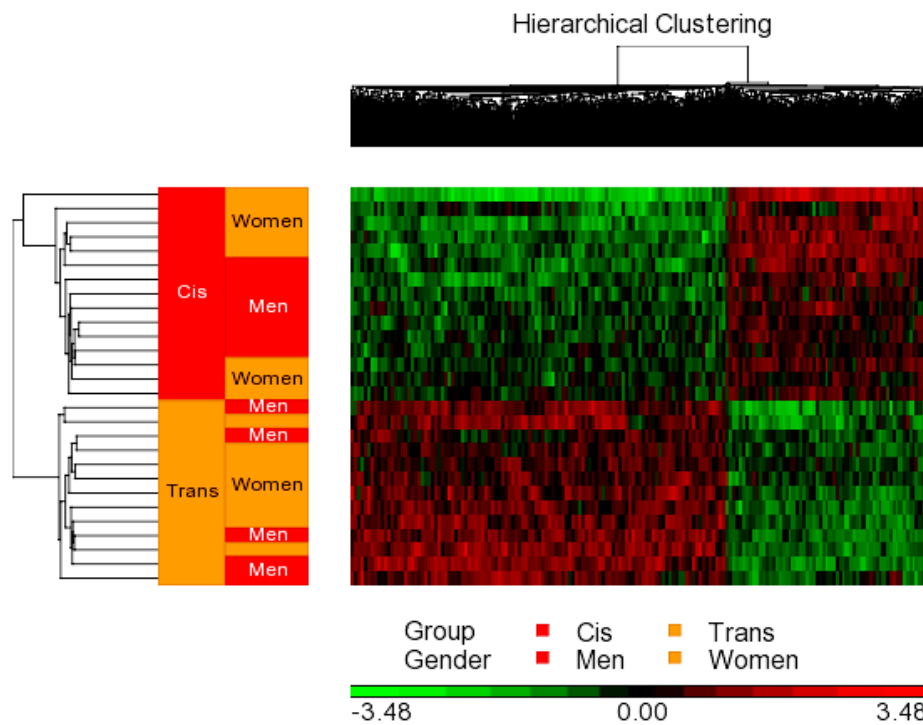


Fig 11. Agrupación jerárquica con mapa de calor según la lista de loci CpG importantes. Los grupos experimentales son filas, mientras que los loci CpG son columnas. Los niveles de metilación se comparan entre los grupos cis y trans. Los loci CpG con metilación más alta están coloreados de rojo, los loci CpG con metilación más baja son de color verde. Las muestras trans son de color naranja y las muestras cis son de color rojo en el dendograma en el lado izquierdo del mapa de calor. Los hombres están coloreados de rojo y las mujeres de naranja.

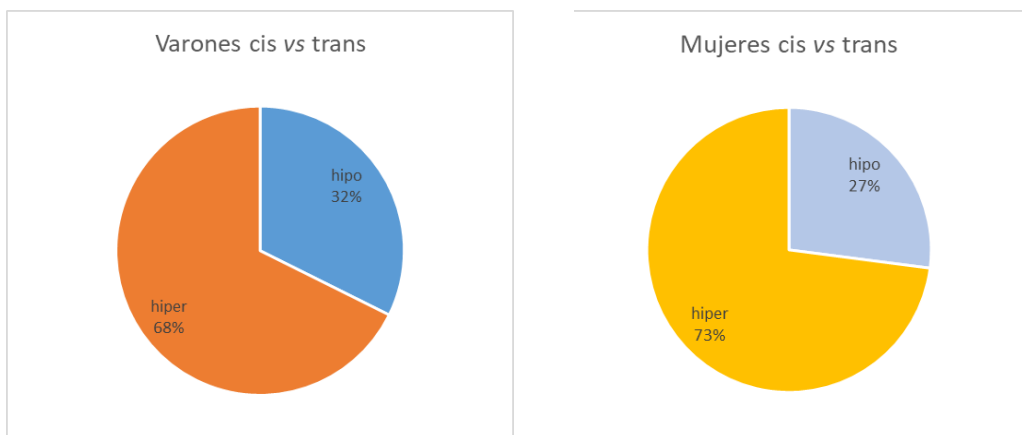


Fig 12. Comparativa global del grado de metilación entre la población cis y la población trans según la variable sexo natal asignado. Se encontraron 71.515 CpGs que superaban el criterio estadístico $FDR P < 0,05$. En la población masculina, aproximadamente un tercio de estas posiciones (32,3%) estaban hipometiladas, mientras que el 67,66% estaban hipermetiladas en la población cis respecto a la población trans. En la población femenina, el 27,05% de los CpGs estaban hipometilados mientras que el 72,95% estaban hipermetilados en la población cis respecto a la población trans.

RESULTADOS

Tabla 3. Identificación de las 22 islas CpG que pasaron los criterios estadísticos (FDR $p < 0.05$; fold change ≥ 2.0), en la población con sexo natal masculino.

ID del conjunto de sondas	Gen	P-valor (cis vs trans)	Diferencia (cis vs trans)	Diferencia (Descripción) (cis vs trans)
cg10401531	<i>WDR45B</i>	2.97E-07	-2.20167	cis men down vs trans women
cg09700085	<i>SLC6A20</i>	3.49E-05	-2.00023	cis men down vs trans women
cg21538190	<i>NHLH1</i>	4.81E-05	-2.47591	cis men down vs trans women
cg24441383	<i>PLEKHA5</i>	4.87E-05	2.03159	cis men up vs trans women
cg16240751	---	5.29E-05	-2.05596	cis men down vs trans women
cg25764197	<i>UBALDI</i>	6.39E-05	2.6023	cis men up vs trans women
cg12993026	<i>SLC37A1</i>	0.000286382	2.19509	cis men up vs trans women
cg26358144	<i>ARL6IP1</i>	0.000298896	-2.10562	cis men down vs trans women
cg09016212	<i>GRASP</i>	0.000450551	2.40079	cis men up vs trans women
cg04208499	<i>NCOA6</i>	0.00138631	-5.96574	cis men down vs trans women
cg11502198	<i>ABT1</i>	0.00144373	-2.00222	cis men down vs trans women
cg02090742	<i>C17orf79</i>	0.00158261	-5.81018	cis men down vs trans women
cg11738485	<i>HOOK2</i>	0.00166823	-4.62858	cis men down vs trans women
cg04657146	<i>HOOK2</i>	0.00199853	-3.6818	cis men down vs trans women
cg09698465	---	0.00229726	6.38536	cis men up vs trans women
cg14623093	<i>GORASP1</i>	0.00285936	2.37051	cis men up vs trans women
cg20544675	<i>LETM2</i>	0.00336149	2.15344	cis men up vs trans women
cg12688781	<i>AACS</i>	0.00360693	-2.22118	cis men down vs trans women
cg01655658	<i>HLA-L</i>	0.00371637	-2.56482	cis men down vs trans women
cg11424828	<i>MYOM2</i>	0.00407032	-4.38544	cis men down vs trans women
cg05528899	---	0.00437277	-3.36645	cis men down vs trans women
cg24418853	<i>PTPLA</i>	0.00463796	3.29113	cis men up vs trans women

(---) Algunos sitios CpG no se encuentran localizados en genes, lo que significa que o bien estos CpG se encuentran en áreas intragénicas o bien se desconoce su ubicación.

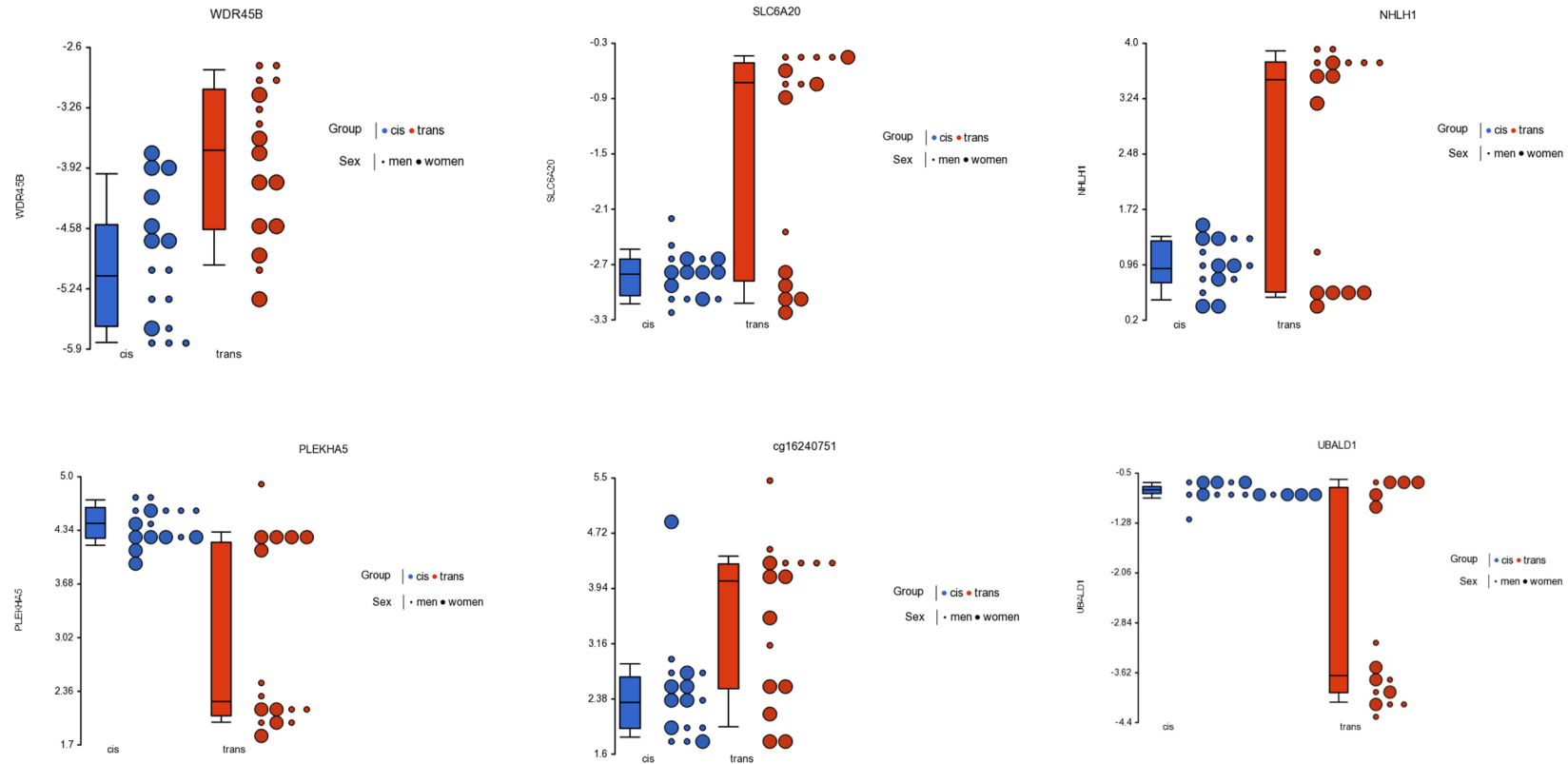


Fig 12.- Gráfico de puntos que muestra los valores M para los genes *WDR45B*, *SLC6A20*, *NHLH1*, *PLEKHA5*, un locus intergénico (*cg16240751*) y *UBALD1*, para poblaciones cis vs trans según el sexo natal asignado. Cada muestra está representada por un punto, que corresponde al grado total de metilación. Las muestras están coloreadas según la variable "grupo" (azul para la población cis y rojo para la población trans), y clasificadas según la variable sexo natal asignado (grande para mujeres y pequeño para hombres). La línea media es la mediana, el cuadro representa el cuartil superior e inferior, mientras que los bigotes corresponden al percentil 90 y 10 de los datos.

Análisis de las mujeres cis vs trans, según la variable sexo natal asignado

Respecto a la población con sexo natal femenino, se encontraron 70 CpGs que pasaron el criterio FDR $P < 0,05$ de los cuales 2 CpGs también pasaron el criterio *fold change* $\geq \pm 2$ (Tabla 4), pero ninguno de ellos se encontraba localizado en islas. En la Tabla 4 se enumera las 2 CpGs que pasaron ambos criterios estadísticos (Figura 13).

Tabla 4. Las dos CpG que pasaron la corrección estadística (FDR $p < 0.05$; *fold change* ≥ 2.0) en la población asignada mujer al nacer.

ID del conjunto de sondas	Gen	Relación UCSC_CpG_Isla	P-valor (cis vs trans)	Diferencia (cis vs trans)	Diferencias (Descripción) (cis vs trans)
cg16149820	---	N_Shelf	3.14E-07	538.516	cis mujer up vs trans hombre
cg23944405	MPPED2	N_Shelf	2.85E-06	-552.554	cis mujer down vs trans hombre

(---) CpG no está ubicada en gen, lo que significa que estas sondas pueden ubicarse en áreas intragénicas o la información sobre ellas permanece desconocida. **N_Shelf**: ubicación relativa a la isla CpG, entre 2 y 4 kb up- y downstream.

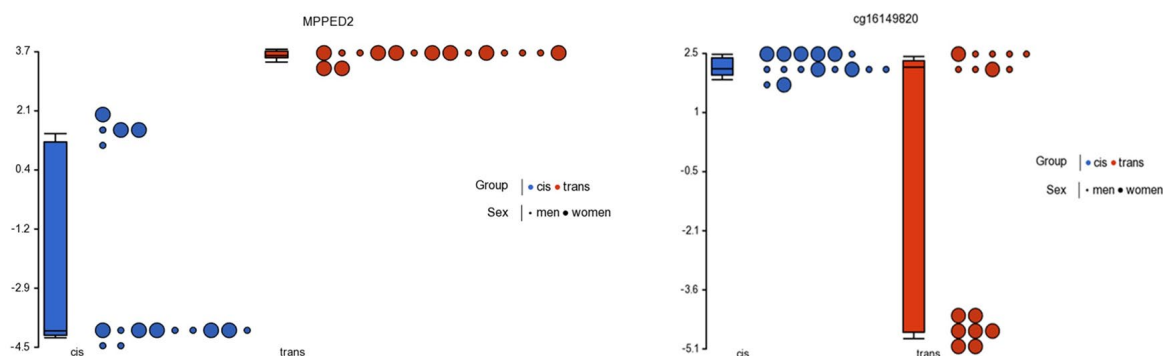


Fig 13.- Gráfico de puntos que muestra los valores *M* para *cg23944405* en el gen *MPPED2* y *cg16149820* para poblaciones cis frente a trans, según el sexo natal asignado. Cada muestra está representada por un punto. Las muestras están coloreadas según la variable "grupo" (azul para la población cis y rojo para la población trans), y clasificadas según la variable sexo natal asignado (grande para mujeres y pequeño para hombres). La línea media es la mediana, el cuadro representa el cuartil superior e inferior, mientras que los bigotes corresponden al percentil 90 y 10 de los datos.

Análisis de enriquecimiento funcional y regulatorio

Una vez seleccionados los CpGs significativos, y antes de realizar el análisis de enriquecimiento, se excluyeron de la lista los genes implicados en la edad y el tabaquismo. Posteriormente, se realizó el análisis de enriquecimiento con el programa Partek® Gateway y la WebGestalt. Los resultados de las pruebas de enriquecimiento arrojaron una sobrerrepresentación significativa para las categorías de procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC) y funciones moleculares (MF) (Tabla 5).

Entre los procesos biológicos podemos destacar la regulación negativa de la expresión génica (GO:0010629), Desarrollo del sistema nervioso central (GO:0007417) o Desarrollo cerebral (GO:0007420). Entre la categoría de función molecular podemos destacar entre otras funciones, la regulación negativa unión de nucleótidos de purina (GO:0017076), unión de ribonucleótidos (GO:0032553), unión de ARN (GO:0003723) y unión de ATP (GO:0005524), entre otras (Figura 14).

RESULTADOS

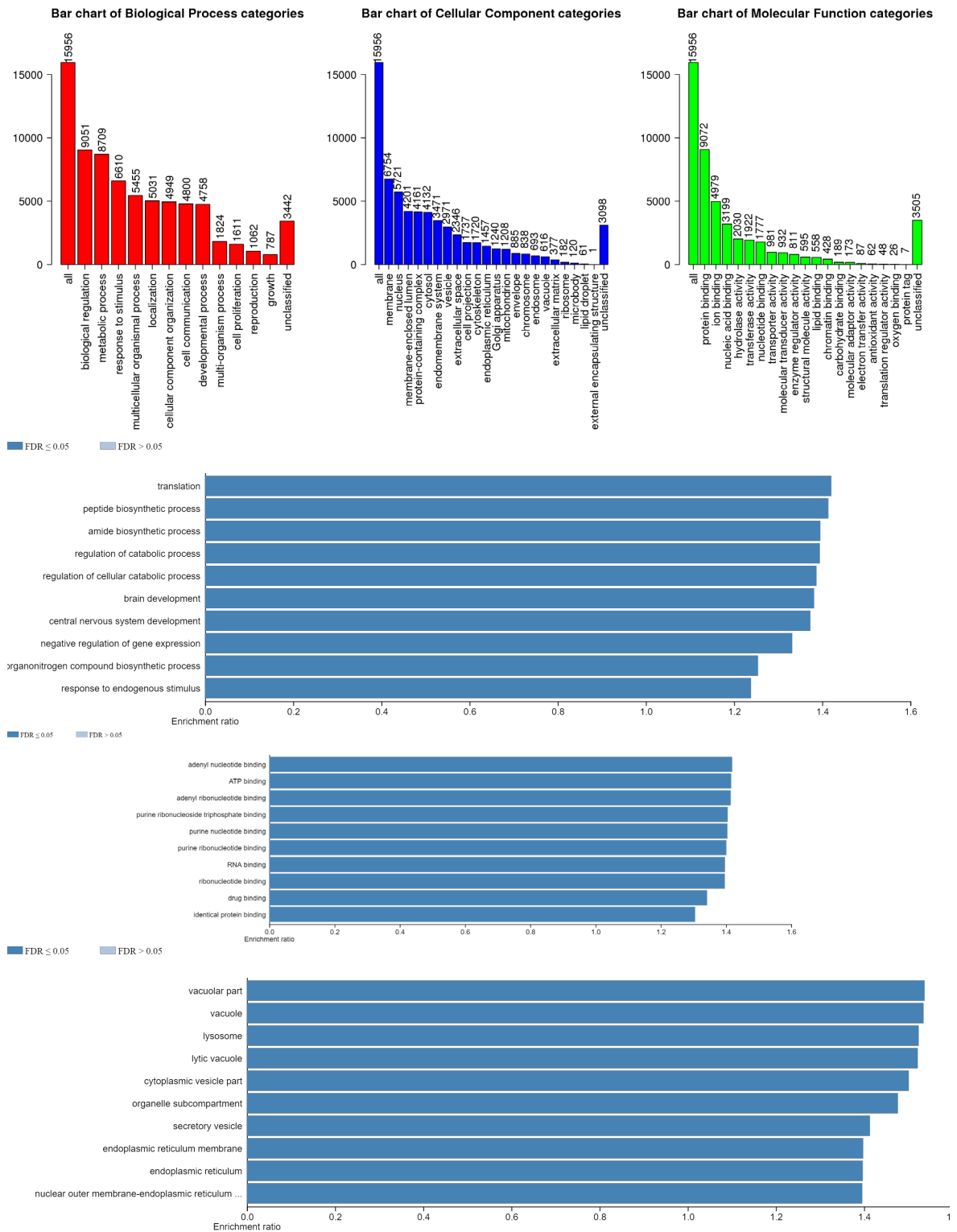


Fig 14.- Resultados del análisis de enriquecimiento para las categorías: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares, según la WebGestalt (<http://www.webgestalt.org/>) cuando se compararon las poblaciones cis y trans, antes del tratamiento GAHT, según la variable sexo natal asignado. Se representan las funciones con significación estadística $FDR \leq 0.05$.

Tabla 5. Resultados del análisis de enriquecimiento para las categorías: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares.

Set de Genes	Descripción	Tamaño	Expect	Ratio	P-valor	FDR
Categorías de Enriquecimiento: Proceso Biológico (BP)						
GO:1901566	Proceso biosintético del compuesto organonitrógeno	1776	752.54	12.544	0	0
GO:0010629	Regulación negativa de la expresión génica	1733	734.32	13.318	0	0
GO:0009719	Respuesta al estímulo endógeno	1595	675.85	12.384	0	0
GO:0007417	Desarrollo del sistema nervioso central	949	402.12	13.727	0	0
GO:0009894	Regulación del proceso catabólico	875	370.76	13.944	0	0
GO:0043604	Proceso biosintético de amida	766	324.58	13.957	0	0
GO:0031329	Regulación del proceso catabólico celular	764	323.73	13.870	0	0
GO:0007420	Desarrollo cerebral	714	302.54	13.816	0	0
GO:0043043	Proceso biosintético de péptidos	636	269.49	14.138	0	0
GO:0006412	Traducción	613	259.75	14.206	0	0

RESULTADOS

Categorías de enriquecimiento: Componente Celular (CC)

GO:0005783	Retículo endoplásmico	1861	620.62	1.397	0	0
GO:0031984	Subcompartimento de orgánulos	1661	553.92	14.768	0	0
GO:0044433	Parte de vesícula citoplasmática	1462	487.55	15.014	0	0
GO:0042175	Red de membrana de retículo endoplásmico de membrana externa nuclear	1072	357.5	13.958	0	0
GO:0005789	Membrana del retículo endoplásmico	1049	349.83	13.978	0	0
GO:0099503	Vesícula secretora	976	325.48	14.133	0	0
GO:0005773	Vacuola	760	253.45	15.348	0	0
GO:0000323	Vacuola lítica	670	223.43	15.217	0	0
GO:0005764	Lisosoma	669	223.1	1.524	0	0
GO:0044437	Parte vacuolar	552	184.08	15.373	0	0

Categorías de enriquecimiento: Función Molecular (MF)

GO:0017076	Unión de nucleótidos de purina	1865	750.79	14.039	0	0
GO:0032553	Unión de ribonucleótidos	1865	750.79	13.959	0	0

GO:0032555	Unión de ribonucleótidos de purina	1850	744.75	14.005	0	0
GO:0035639	Unión de trifosfato de ribonucleósido de purina	1786	718.99	14.048	0	0
GO:0008144	Unión a fármacos	1707	687.18	13.417	0	0
GO:0042802	Unión idéntica a proteínas	1696	682.75	13.050	0	0
GO:0003723	Unión de ARN	1603	645.32	13.962	0	0
GO:0030554	Unión de nucleótidos de adenil	1522	612.71	14.183	0	0
GO:0032559	Unión de ribonucleótido de adenil	1509	607.47	14.141	0	0
GO:0005524	Unión de ATP	1453	584.93	14.156	0	0

Estudio de metilación global CpG, antes vs después del GAHT

Se analizaron mediante microarray, como en el estudio anterior, dieciséis personas trans flamencas belgas (9 hombres trans y 7 mujeres trans) después de seis meses de tratamiento GAHT, y dieciséis personas cis flamencas belgas (8 hombres cis y 8 mujeres cis). El GAHT en hombres trans consistió en la administración intramuscular de undecanoato de testosterona (1 g una vez cada 12 semanas), mientras que las mujeres trans recibieron valerato de estradiol (2 x 2 mg / día), asociado con acetato de ciproterona (25 mg / día).

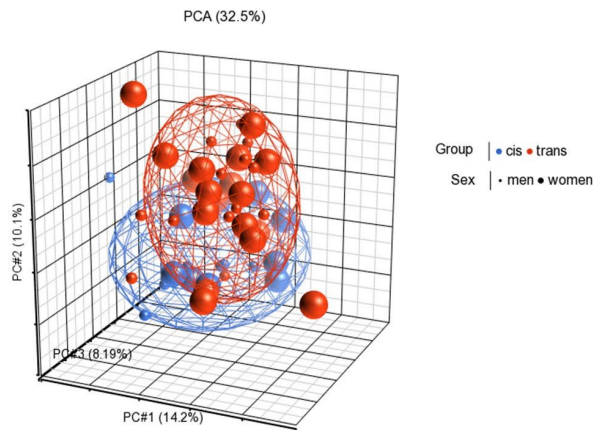
Como paso inicial se procedió a la normalización de las muestras, para ello se aplicaron la corrección de fondo NOOB y la corrección de colorante. Posteriormente se realizó un análisis de los componentes principales (PCA) para visualizar la agrupación de nuestros datos de metilación, así como procedimiento de control de calidad (Figura 15).

Para detectar la metilación diferencial en los CpGs, se realizó una prueba ANOVA de 3 vías comparando individuos cis género *vs* trans género según el grupo (cis *vs* trans), según la variable sexo natal asignado (hombre *vs* mujer) y según la variable tratamiento (antes *vs* después de 6 meses de GAHT). A continuación, se agregaron seis términos de interacción de contraste para encontrar los sitios de metilación CpG que cambiaron específicamente según los grupos, según se especifica a continuación:

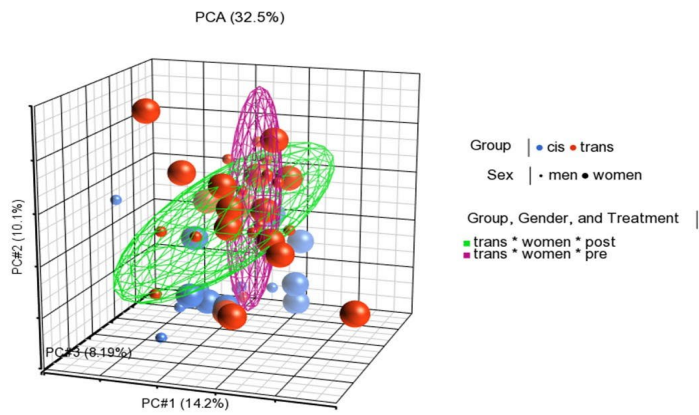
- Hombres trans (antes *vs* después del GAHT)
- Mujeres trans (antes *vs* después del GAHT)
- Poblaciones asignadas varones al nacer. Hombres cis *vs* mujeres trans (antes y después del GAHT)
- Poblaciones asignadas mujeres al nacer. Mujeres cis *vs* hombres trans (antes y después del GAHT)

Para cada contraste se generó un valor P , un valor diferencial β ($\Delta\beta$) y un valor diferencial M (ΔM). Los valores de P fueron calculados usando la corrección de la tasa de descubrimiento falso FDR $p < 0,05$; *fold change* $\geq \pm 2$). Al aplicar la prueba ANOVA de 3 vías (grupo*sexo*tratamiento) se encontró que 182.232 CpGs pasaron ambas correcciones estadísticas, y que el 26,85% eran islas CpGs distribuidas por todos los autosomas.

A



B



C

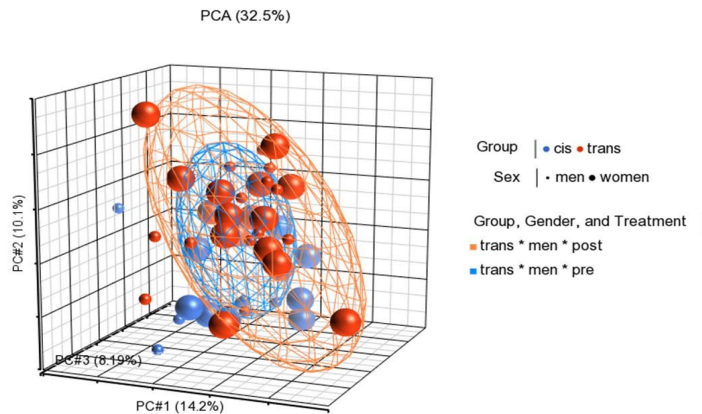


Fig 15 (A-B-C).- *Análisis de los componentes principales (PCA) en 3D que muestra los perfiles de metilación de las muestras. Cada muestra está representada por un punto, los ejes son los primeros tres PC, los porcentajes indican la fracción de varianza explicada por cada PC. El número en la parte superior es la variación explicada por los primeros tres PC. Las muestras están coloreadas según los niveles de la variable “grupo” (azul para cis y rojo para trans), y dimensionadas según los niveles de la variable sexo natal asignado (pequeño para hombres y grande para mujeres). (A) Las elipses representan los grupos según la variable grupo (azul para cis y rojo para trans). (B) Las elipses representan los grupos de mujeres trans antes y después del GAHT (morado para antes y verde para después del GAHT). (C) Las elipses representan los grupos de hombres trans antes y después del GAHT (azul para antes y verde para después del GAHT).*

Hombres trans: antes vs después del GAHT

Respecto a los hombres trans, cuando se comparó el grado de metilación global CpG, antes vs después del GAHT, se encontró que 200 CpGs pasaron la corrección estadística, de los cuales 95 eran islas CpG. De estas 95 islas CpGs, 26 (27,37%) estaban hipermetiladas y 69 (72,63%) estaban hipometiladas después de la GAHT. La tabla 6 enumera las 95 islas CpG que pasaron las pruebas estadísticas. Las islas CpG más significativas estaban relacionadas con los genes *SPATA4*, *PTTG1IP*, *TAF4*, *STXBP5*, *DMWD*, *HIFNT*, *PCDHGA4* y *LPHN1* (Tabla 6; Figura 15). En la figura 16 se muestra el clustering jerárquico con un mapa de calor basado en la lista de islas CpG significativas que pasaron la corrección estadística en los hombres trans, antes vs después del GAHT.

Mujeres trans: antes vs después del GAHT

Cuando se compararon las mujeres trans, antes vs después del GAHT, se encontraron 134 CpGs que pasaron la corrección estadística, de los cuales 78 eran islas CpG. Once (14,10%) se encontraban hipermetiladas y 67 (85,90%) estaban hipometiladas después del GAHT respecto a antes del tratamiento. En la tabla 7 se enumeran las 78 islas CpG que pasaron la corrección estadística en la población de mujeres trans. Los CpGs más significativos estaban relacionados con los genes *SPATA4*, *PTTG1IP*, *TAF4*, *STXBP5*, *DMWD*, *HIFNT*, *PCDHGA4* y *LPHN1*. Por otra parte, en la Figura 17 se muestra el clustering jerárquico con un mapa de calor basado en la lista de islas CpG que pasaron la corrección estadística en las mujeres trans, antes vs después de la GAHT. Así mismo, el análisis evidenció que 70 islas CpG que variaban el grado de metilación tras el GAHT eran compartidas por ambos grupos trans (Tabla 8; Figura 18).

RESULTADOS

Tabla 6. *Hombres trans antes vs después de GAHT. Lista de las 95 islas CpG que pasaron la corrección estadística.*

Probeset ID	Gen	p-valor trans men before vs after	Diferencia trans men before vs after	Diferencia descripción trans men before vs after
cg02833127	<i>SPATA4</i>	3,49E-51	-5,44455	trans men before down vs trans men after
cg13438128	<i>PTTG1IP</i>	3,89E-44	5,91933	trans men before vs trans men after
cg14080585	<i>TAF4</i>	5,91E-43	7,11421	trans men before vs trans men after
cg15866800	<i>STXBP5</i>	4,47E-42	5,05288	trans men before vs trans men after
cg19541688	<i>DMWD</i>	9,02E-39	7,12499	trans men before vs trans men after
cg07277190	<i>HIFNT</i>	1,64E-38	6,88402	trans men before vs trans men after
cg24954895	<i>PCDHGA4</i>	8,52E-37	5,51498	trans men before vs trans men after
cg10722938	<i>LPHN1</i>	1,13E-33	2,06499	trans men before vs trans men after
cg09428537	<i>AFG3L1</i>	5,08E-33	2,17132	trans men before vs trans men after
cg08186508	<i>PIGH</i>	1,36E-31	2,39562	trans men before vs trans men after
cg02487020	<i>RPAPI</i>	2,64E-31	2,07558	trans men before vs trans men after
cg16542283	<i>THAP6</i>	2,83E-31	2,06526	trans men before vs trans men after
cg03579738	<i>ZNF57</i>	3,47E-30	2,0483	trans men before vs trans men after
cg04821107	<i>MFAP3L</i>	2,73E-29	-3,83525	trans men before down vs trans men after
cg18054956	<i>KLHL11</i>	3,22E-29	5,04098	trans men before vs trans men after
cg23806550	<i>FIP1L1</i>	4,64E-29	2,44683	trans men before vs trans men after
cg23433828	<i>CRNDE</i>	5,24E-29	2,00041	trans men before vs trans men after
cg07360021	<i>MTHFD1L</i>	9,09E-29	2,17164	trans men before vs trans men after
cg04097963	---	6,71E-27	2,40514	trans men before vs trans men after
cg24017268	<i>ESPN</i>	1,36E-25	2,20808	trans men before vs trans men after
cg03190876	<i>NXNLI</i>	6,41E-25	4,52533	trans men before vs trans men after
cg27573735	---	9,93E-25	5,90343	trans men before vs trans men after

RESULTADOS

cg09706833	<i>COL18A1</i>	1,48E-23	4,62887	trans men before vs trans men after
cg25485991	<i>VAMP2</i>	1,70E-23	3,24106	trans men before vs trans men after
cg20596493	---	1,78E-23	2,05818	trans men before vs trans men after
cg22697574	<i>C1orf94</i>	2,37E-23	2,88459	trans men before vs trans men after
cg02294730	<i>SPINT1</i>	5,60E-23	2,56142	trans men before vs trans men after
cg25808577	<i>PACSIN1</i>	6,37E-23	3,16645	trans men before vs trans men after
cg23763259	<i>CHDIL</i>	9,55E-23	-3,67928	trans men before down vs trans men after
cg19529823	<i>HPCAL1</i>	6,32E-22	4,73909	trans men before vs trans men after
cg14859324	<i>GABRB3</i>	1,67E-20	6,06448	trans men before vs trans men after
cg24891709	<i>ZC3HAV1</i>	6,32E-20	2,54468	trans men before vs trans men after
cg23327483	<i>CHCHD10</i>	8,15E-20	2,85318	trans men before vs trans men after
cg03834947	<i>MTFMT</i>	2,95E-19	2,95047	trans men before vs trans men after
cg00610228	<i>FKBP5</i>	6,57E-19	-2,0921	trans men before down vs trans men after
cg27443867	<i>RASGEF1A</i>	1,52E-18	3,24401	trans men before vs trans men after
cg21898346	<i>SLC25A40</i>	6,05E-18	2,69111	trans men before vs trans men after
cg11582634	<i>KCNT1</i>	2,48E-17	5,91745	trans men before vs trans men after
cg01504215	<i>MLPH</i>	3,27E-17	4,65662	trans men before vs trans men after
cg04883656	<i>OGFRL1</i>	5,17E-17	2,36649	trans men before vs trans men after
cg11849422	<i>PALM2</i>	6,58E-17	2,94454	trans men before vs trans men after
cg00591160	<i>ING4</i>	1,03E-16	-2,34562	trans men before down vs trans men after
cg11232793	<i>PIK3R2</i>	2,94E-16	2,38164	trans men before vs trans men after
cg01483824	<i>GRIN2D</i>	3,40E-16	7,11984	trans men before vs trans men after
cg01878345	<i>POU3F3</i>	3,57E-16	3,34124	trans men before vs trans men after
cg26542283	<i>C5orf39</i>	4,84E-16	-2,44244	trans men before down vs trans men after
cg02613380	<i>UBTD1</i>	2,11E-15	6,48019	trans men before vs trans men after
cg25399512	<i>ESPN</i>	2,13E-15	3,48597	trans men before vs trans men after
cg22967516	<i>IREB2</i>	6,22E-15	2,09247	trans men before vs trans men after

cg16525692	<i>CHD1L</i>	8,28E-15	-2,43721	trans men before down vs trans men after
cg24853765	<i>WDR47</i>	9,92E-15	3,07121	trans men before vs trans men after
cg01392253	<i>MPP5</i>	2,17E-14	3,51059	trans men before vs trans men after
cg19774733	<i>GRHPR</i>	3,95E-14	2,94279	trans men before vs trans men after
cg00699993	<i>GRIA2</i>	4,65E-14	2,2012	trans men before vs trans men after
cg18035158	<i>SOBP</i>	5,82E-14	3,17242	trans men before vs trans men after
cg12603476	<i>TSPAN14</i>	9,04E-14	2,27439	trans men before vs trans men after
cg14903832	<i>COQ10B</i>	1,31E-13	2,85702	trans men before vs trans men after
cg11843188	<i>TMEM123</i>	1,39E-13	3,49407	trans men before vs trans men after
cg23616649	<i>ARF3</i>	1,47E-13	2,6603	trans men before vs trans men after
cg04971418	<i>C5orf36</i>	4,41E-13	-2,32879	trans men before down vs trans men after
cg26133769	<i>PCDH7</i>	6,57E-13	3,95665	trans men before vs trans men after
cg21200656	<i>NKX2-4</i>	8,80E-13	3,16623	trans men before vs trans men after
cg03666441	<i>KCTD11</i>	1,07E-12	3,73145	trans men before vs trans men after
cg21223075	<i>BHLHE40</i>	1,01E-11	-4,55673	trans men before down vs trans men after
cg12443753	---	1,74E-11	-2,57753	trans men before down vs trans men after
cg11178574	<i>RASSF7</i>	3,37E-11	2,12426	trans men before vs trans men after
cg19919881	<i>PWWP2B</i>	6,71E-11	5,45974	trans men before vs trans men after
cg24396745	<i>HCN4</i>	4,99E-10	3,08925	trans men before vs trans men after
cg26862691	<i>CDK10</i>	5,50E-10	2,1619	trans men before vs trans men after
cg12524748	<i>SLBP</i>	1,01E-09	2,66695	trans men before vs trans men after
cg22078869	<i>PCBD2</i>	1,69E-08	-2,24313	trans men before down vs trans men after
cg00160667	<i>PTPRU</i>	2,61E-08	-7,5133	trans men before down vs trans men after
cg01861096	<i>CLTCL1</i>	2,89E-08	2,87981	trans men before vs trans men after
cg03885684	<i>EPB41L5</i>	1,05E-07	-4,6599	trans men before down vs trans men after
cg27091900	<i>ESPN</i>	1,17E-07	-2,00141	trans men before down vs trans men after
cg00898988	<i>ZFHX2</i>	1,89E-07	-2,18928	trans men before down vs trans men after

RESULTADOS

cg08687137	<i>B3GAT3</i>	3,92E-07	3,53271	trans men before vs trans men after
cg24418853	<i>PTPLA</i>	6,82E-07	-4,66213	trans men before down vs trans men after
cg00088299	---	7,23E-07	-4,19521	trans men before down vs trans men after
cg08689926	---	7,98E-07	-7,34316	trans men before down vs trans men after
cg13464717	<i>OAZ1</i>	1,33E-06	2,54534	trans men before vs trans men after
cg27158490	<i>NEK1</i>	1,36E-06	-3,55468	trans men before down vs trans men after
cg00685135	<i>GLIPR2</i>	1,65E-06	-4,08842	trans men before down vs trans men after
cg22984571	---	2,04E-06	2,29195	trans men before vs trans men after
cg13777502	<i>KPNA2</i>	2,76E-06	3,18358	trans men before vs trans men after
cg16786756	---	3,28E-06	2,64424	trans men before vs trans men after
cg03689146	---	1,70E-05	-6,93832	trans men before down vs trans men after
cg04632255	<i>LOC101927322</i>	1,93E-05	-3,05371	trans men before down vs trans men after
cg09698465	---	2,04E-05	-6,89877	trans men before down vs trans men after
cg06892548	<i>TTBK1</i>	0,000124327	-2,28834	trans men before down vs trans men after
cg06638795	<i>KCNG3</i>	0,000188416	3,29784	trans men before vs trans men after
cg00445548	<i>NFATC1</i>	0,000270591	3,48522	trans men before vs trans men after
cg18710053	<i>FLJ44606</i>	0,000467305	2,79391	trans men before vs trans men after
cg04802271	---	0,000962293	-3,90983	trans men before down vs trans men after
cg00716604	<i>TBC1D15</i>	0,00166204	-2,17185	trans men before down vs trans men after

(---) Algunos sitios CpG no se encuentran localizados en genes, lo que significa que o bien estos CpG se encuentran en áreas intragénicas o bien se desconoce su ubicación.

DISCUSIÓN

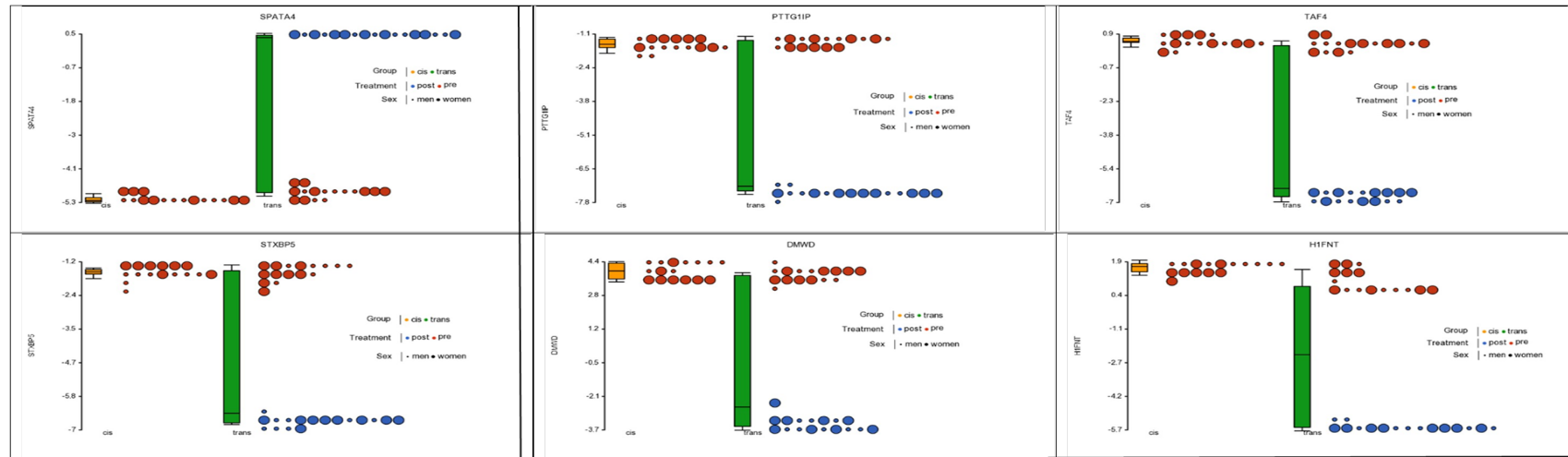


Fig 15. Gráfico de puntos que muestra los valores M para los seis genes más significativos (*SPATA4*, *PTTG1IP*, *TAF4*, *STXBP5*, *DMWD*, *H1FNT*) compartidos por ambas poblaciones trans que pasaron la corrección estadística y se ubicaron en islas. Cada muestra está representada por un punto, que corresponde al grado general de metilación (valores M). Las casillas están coloreadas según los niveles de la variable “grupo” (naranja para cis y verde para trans), las muestras están coloreadas según la variable “tratamiento” (rojo para antes y azul para después del GAHT) y dimensionadas según la variable “sexo natal asignado” (grande para mujeres y pequeño para hombres). La línea media es la mediana, el cuadro representa el cuartil superior e inferior, mientras que los bigotes corresponden a los percentiles 90 y 10 de los datos.

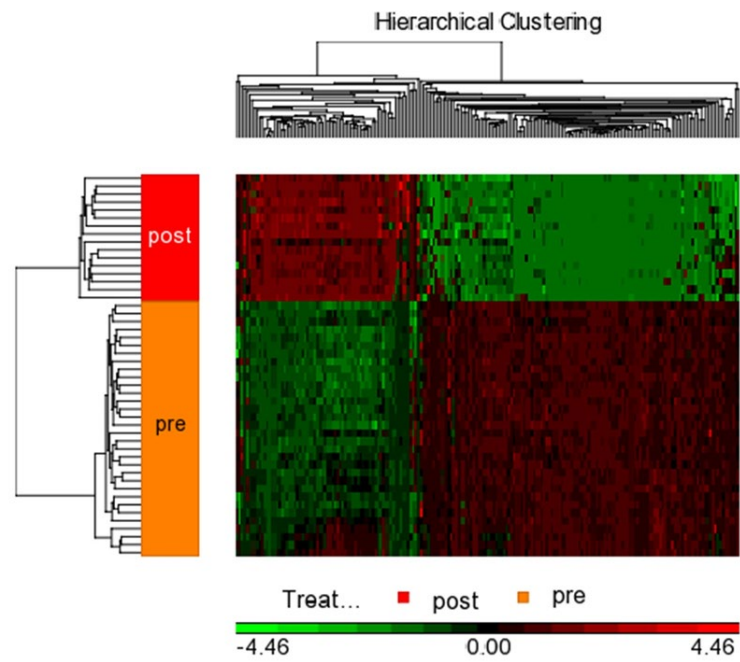


Fig 16. Agrupación jerárquica con un mapa de calor invocado en la lista de islas CpG significativas en la población de hombres trans. Los grupos experimentales son filas, mientras que los CpG de las poblaciones cis vs trans son columnas. Los CpG con mayor metilación son de color rojo, los CpG con menor metilación son de color verde. Las muestras pretratamiento son de color naranja y las muestras post son de color rojo en el dendrograma del lado izquierdo.

Tabla 7. *Mujeres trans antes vs después de GAHT. Las 78 islas CpG que pasaron la corrección estadística.*

Probeset ID	Gen	p-value trans women before vs after	Diferencias trans women before vs after	Diferencia Descripción trans women before vs after
cg02833127	<i>SPATA4</i>	4,28E-49	-5,50242	trans women before down vs trans women after
cg13438128	<i>PTTG1IP</i>	3,83E-42	6,01023	trans women before up vs trans women after
cg14080585	<i>TAF4</i>	1,05E-40	7,12088	trans women before up vs trans women after
cg15866800	<i>STXBP5</i>	8,63E-41	5,33467	trans women before up vs trans women after
cg19541688	<i>DMWD</i>	6,74E-37	7,27639	trans women before up vs trans women after
cg07277190	<i>HIFNT</i>	5,46E-35	6,40876	trans women before up vs trans women after
cg24954895	<i>PCDHGA4</i>	1,12E-35	5,87357	trans women before up vs trans women after
cg10722938	<i>LPHN1</i>	5,25E-32	2,1306	trans women before up vs trans women after
cg09428537	<i>AFG3L1</i>	1,58E-31	2,26192	trans women before up vs trans women after
cg08186508	<i>PIGH</i>	1,42E-30	2,5628	trans women before up vs trans women after
cg16542283	<i>THAP6</i>	4,63E-30	2,18496	trans women before up vs trans women after
cg02487020	<i>RPAP1</i>	6,20E-29	2,05466	trans women before up vs trans women after
cg07360021	<i>MTHFD1L</i>	1,28E-26	2,17351	trans women before up vs trans women after
cg04821107	<i>MFAP3L</i>	1,46E-27	-3,93492	trans women before down vs trans women after

RESULTADOS

cg23433828	<i>CRNDE</i>	5,80E-27	2,01469	trans women before up vs trans women after
cg23806550	<i>FIP1L1</i>	1,08E-24	2,14941	trans women before up vs trans women after
cg18054956	<i>KLHL11</i>	1,11E-27	5,2294	trans women before up vs trans women after
cg04097963	---	1,44E-25	2,52205	trans women before up vs trans women after
cg24017268	<i>ESPN</i>	9,30E-23	2,1133	trans women before up vs trans women after
cg03190876	<i>NXNL1</i>	2,32E-22	4,39999	trans women before up vs trans women after
cg27573735	---	1,73E-22	5,85062	trans women before up vs trans women after
cg09706833	<i>COL18A1</i>	1,42E-23	5,25414	trans women before up vs trans women after
cg25485991	<i>VAMP2</i>	1,22E-23	3,70733	trans women before up vs trans women after
cg02294730	<i>SPINT1</i>	4,63E-23	2,91887	trans women before up vs trans women after
cg25808577	<i>PACSINI</i>	8,93E-23	3,55866	trans women before up vs trans women after
cg22697574	<i>Clorf94</i>	1,70E-20	2,74555	trans women before up vs trans women after
cg23763259	<i>CHD1L</i>	8,91E-18	-3,05183	trans women before down vs trans women after
cg19529823	<i>HPCAL1</i>	1,54E-19	4,6306	trans women before up vs trans women after
cg14859324	<i>GABRB3</i>	7,10E-19	6,20226	trans women before up vs trans women after
cg23327483	<i>CHCHD10</i>	1,93E-18	2,96285	trans women before up vs trans women after
cg24891709	<i>ZC3HAV1</i>	5,30E-19	2,72071	trans women before up vs trans women after
cg03834947	<i>MTFMT</i>	1,09E-17	3,02221	trans women before up vs trans women after
cg21898346	<i>SLC25A40</i>	9,16E-17	2,82153	trans women before up vs trans women after

cg01504215	<i>MLPH</i>	5,52E-17	5,20047	trans women before up vs trans women after
cg27443867	<i>RASGEF1A</i>	1,36E-14	2,81371	trans women before up vs trans women after
cg04883656	<i>OGFRL1</i>	5,39E-15	2,33609	trans women before up vs trans women after
cg11849422	<i>PALM2</i>	9,67E-16	3,08379	trans women before up vs trans women after
cg11582634	<i>KCNT1</i>	4,30E-13	4,97642	trans women before up vs trans women after
cg01878345	<i>POU3F3</i>	1,74E-15	3,6131	trans women before up vs trans women after
cg11232793	<i>PIK3R2</i>	8,93E-14	2,26545	trans women before up vs trans women after
cg01392253	<i>MPP5</i>	4,65E-15	4,17535	trans women before up vs trans women after
cg01483824	<i>GRIN2D</i>	3,25E-12	6,04005	trans women before up vs trans women after
cg12603476	<i>TSPAN14</i>	6,80E-15	2,7971	trans women before up vs trans women after
cg02613380	<i>UBTD1</i>	2,51E-12	5,8583	trans women before up vs trans women after
cg00699993	<i>GRIA2</i>	3,93E-12	2,15653	trans women before up vs trans women after
cg25399512	<i>ESPN</i>	2,87E-13	3,38856	trans women before up vs trans women after
cg11843188	<i>TMEM123</i>	8,38E-15	4,32895	trans women before up vs trans women after
cg18035158	<i>SOBP</i>	1,20E-12	3,25882	trans women before up vs trans women after
cg24853765	<i>WDR47</i>	2,41E-10	2,47163	trans women before up vs trans women after
cg19774733	<i>GRHPR</i>	3,57E-12	2,87781	trans women before up vs trans women after
cg21223075	<i>BHLHE40</i>	1,14E-12	-5,56799	trans women before down vs trans women after

RESULTADOS

cg19919881	<i>PWWP2B</i>	3,96E-12	6,84395	trans women before up vs trans women after
cg21200656	<i>NKX2-4</i>	1,39E-10	3,00442	trans women before up vs trans women after
cg23616649	<i>ARF3</i>	6,94E-09	2,03856	trans women before up vs trans women after
cg11178574	<i>RASSF7</i>	3,18E-12	2,61662	trans women before up vs trans women after
cg26133769	<i>PCDH7</i>	7,57E-09	3,17261	trans women before up vs trans women after
cg03666441	<i>KCTD11</i>	3,56E-06	2,25375	trans women before up vs trans women after
cg00160667	<i>PTPRU</i>	7,14E-11	-10,7979	trans women before down vs trans women after
cg08687137	<i>B3GAT3</i>	1,42E-09	5,14474	trans women before up vs trans women after
cg24396745	<i>HCN4</i>	3,59E-07	2,62882	trans women before up vs trans women after
cg01861096	<i>CLTCL1</i>	8,93E-07	2,76727	trans women before up vs trans women after
cg12524748	<i>SLBP</i>	1,59E-06	2,15845	trans women before up vs trans women after
cg00445548	<i>NFATC1</i>	7,95E-10	7,8427	trans women before up vs trans women after
cg26506013	<i>SEC24A</i>	1,46E-07	2,5579	trans women before up vs trans women after
cg06211794	<i>B4GALT5</i>	6,28E-10	2,60319	trans women before up vs trans women after
cg03885684	<i>EPB41L5</i>	2,78E-06	-4,46566	trans women before down vs trans women after
cg10064886	<i>FLJ31306</i>	1,44E-08	2,00403	trans women before up vs trans women after
cg14078059	---	3,16E-07	2,01606	trans women before up vs trans women after
cg26459700	<i>CAMK1D</i>	1,84E-06	-2,1225	trans women before down vs trans women after
cg00088299	---	0,000295724	-3,22656	trans women before down vs trans women after

cg16786756	---	8,81E-05	2,42705	trans women before up vs trans women after
cg24418853	<i>PTPLA</i>	1,11E-05	-4,51809	trans women before down vs trans women after
cg18710053	<i>FLJ44606</i>	2,50E-05	3,95315	trans women before up vs trans women after
cg27544288	<i>NHEDC1</i>	8,71E-05	2,18738	trans women before up vs trans women after
cg09698465	---	7,39E-06	-8,33393	trans women before down vs trans women after
cg06642177	<i>SGK1</i>	7,31E-06	2,08163	trans women before up vs trans women after
cg06638795	<i>KCNG3</i>	0,00015083	3,80522	trans women before up vs trans women after
cg19769164	<i>TMCO1</i>	0,000104322	-3,76069	trans women before down vs trans women after

(---) Algunos sitios CpG no se encuentran localizados en genes, lo que significa que o bien estos CpG se encuentran en áreas intragénicas o bien se desconoce su ubicación.

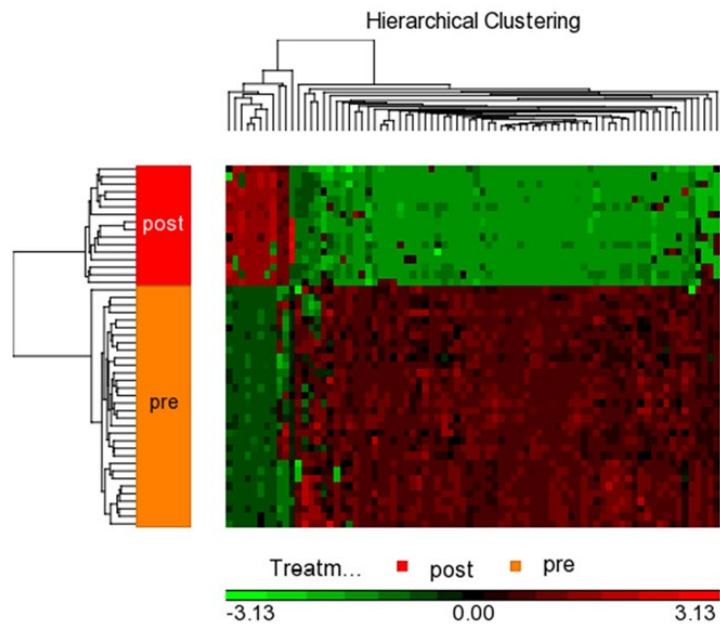


Fig 17.- Agrupación jerárquica con un mapa de calor invocado en la lista de islas CpG significativas en la población de mujeres trans. Los grupos experimentales son filas, mientras que los CpG de las poblaciones cis vs trans son columnas. Los CpG con mayor metilación son de color rojo, los CpG con menor metilación son de color verde. Las muestras pretratamiento son de color naranja y las muestras post son de color rojo en el dendrograma del lado izquierdo.

Tabla 8. Lista de 70 islas CpG compartidas por hombres y mujeres trans, que pasaron la corrección estadística

Probeset ID	Gen	p-valor (3-way ANOVA)	p-valor (trans women before vs after)	p-valor (trans men before vs after)
cg02833127	<i>SPATA4</i>	1,16E-56	4,28E-49	3,49E-51
cg13438128	<i>PTTG1IP</i>	4,31E-49	3,83E-42	3,89E-44
cg14080585	<i>TAF4</i>	3,44E-48	1,05E-40	5,91E-43
cg15866800	<i>STXBP5</i>	1,70E-47	8,63E-41	4,47E-42
cg19541688	<i>DMWD</i>	3,05E-44	6,74E-37	9,02E-39
cg07277190	<i>HIFNT</i>	9,28E-44	5,46E-35	1,64E-38
cg24954895	<i>PCDHGA4</i>	9,64E-42	1,12E-35	8,52E-37
cg10722938	<i>LPHN1</i>	8,74E-39	5,25E-32	1,13E-33
cg09428537	<i>AFG3L1</i>	2,28E-38	1,58E-31	5,08E-33
cg08186508	<i>PIGH</i>	3,18E-36	1,42E-30	1,36E-31
cg16542283	<i>THAP6</i>	5,50E-36	4,63E-30	2,83E-31
cg02487020	<i>RPAP1</i>	7,31E-36	6,20E-29	2,64E-31
cg07360021	<i>MTHFD1L</i>	9,57E-35	1,28E-26	9,09E-29
cg04821107	<i>MFAP3L</i>	1,14E-34	1,46E-27	2,73E-29
cg23433828	<i>CRNDE</i>	2,05E-34	5,80E-27	5,24E-29
cg23806550	<i>FIP1L1</i>	4,62E-34	1,08E-24	4,64E-29
cg18054956	<i>KLHL11</i>	1,20E-33	1,11E-27	3,22E-29

RESULTADOS

cg04097963	---	7,12E-32	1,44E-25	6,71E-27
cg24017268	<i>ESPN</i>	1,13E-31	9,30E-23	1,36E-25
cg03190876	<i>NXNL1</i>	1,12E-30	2,32E-22	6,41E-25
cg27573735	---	1,53E-30	1,73E-22	9,93E-25
cg09706833	<i>COL18A1</i>	1,66E-29	1,42E-23	1,48E-23
cg25485991	<i>VAMP2</i>	7,10E-28	1,22E-23	1,70E-23
cg02294730	<i>SPINT1</i>	8,62E-28	4,63E-23	5,60E-23
cg25808577	<i>PACSINI</i>	3,39E-27	8,93E-23	6,37E-23
cg22697574	<i>C1orf94</i>	1,71E-26	1,70E-20	2,37E-23
cg23763259	<i>CHD1L</i>	3,01E-26	8,91E-18	9,55E-23
cg19529823	<i>HPCAL1</i>	3,32E-25	1,54E-19	6,32E-22
cg14859324	<i>GABRB3</i>	7,16E-25	7,10E-19	1,67E-20
cg23327483	<i>CHCHD10</i>	1,56E-24	1,93E-18	8,15E-20
cg24891709	<i>ZC3HAV1</i>	4,78E-24	5,30E-19	6,32E-20
cg03834947	<i>MTFMT</i>	4,19E-23	1,09E-17	2,95E-19
cg21898346	<i>SLC25A40</i>	2,57E-22	9,16E-17	6,05E-18
cg01504215	<i>MLPH</i>	3,56E-22	5,52E-17	3,27E-17
cg27443867	<i>RASGEF1A</i>	9,90E-22	1,36E-14	1,52E-18
cg04883656	<i>OGFRL1</i>	1,03E-21	5,39E-15	5,17E-17
cg11849422	<i>PALM2</i>	7,61E-21	9,67E-16	6,58E-17
cg11582634	<i>KCNT1</i>	8,60E-21	4,30E-13	2,48E-17
cg01878345	<i>POU3F3</i>	5,37E-20	1,74E-15	3,57E-16

cg11232793	<i>PIK3R2</i>	5,52E-20	8,93E-14	2,94E-16
cg01392253	<i>MPP5</i>	8,56E-20	4,65E-15	2,17E-14
cg01483824	<i>GRIN2D</i>	1,31E-19	3,25E-12	3,40E-16
cg12603476	<i>TSPAN14</i>	3,71E-19	6,80E-15	9,04E-14
cg02613380	<i>UBTD1</i>	1,40E-18	2,51E-12	2,11E-15
cg00699993	<i>GRIA2</i>	3,30E-18	3,93E-12	4,65E-14
cg25399512	<i>ESPN</i>	3,98E-18	2,87E-13	2,13E-15
cg11843188	<i>TMEM123</i>	4,82E-18	8,38E-15	1,39E-13
cg18035158	<i>SOBP</i>	8,90E-18	1,20E-12	5,82E-14
cg24853765	<i>WDR47</i>	2,02E-17	2,41E-10	9,92E-15
cg19774733	<i>GRHPR</i>	3,39E-17	3,57E-12	3,95E-14
cg21223075	<i>BHLHE40</i>	2,36E-16	1,14E-12	1,01E-11
cg19919881	<i>PWWP2B</i>	4,62E-16	3,96E-12	6,71E-11
cg21200656	<i>NKX2-4</i>	1,38E-15	1,39E-10	8,80E-13
cg23616649	<i>ARF3</i>	1,61E-15	6,94E-09	1,47E-13
cg11178574	<i>RASSF7</i>	2,71E-15	3,18E-12	3,37E-11
cg26133769	<i>PCDH7</i>	3,34E-15	7,57E-09	6,57E-13
cg03666441	<i>KCTD11</i>	5,08E-15	3,56E-06	1,07E-12
cg00160667	<i>PTPRU</i>	2,51E-13	7,14E-11	2,61E-08
cg08687137	<i>B3GAT3</i>	5,56E-13	1,42E-09	3,92E-07
cg24396745	<i>HCN4</i>	5,25E-12	3,59E-07	4,99E-10
cg01861096	<i>CLTCL1</i>	1,64E-11	8,93E-07	2,89E-08

RESULTADOS

cg12524748	<i>SLBP</i>	8,98E-11	1,59E-06	1,01E-09
cg00445548	<i>NFATC1</i>	1,52E-10	7,95E-10	0,000270591
cg03885684	<i>EPB41L5</i>	1,14E-09	2,78E-06	1,05E-07
cg00088299	---	6,69E-08	0,000295724	7,23E-07
cg16786756	---	7,39E-08	8,81E-05	3,28E-06
cg24418853	<i>PTPLA</i>	2,02E-07	1,11E-05	6,82E-07
cg18710053	<i>FLJ44606</i>	2,96E-07	2,50E-05	0,000467305
cg09698465	---	1,09E-06	7,39E-06	2,04E-05
cg06638795	<i>KCNG3</i>	3,05E-06	0,00015083	0,000188416

(---) Algunos sitios CpG no se encuentran localizados en genes, lo que significa que o bien estos CpG se encuentran en áreas intragénicas o bien se desconoce su ubicación.

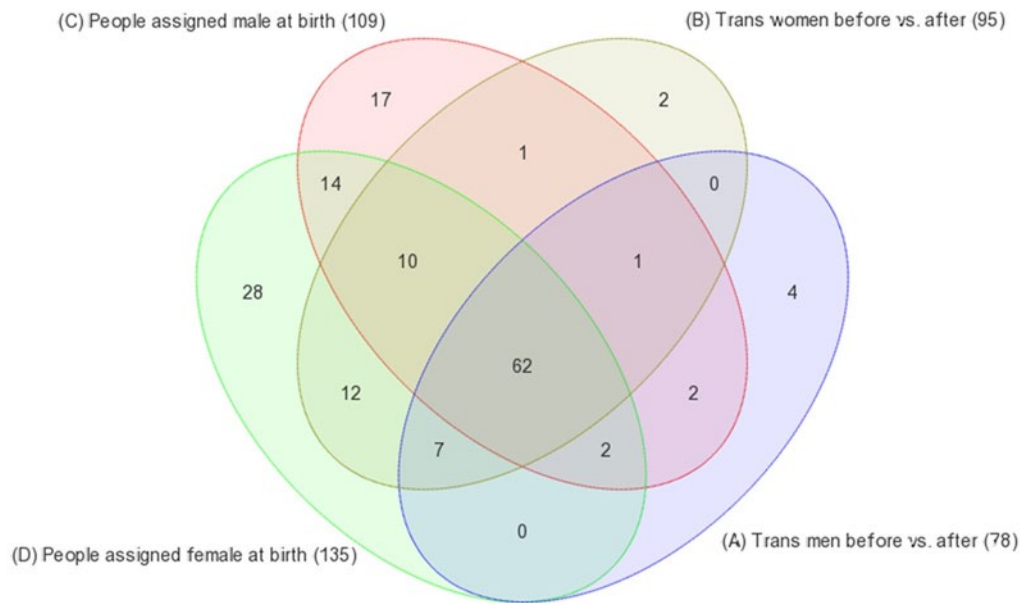


Fig 18. Diagrama de Venn de las islas CpG metiladas diferencialmente que pasaron la corrección estadística después del GAHT. (A) corresponde a las 78 islas CpG en la población de hombres trans cuando comparamos antes vs después del GAHT. (B) corresponde a las 95 islas CpG en la población de mujeres trans (antes vs después del GAHT). (C) corresponde a las 109 islas CpG que pasaron la corrección estadística cuando comparamos las poblaciones asignadas a los varones. (D): corresponde a las 135 islas CpG que pasaron la corrección estadística cuando comparamos las poblaciones asignadas mujeres. El diagrama de Venn muestra que 70 CpG fueron compartidos por las poblaciones de hombres trans y mujeres trans.

Hombres cis vs mujeres trans (antes y después de GAHT)

Respecto a la población de varones, antes de iniciar el GAHT se encontraron 89 CpGs que pasaron la corrección estadística, de los cuales 20 eran islas CpG. Trece (65%) estaban hipermetiladas y 7 (35%) estaban hipometiladas en la población trans respecto a la población cis. La Tabla 9 enumera las 20 islas CpG que pasaron la corrección estadística antes del GAHT. Los CpGs más significativos estaban relacionados con los genes *WDR45B*, *SLC6A20*, *NHLH1*, *UBALD1* y *PLEKHA5*.

RESULTADOS

Tabla 9. *Hombres cis vs mujeres trans, antes del GAHT. Lista de 20 islas CpG que pasaron la corrección estadística.*

Probeset ID	Gen	p-valor (cis men vs trans women)	Diferencias (cis men vs trans women)	Diferencia descripción (cis men vs trans women)
cg10401531	<i>WDR45B</i>	1,20E-08	-2,20167	cis men down vs trans women
cg09700085	<i>SLC6A20</i>	4,56E-07	-2,00023	cis men down vs trans women
cg21538190	<i>NHLHI</i>	7,53E-07	-2,47591	cis men down vs trans women
cg25764197	<i>UBALDI</i>	1,03E-06	2,6023	cis men up vs trans women
cg24441383	<i>PLEKHA5</i>	1,75E-06	2,03159	cis men up vs trans women
cg16240751	---	2,72E-05	-2,05596	cis men down vs trans women
cg26358144	<i>ARL6IP1</i>	3,08E-05	-2,10562	cis men down vs trans women
cg02090742	<i>C17orf79</i>	0,000108124	-5,81018	cis men down vs trans women
cg04208499	<i>NCOA6</i>	0,00011158	-5,96574	cis men down vs trans women
cg12993026	<i>SLC37A1</i>	0,000144913	2,19509	cis men up vs trans women
cg09698465	---	0,000219052	6,38536	cis men up vs trans women
cg14623093	<i>GORASP1</i>	0,000316461	2,37051	cis men up vs trans women
cg24418853	<i>PTPLA</i>	0,000530547	3,29113	cis men up vs trans women
cg12688781	<i>AACS</i>	0,000556248	-2,22118	cis men down vs trans women
cg04632255	<i>LOC101927322</i>	0,000710874	-2,54381	cis men down vs trans women
cg09016212	<i>GRASP</i>	0,00155722	2,40079	cis men up vs trans women
cg11738485	<i>HOOK2</i>	0,0019266	-4,62858	cis men down vs trans women
cg04657146	<i>HOOK2</i>	0,00219716	-3,6818	cis men down vs trans women
cg01655658	<i>HLA-L</i>	0,00362281	-2,56482	cis men down vs trans women
cg05528899	---	0,00455512	-3,36645	cis men down vs trans women

(---) Algunos sitios CpG no se encuentran localizados en genes, lo que significa que o bien estos CpG se encuentran en áreas intragénicas o bien se desconoce su ubicación.

Tras seis meses de GAHT, se hallaron 239 CpGs que pasaron la corrección estadística, de los cuales 109 eran islas CpG. De ellos, 32 (29,36%) estaban hipermetilados y 77 (70,64%) estaban hipometilados en la población trans. La Tabla 10 enumera las 109 islas CpG que pasaron la corrección estadística tras el GAHT. Los CpGs más significativos estaban

relacionados con los genes *SPATA4*, *PTTG1IP*, *TAF4*, *STXBP5*, *DMWD*, *HIFNT*, *PCDHGA4* y *AFG3L1*.

Tabla 10. Hombres cis vs mujeres trans después del GAHT. Lista de 109 islas CpG que pasaron la corrección estadística.

Probeset ID	Gen	p-valor (cis men vs trans women)	Diferencia (cis men vs trans women)	Diferencia descripción (cis men vs trans women)
cg02833127	<i>SPATA4</i>	1,67E-50	-5,75785	cis men down vs trans women
cg14080585	<i>TAF4</i>	6,68E-42	7,36757	cis men up vs trans women
cg13438128	<i>PTTG1IP</i>	1,34E-41	5,64623	cis men up vs trans women
cg15866800	<i>STXBP5</i>	2,64E-40	5,0277	cis men up vs trans women
cg19541688	<i>DMWD</i>	8,55E-39	7,83264	cis men up vs trans women
cg07277190	<i>HIFNT</i>	4,91E-38	7,36023	cis men up vs trans women
cg24954895	<i>PCDHGA4</i>	2,68E-34	5,26221	cis men up vs trans women
cg09428537	<i>AFG3L1</i>	1,02E-31	2,21407	cis men up vs trans women
cg17877674	<i>PCOLCE2</i>	7,05E-31	2,05957	cis men up vs trans women
cg04821107	<i>MFAP3L</i>	1,03E-28	-4,07254	cis men down vs trans women
cg23433828	<i>CRNDE</i>	3,68E-28	2,09136	cis men up vs trans women
cg07360021	<i>MTHFDIL</i>	5,26E-28	2,28133	cis men up vs trans women
cg23806550	<i>FIP1L1</i>	6,02E-28	2,519	cis men up vs trans women
cg08186508	<i>PIGH</i>	3,82E-27	2,03606	cis men up vs trans women
cg18054956	<i>KLHL11</i>	3,48E-26	4,64005	cis men up vs trans women
cg03190876	<i>NXNL1</i>	7,00E-26	5,25876	cis men up vs trans women
cg27573735	---	7,52E-26	6,92535	cis men up vs trans women
cg04097963	---	8,17E-25	2,33547	cis men up vs trans women
cg24017268	<i>ESPN</i>	1,04E-24	2,30075	cis men up vs trans women
cg09706833	<i>COL18A1</i>	2,18E-24	5,34152	cis men up vs trans women
cg12842219	<i>ARL4D</i>	1,56E-23	2,00609	cis men up vs trans women
cg20596493	---	1,24E-22	2,14732	cis men up vs trans women
cg00366352	<i>NTN4</i>	2,45E-20	2,01087	cis men up vs trans women
cg23763259	<i>CHDIL</i>	1,97E-19	-3,28853	cis men down vs trans women
cg02294730	<i>SPINT1</i>	2,06E-19	2,25484	cis men up vs trans women
cg25485991	<i>VAMP2</i>	2,50E-19	2,75053	cis men up vs trans women
cg03136859	<i>RBSN</i>	3,20E-19	2,05654	cis men up vs trans women

RESULTADOS

cg14859324	<i>GABRB3</i>	8,71E-19	5,97105	cis men up vs trans women
cg23327483	<i>CHCHD10</i>	2,75E-18	2,84025	cis men up vs trans women
cg25808577	<i>PACSINI</i>	3,10E-18	2,59266	cis men up vs trans women
cg22697574	<i>C1orf94</i>	3,38E-18	2,29584	cis men up vs trans women
cg19529823	<i>HPCALI</i>	1,58E-17	3,93659	cis men up vs trans women
cg01504215	<i>MLPH</i>	4,42E-17	5,06781	cis men up vs trans women
cg24891709	<i>ZC3HAV1</i>	9,77E-17	2,2703	cis men up vs trans women
cg03834947	<i>MTFMT</i>	1,58E-15	2,52867	cis men up vs trans women
cg01392253	<i>MPP5</i>	4,12E-15	4,05779	cis men up vs trans women
cg26818735	<i>TWIST1</i>	9,74E-15	2,03939	cis men up vs trans women
cg04883656	<i>OGFRL1</i>	1,31E-14	2,20073	cis men up vs trans women
cg00185634	<i>DISP2</i>	1,59E-14	2,43531	cis men up vs trans women
cg11582634	<i>KCNT1</i>	1,75E-14	5,33843	cis men up vs trans women
cg16525692	<i>CHD1L</i>	3,06E-14	-2,56885	cis men down vs trans women
cg12603476	<i>TSPAN14</i>	3,25E-14	2,57939	cis men up vs trans women
cg00699993	<i>GRIA2</i>	3,66E-14	2,43516	cis men up vs trans women
cg11849422	<i>PALM2</i>	6,11E-14	2,62698	cis men up vs trans women
cg27443867	<i>RASGEF1A</i>	9,16E-14	2,565	cis men up vs trans women
cg01483824	<i>GRIN2D</i>	2,08E-13	6,40923	cis men up vs trans women
cg18035158	<i>SOBP</i>	3,25E-13	3,29492	cis men up vs trans women
cg11232793	<i>PIK3R2</i>	3,32E-13	2,10209	cis men up vs trans women
cg21898346	<i>SLC25A40</i>	3,48E-13	2,119	cis men up vs trans women
cg01878345	<i>POU3F3</i>	4,37E-13	2,93962	cis men up vs trans women
cg19919881	<i>PWWP2B</i>	5,67E-13	7,07532	cis men up vs trans women
cg21223075	<i>BHLHE40</i>	5,98E-13	-5,50748	cis men down vs trans women
cg11843188	<i>TMEM123</i>	2,23E-12	3,49979	cis men up vs trans women
cg02613380	<i>UBTD1</i>	2,65E-12	5,66158	cis men up vs trans women
cg14276772	<i>ODC1</i>	1,05E-11	-3,53055	cis men down vs trans women
cg25399512	<i>ESPN</i>	1,92E-11	2,84364	cis men up vs trans women
cg04971418	<i>C5orf36</i>	2,38E-11	-2,23034	cis men down vs trans women
cg11178574	<i>RASSF7</i>	2,94E-11	2,34354	cis men up vs trans women
cg00160667	<i>PTPRU</i>	4,63E-11	-10,622	cis men down vs trans women
cg19774733	<i>GRHPR</i>	3,14E-10	2,37048	cis men up vs trans women
cg00445548	<i>NFATC1</i>	9,22E-10	7,54969	cis men up vs trans women

cg03666441	<i>KCTD11</i>	1,31E-09	3,16436	cis men up vs trans women
cg26133769	<i>PCDH7</i>	1,43E-09	3,28978	cis men up vs trans women
cg08687137	<i>B3GAT3</i>	4,82E-09	4,73926	cis men up vs trans women
cg12443753	---	6,14E-09	-2,25858	cis men down vs trans women
cg16120422	<i>CCDC42B</i>	7,03E-09	2,02543	cis men up vs trans women
cg21200656	<i>NKX2-4</i>	8,77E-09	2,46663	cis men up vs trans women
cg04632255	<i>LOC101927322</i>	1,03E-08	-4,94639	cis men down vs trans women
cg24853765	<i>WDR47</i>	1,09E-08	2,05257	cis men up vs trans women
cg01861096	<i>CLTCL1</i>	2,83E-08	3,16469	cis men up vs trans women
cg01843131	<i>DDX10</i>	3,53E-08	2,16532	cis men up vs trans women
cg09700085	<i>SLC6A20</i>	4,72E-08	-2,23008	cis men down vs trans women
cg27091900	<i>ESPN</i>	4,90E-08	-2,28805	cis men down vs trans women
cg22078869	<i>PCBD2</i>	4,98E-08	-2,34669	cis men down vs trans women
cg24396745	<i>HCN4</i>	8,26E-08	2,73245	cis men up vs trans women
cg21538190	<i>NHLH1</i>	1,36E-07	-2,69602	cis men down vs trans women
cg19410626	<i>C14orf166</i>	1,48E-07	-2,34771	cis men down vs trans women
cg21046659	<i>SUSD1</i>	2,28E-07	2,24355	cis men up vs trans women
cg13331200	<i>CADM2</i>	7,86E-07	-2,06978	cis men down vs trans women
cg18710053	<i>FLJ44606</i>	8,21E-07	4,67191	cis men up vs trans women
cg15000684	<i>C1orf228</i>	1,50E-06	2,10586	cis men up vs trans women
cg26506013	<i>SEC24A</i>	1,65E-06	2,18927	cis men up vs trans women
cg03885684	<i>EPB41L5</i>	1,66E-06	-4,44915	cis men down vs trans women
cg22984571	---	1,96E-06	2,52188	cis men up vs trans women
cg26459700	<i>CAMK1D</i>	2,02E-06	-2,04508	cis men down vs trans women
cg25764197	<i>UBALD1</i>	4,10E-06	2,41068	cis men up vs trans women
cg00898988	<i>ZFHX2</i>	5,72E-06	-2,00459	cis men down vs trans women
cg06638795	<i>KCNG3</i>	3,56E-05	4,09011	cis men up vs trans women
cg26358144	<i>ARL6IP1</i>	6,07E-05	-2,00942	cis men down vs trans women
cg00088299	---	0,000107937	-3,38295	cis men down vs trans women
cg19769164	<i>TMCO1</i>	0,000170257	-3,50725	cis men down vs trans women
cg27544288	<i>NHEDC1</i>	0,000184282	2,00044	cis men up vs trans women
cg11636631	---	0,000187544	2,27383	cis men up vs trans women
cg14409477	<i>HUS1B</i>	0,000248872	-2,96332	cis men down vs trans women
cg16786756	---	0,000407128	2,0804	cis men up vs trans women

RESULTADOS

cg14623093	<i>GORASP1</i>	0,000413152	2,31719	cis men up vs trans women
cg20544675	<i>LETM2</i>	0,000421979	3,139	cis men up vs trans women
cg03689146	---	0,000441849	-5,98348	cis men down vs trans women
cg24910739	<i>ARL17A</i>	0,000474125	-2,51747	cis men down vs trans women
cg10109500	<i>GHSR</i>	0,000623839	2,34314	cis men up vs trans women
cg14361252	---	0,000782016	-2,08483	cis men down vs trans women
cg00685135	<i>GLIPR2</i>	0,000966425	-2,86093	cis men down vs trans women
cg17328806	<i>COX11</i>	0,00104664	-2,20301	cis men down vs trans women
cg02090742	<i>C17orf79</i>	0,00107045	-4,77813	cis men down vs trans women
cg20581874	---	0,0013762	2,2071	cis men up vs trans women
cg17483361	<i>FIP1L1</i>	0,00196124	-2,73675	cis men down vs trans women
cg11738485	<i>HOOK2</i>	0,00219694	-4,56338	cis men down vs trans women
cg04657146	<i>HOOK2</i>	0,00279664	-3,58421	cis men down vs trans women
cg03167954	<i>GAS2L1</i>	0,00282924	2,86189	cis men up vs trans women

(---) Algunos sitios CpG no se encuentran localizados en genes, lo que significa que o bien estos CpG se encuentran en áreas intragénicas o bien se desconoce su ubicación.

Mujeres cis frente a hombres trans (antes y después del GAHT)

Respecto a las poblaciones asignadas mujeres al nacer, antes de iniciar el GAHT se encontraron 4 sitios CpG que pasaron la corrección estadística, de los cuales tan solo uno estaba situado en una isla. Este CpG, relacionado con el gen *NEK1*, estaba hipometilado en el grupo trans. La Tabla 11 enumera los 4 CpGs que pasaron la corrección estadística antes del GAHT.

Tabla 11. *Mujeres cis vs hombres trans antes del GAHT. Lista de 4 CpG que pasaron la corrección estadística.*

Probeset ID	Gen	Relacion_to_UCSC_CpG_Island	p-valor (cis women vs trans men)	Diferencia (cis women vs trans men)	Diferencia descripción (cis women vs trans men)
cg16149820	---	N_Shelf	5,30E-10	5,38516	cis women up vs trans men
cg23944405	<i>MPPED2</i>	N_Shelf	9,56E-09	-5,52554	cis women down vs trans men
cg27158490	<i>NEK1</i>	Island	8,45E-07	3,75841	cis women up vs trans men
cg19885684	<i>LINC01351</i>	---	1,50E-05	-2,9014	cis women down vs trans men

(---) Algunos sitios CpG no se encuentran localizados en genes, lo que significa que o bien estos CpG se encuentran en áreas intragénicas o bien se desconoce su ubicación. **N_Shelf**: ubicación relativa a la isla CpG, entre 2 y 4 kb up- y downstream.

Después de seis meses de GAHT, el número de CpGs que pasaron la corrección estadística aumentó a 317, de los cuales 135 eran islas CpG. De estas islas CpG, 40 (29,63%) estaban hipermetilados y 95 (70,37%) estaban hipometilados en el grupo trans. La Tabla 12 enumera las 135 islas CpG que pasaron la corrección estadística tras el GAHT. Los CpGs más significativos estaban relacionados con los genes *SPATA4*, *PTTG1IP*, *TAF4*, *STXBP5*, *HIFNT*, *DMWD*, *PCDHGA4*, *LPHN1* y *AFG3L1*.

Tabla 12. *Mujeres cis vs hombres trans después del GAHT. Lista de 135 islas CpG que pasaron la corrección estadística.*

Probeset ID	Gen	p-valor cis women vs trans men	Diferencia cis women vs trans men	Diferencia descripción cis women vs trans men
cg02833127	<i>SPATA4</i>	3,83E-51	-5,59947	cis women down vs trans men
cg13438128	<i>PTTG1IP</i>	7,37E-44	6,00848	cis women up vs trans men
cg14080585	<i>TAF4</i>	1,14E-42	7,21883	cis women up vs trans men
cg15866800	<i>STXBP5</i>	2,52E-42	5,28078	cis women up vs trans men
cg07277190	<i>HIFNT</i>	1,45E-38	7,11757	cis women up vs trans men
cg19541688	<i>DMWD</i>	5,25E-38	7,0374	cis women up vs trans men
cg24954895	<i>PCDHGA4</i>	7,85E-36	5,3856	cis women up vs trans men
cg10722938	<i>LPHN1</i>	4,67E-34	2,17522	cis women up vs trans men
cg09428537	<i>AFG3L1</i>	3,33E-33	2,26148	cis women up vs trans men
cg17877674	<i>PCOLCE2</i>	5,56E-33	2,17916	cis women up vs trans men
cg07360021	<i>MTHFD1L</i>	3,23E-31	2,57583	cis women up vs trans men
cg08186508	<i>PIGH</i>	5,45E-31	2,38582	cis women up vs trans men
cg02487020	<i>RPAP1</i>	7,31E-31	2,08626	cis women up vs trans men
cg03579738	<i>ZNF57</i>	9,13E-31	2,18257	cis women up vs trans men
cg16542283	<i>THAP6</i>	1,03E-30	2,06199	cis women up vs trans men
cg23806550	<i>FIP1L1</i>	5,48E-30	2,66023	cis women up vs trans men

RESULTADOS

cg17070338	<i>CARKD</i>	6,60E-30	2,00561	cis women up vs trans men
cg23433828	<i>CRNDE</i>	9,34E-30	2,15271	cis women up vs trans men
cg04821107	<i>MFAP3L</i>	1,76E-29	-3,99699	cis women down vs trans men
cg24017268	<i>ESPN</i>	6,73E-29	2,75936	cis women up vs trans men
cg18054956	<i>KLHL11</i>	1,02E-27	4,7647	cis women up vs trans men
cg04097963	---	7,51E-27	2,47211	cis women up vs trans men
cg03190876	<i>NXNLI</i>	7,92E-26	4,92187	cis women up vs trans men
cg12842219	<i>ARL4D</i>	1,47E-25	2,12482	cis women up vs trans men
cg20596493	---	1,72E-25	2,39216	cis women up vs trans men
cg27573735	---	2,97E-25	6,27745	cis women up vs trans men
cg09706833	<i>COL18A1</i>	8,64E-24	4,83891	cis women up vs trans men
cg02294730	<i>SPINT1</i>	1,94E-22	2,55503	cis women up vs trans men
cg23763259	<i>CHD1L</i>	4,17E-22	-3,64754	cis women down vs trans men
cg06740963	<i>TCEB2</i>	8,06E-22	2,10647	cis women up vs trans men
cg25808577	<i>PACSIN1</i>	2,93E-21	2,94831	cis women up vs trans men
cg25485991	<i>VAMP2</i>	2,95E-21	2,9146	cis women up vs trans men
cg22697574	<i>Clorf94</i>	7,66E-21	2,55027	cis women up vs trans men
cg16026114	---	4,46E-20	2,04984	cis women up vs trans men
cg23327483	<i>CHCHD10</i>	5,53E-20	2,97246	cis women up vs trans men
cg14859324	<i>GABRB3</i>	1,15E-19	5,92952	cis women up vs trans men
cg19529823	<i>HPCAL1</i>	2,46E-19	4,15534	cis women up vs trans men

cg00610228	<i>FKBP5</i>	3,13E-19	-2,20141	cis women down vs trans men
cg21898346	<i>SLC25A40</i>	3,19E-19	3,0127	cis women up vs trans men
cg04883656	<i>OGFRL1</i>	5,12E-19	2,78111	cis women up vs trans men
cg24891709	<i>ZC3HAV1</i>	8,97E-19	2,43724	cis women up vs trans men
cg27443867	<i>RASGEF1A</i>	1,43E-18	3,34931	cis women up vs trans men
cg03834947	<i>MTFMT</i>	1,76E-18	2,89341	cis women up vs trans men
cg00591160	<i>ING4</i>	6,25E-18	-2,62166	cis women down vs trans men
cg11582634	<i>KCNT1</i>	2,16E-17	6,12375	cis women up vs trans men
cg01504215	<i>MLPH</i>	6,10E-17	4,71391	cis women up vs trans men
cg11232793	<i>PIK3R2</i>	1,15E-16	2,52352	cis women up vs trans men
cg01483824	<i>GRIN2D</i>	1,91E-16	7,46583	cis women up vs trans men
cg11849422	<i>PALM2</i>	2,10E-16	2,93388	cis women up vs trans men
cg26542283	<i>C5orf39</i>	6,02E-16	-2,50121	cis women down vs trans men
cg24853765	<i>WDR47</i>	9,07E-16	3,40509	cis women up vs trans men
cg01878345	<i>POU3F3</i>	3,05E-15	3,22909	cis women up vs trans men
cg01392253	<i>MPP5</i>	3,05E-15	3,84505	cis women up vs trans men
cg16525692	<i>CHD1L</i>	3,18E-15	-2,58714	cis women down vs trans men
cg02613380	<i>UBTD1</i>	5,63E-15	6,48292	cis women up vs trans men
cg12603476	<i>TSPAN14</i>	1,11E-14	2,50437	cis women up vs trans men
cg08410109	<i>PDCL3</i>	1,12E-14	2,15963	cis women up vs trans men
cg00185634	<i>DISP2</i>	1,97E-14	2,2712	cis women up vs trans men

RESULTADOS

cg22967516	<i>IREB2</i>	2,12E-14	2,07616	cis women up vs trans men
cg19774733	<i>GRHPR</i>	1,29E-13	2,92098	cis women up vs trans men
cg00699993	<i>GRIA2</i>	1,43E-13	2,18874	cis women up vs trans men
cg25399512	<i>ESPN</i>	3,06E-13	3,07387	cis women up vs trans men
cg23616649	<i>ARF3</i>	3,65E-13	2,66226	cis women up vs trans men
cg03666441	<i>KCTD11</i>	3,97E-13	3,97429	cis women up vs trans men
cg04971418	<i>C5orf36</i>	8,24E-13	-2,35125	cis women down vs trans men
cg18035158	<i>SOBP</i>	1,20E-12	2,96289	cis women up vs trans men
cg11843188	<i>TMEM123</i>	1,30E-12	3,34612	cis women up vs trans men
cg21200656	<i>NKX2-4</i>	1,58E-12	3,20014	cis women up vs trans men
cg12360373	<i>ATXN2L</i>	2,04E-12	-2,07684	cis women down vs trans men
cg26133769	<i>PCDH7</i>	3,46E-12	3,85656	cis women up vs trans men
cg14903832	<i>COQ10B</i>	2,62E-11	2,46081	cis women up vs trans men
cg21046659	<i>SUSD1</i>	4,50E-11	3,00314	cis women up vs trans men
cg19919881	<i>PWWP2B</i>	5,24E-11	5,67855	cis women up vs trans men
cg12443753	---	6,87E-11	-2,52821	cis women down vs trans men
cg21223075	<i>BHLHE40</i>	1,19E-10	-4,29693	cis women down vs trans men
cg08687137	<i>B3GAT3</i>	1,45E-10	5,10922	cis women up vs trans men
cg01843131	<i>DDX10</i>	3,56E-10	2,45902	cis women up vs trans men
cg00898988	<i>ZFHX2</i>	5,25E-10	-2,90782	cis women down vs trans men
cg23978826	<i>ODF3B</i>	5,44E-10	2,07883	cis women up vs trans men

cg22078869	<i>PCBD2</i>	7,41E-10	-2,63071	cis women down vs trans men
cg13331200	<i>CADM2</i>	1,19E-09	-2,60519	cis women down vs trans men
cg14864852	<i>GTPBP1</i>	2,75E-09	-2,01065	cis women down vs trans men
cg01861096	<i>CLTCL1</i>	2,87E-09	3,27591	cis women up vs trans men
cg26862691	<i>CDK10</i>	3,73E-09	2,06411	cis women up vs trans men
cg24396745	<i>HCN4</i>	3,92E-09	2,93225	cis women up vs trans men
cg02688348	<i>SSRP1</i>	5,17E-09	-2,20975	cis women down vs trans men
cg24781299	<i>RASA3</i>	5,89E-09	2,10679	cis women up vs trans men
cg27091900	<i>ESPN</i>	9,26E-09	-2,31183	cis women down vs trans men
cg12524748	<i>SLBP</i>	1,43E-08	2,4632	cis women up vs trans men
cg09700085	<i>SLC6A20</i>	1,55E-08	-2,1999	cis women down vs trans men
cg22984571	---	2,55E-08	2,93126	cis women up vs trans men
cg23418208	<i>ZFYVE21</i>	2,57E-08	2,02126	cis women up vs trans men
cg00826610	<i>DCAF10</i>	2,78E-08	-2,10352	cis women down vs trans men
cg04894169	<i>XPC</i>	6,03E-08	-2,06236	cis women down vs trans men
cg19410626	<i>C14orf166</i>	6,23E-08	-2,29556	cis women down vs trans men
cg06751596	<i>SKP1</i>	6,36E-08	2,29598	cis women up vs trans men
cg21538190	<i>NHLH1</i>	9,02E-08	-2,58086	cis women down vs trans men
cg26506013	<i>SEC24A</i>	9,42E-08	2,37434	cis women up vs trans men
cg08039823	<i>ZBTB9</i>	1,06E-07	2,03993	cis women up vs trans men
cg14339287	<i>TECR</i>	1,19E-07	2,2162	cis women up vs trans men

RESULTADOS

cg00160667	<i>PTPRU</i>	1,27E-07	-7,20292	cis women down vs trans men
cg01930417	---	1,43E-07	2,51024	cis women up vs trans men
cg13464717	<i>OAZI</i>	2,24E-07	2,8748	cis women up vs trans men
cg25764197	<i>UBALD1</i>	2,35E-07	2,63332	cis women up vs trans men
cg15000684	<i>Clorf228</i>	2,42E-07	2,1716	cis women up vs trans men
cg16786756	---	2,70E-07	3,11043	cis women up vs trans men
cg19781738	<i>NRD1</i>	2,95E-07	-2,1005	cis women down vs trans men
cg03885684	<i>EPB41L5</i>	3,49E-07	-4,53054	cis women down vs trans men
cg00487848	<i>SFRS8</i>	5,70E-07	2,05552	cis women up vs trans men
cg00088299	---	1,23E-06	-4,20471	cis women down vs trans men
cg08689926	---	2,09E-06	-7,1884	cis women down vs trans men
cg00685135	<i>GLIPR2</i>	2,24E-06	-4,14392	cis women down vs trans men
cg22332388	<i>YTHDF3</i>	3,54E-06	-2,05136	cis women down vs trans men
cg02885046	<i>TDRD12</i>	4,86E-06	-2,15717	cis women down vs trans men
cg11636631	---	6,53E-06	2,6843	cis women up vs trans men
cg27544288	<i>NHEDC1</i>	6,63E-06	2,35632	cis women up vs trans men
cg27036347	<i>ACTN1</i>	1,12E-05	-2,57547	cis women down vs trans men
cg03689146	---	2,79E-05	-6,92404	cis women down vs trans men
cg13777502	<i>KPNA2</i>	4,11E-05	2,77673	cis women up vs trans men
cg14235350	<i>ZDHHC14</i>	6,09E-05	-3,63711	cis women down vs trans men
cg18710053	<i>FLJ44606</i>	0,000130928	3,19606	cis women up vs trans men

cg06638795	<i>KCNG3</i>	0,000140721	3,47775	cis women up vs trans men
cg14623093	<i>GORASP1</i>	0,000263678	2,25963	cis women up vs trans men
cg01707795	<i>ACTN1</i>	0,000281391	-2,0813	cis women down vs trans men
cg05836256	<i>LMF1</i>	0,000505236	-2,10188	cis women down vs trans men
cg00445548	<i>NFATC1</i>	0,000640303	3,33358	cis women up vs trans men
cg04802271	---	0,000795029	-4,10421	cis women down vs trans men
cg24418853	<i>PTPLA</i>	0,000806328	-2,97349	cis women down vs trans men
cg10109500	<i>GHSR</i>	0,00120882	2,06547	cis women up vs trans men
cg13241411	<i>LOC400927-CSNK1E</i>	0,00126334	2,46284	cis women up vs trans men
cg18139870	<i>ZNF84</i>	0,0013414	3,1318	cis women up vs trans men
cg00716604	<i>TBC1D15</i>	0,00178218	-2,22234	cis women down vs trans men
cg09698465	---	0,00217196	-4,84118	cis women down vs trans men
cg08784311	---	0,00337709	2,20379	cis women up vs trans men
cg23281527	<i>KLHDC7A</i>	0,00394193	-2,27091	cis women down vs trans men

(---) Algunos sitios CpG no se encuentran localizados en genes, lo que significa que o bien estos CpG se encuentran en áreas intragénicas o bien se desconoce su ubicación.

Análisis de enriquecimiento funcional y regulatorio

Una vez seleccionados los CpGs significativos, se realizó un análisis de enriquecimiento (con el programa Partek® Pathway y el WebGestalt), una vez revisada la lista de genes para excluir aquellos con una implicación conocida en la edad y el tabaquismo. Al igual que el estudio previo, ninguno de los genes se encontraba entre ellos.

El análisis de enriquecimiento arrojó una sobrerrepresentación significativa para las categorías de BP, MF y CC. Entre los 10 BP principales en los resultados de enriquecimiento, se pueden destacar como importantes GOs como la regulación negativa de la expresión génica (GO:0010629), el proceso homeostático (GO:0042592) y la regulación positiva de la actividad catalítica (GO:0043085) (Figura 19). Asimismo, entre las 10 MF con mayores resultados de enriquecimiento, se encontraron fundamentalmente funciones de unión como la unión de nucleótidos de purina (GO:0017076), la unión de ribonucleótidos (GO:0032553), el regulador de funciones moleculares (GO:0098772) o la unión de ARN (GO:0003723) (Figura 20).

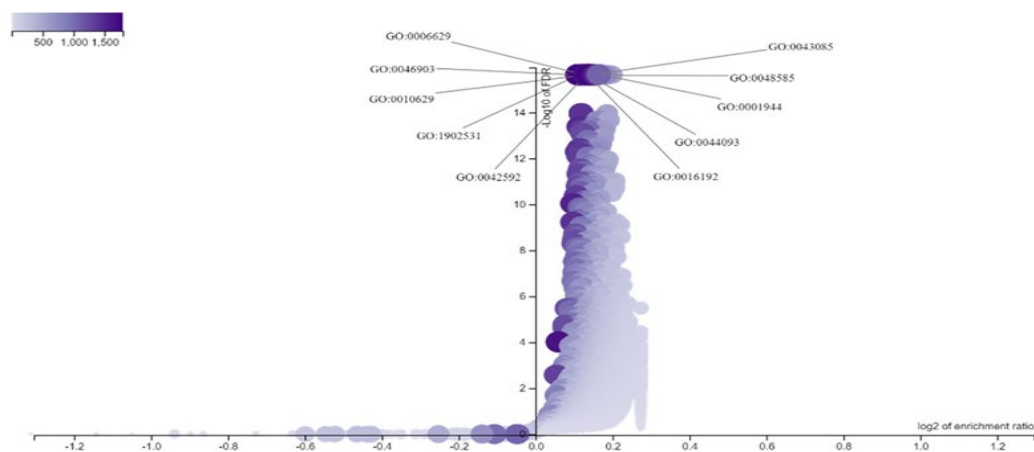


Fig 19. Gráfico de volcán que muestra los resultados de enriquecimiento de los 10 procesos biológicos con mayores resultados de enriquecimiento. Los conjuntos de genes con FDR $p < 0,05$ están coloreados en un tono más oscuro. La gráfica del volcán incluye ID de puntuaciones para las principales categorías funcionales con FDR $< 0,05$. El tamaño y el color de los puntos se escalan con el tamaño de los conjuntos de genes.

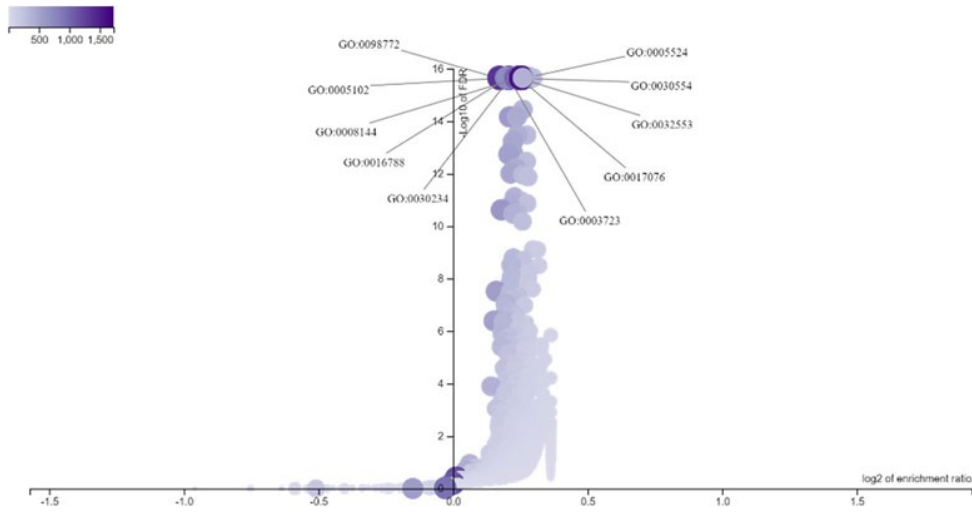


Fig 20. Gráfico de volcán que muestra los resultados de enriquecimiento para las 10 funciones moleculares con mayores resultados de enriquecimiento. Los conjuntos de genes con $FDR p < 0,05$ están coloreados en un tono más oscuro. El diagrama del volcán incluye ID de puntuaciones para todas las categorías funcionales con $FDR < 0,05$ y el tamaño y el color de los puntos se escalan con el tamaño de los conjuntos de genes.

5. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta Tesis fue profundizar en el conocimiento de la base epigenética de la incongruencia de género (ICD-11) (World Health Organization, 2018), dado que es un proceso de etiología compleja en donde intervienen la acción conjunta de diferentes hormonas, receptores hormonales, genes, interacciones gen-gen y gen-ambiente, durante las etapas pre y perinatales durante el desarrollo cerebral (Joel, 2021; Joel & McCarthy, 2017; McCarthy, Herold, & Stockman, 2018).

5.1. Estudio de metilación del fragmento RIII de la región promotora del receptor de estrógenos α

El primer trabajo se centró en el estudio del perfil epigenético de un fragmento concreto (RIII) de la región promotora del receptor de estrógenos α , en una población con IG antes vs después de seis meses de GAHT. La región RIII fue definida como un T-DMR (región metilada diferencialmente dependiente de tejido) por Maekawa et al., (2016) quien demostró que la expresión del gen *ESR1* está regulada principalmente por la región RIII y no por las regiones RI y RII de la región promotora del gen *ESR1*.

Nuestros datos apoyan la existencia de un patrón sexo dimórfico del perfil de metilación del RIII en sangre, tanto en la población cis como en la población trans, en la etapa anterior al GAHT. En el presente estudio se encontró que el RIII estaba más densamente metilado en la población cis masculina que en la población cis femenina, mientras que en la población trans, el RIII estaba más metilado en la población trans femenina que la población trans masculina. Este patrón de metilación se observó en todos los sitios CpGs con significación estadística que pasaron la corrección de Bonferroni, así como en el grado de metilación total del fragmento.

Antes del GAHT, la población trans mostró un perfil de metilación característico, diferente al de la población cis. Así, la población trans femenina mostró un grado de metilación intermedio entre ambas poblaciones cis, mayor que el de las mujeres, pero menor que el de los varones cis. Sin embargo, la población trans masculina mostró el grado de metilación más bajo del resto de poblaciones. Pero después de seis meses de GAHT, tanto los hombres como las mujeres trans incrementaron el grado de metilación en este fragmento,

alcanzando niveles intermedios de metilación entre los hombres y las mujeres cis. Los hombres trans mostraron un incremento del nivel global de metilación que fue especialmente fuerte en las posiciones CpG 372 y 405 CpG. Estos datos indican, por lo tanto, que el tratamiento con estradiol no produce cambios significativos a nivel epigenético en esta región RIII en el caso de las mujeres trans, y sin embargo el tratamiento con testosterona sí produce un incremento significativo de la metilación en el caso de la población trans masculina. Estos resultados apoyan la existencia de diferentes mecanismos fisiológicos para el tratamiento exógeno con estradiol y testosterona. Además nuestros datos son consistentes con estudios previos de metilación del POA en ratas (DonCarlos, 1996; Kurian, Olesen, & Auger, 2010). Esta área presenta dimorfismo sexual en ratas, pues los machos tienen niveles de metilación más altos que las hembras, y niveles de expresión *ESRI* más bajos desde el día 2 post natal hasta la adultez. Ello implica un patrón de expresión del gen *ESRI* diferente en machos y en hembras, que comienza en el desarrollo post natal temprano y se extiende hasta la edad adulta. Por lo tanto, comprender cómo los esteroides exógenos actúan sobre la metilación del RIII podría ser un aspecto relevante en la comprensión de la diferenciación sexual en mamíferos.

También Schwarz et al., (2010) encontraron que en ratas, los machos muestran niveles de metilación más altos en la región promotora del ER α que las hembras. Las hembras muestran alrededor de un 30% menos de metilación que los machos. Más aún, Auger et al (2011) correlacionó estos altos niveles de metilación en machos con una reducción de la proteína ER.

En humanos, la desmetilización de la región promotora del receptor de estrógenos α también se correlaciona con un incremento en la expresión (Herman & Baylin, 2003). Por lo tanto, nuestros datos están de acuerdo con los estudios de metilación y expresión previos, en humanos y también en otras especies, que indican que existe un patrón de metilación sexualmente diferente del *ESRI*.

En nuestra investigación los varones cis mostraron el nivel más alto de metilación del RIII y, de acuerdo con los estudios de expresión, debería corresponder con la expresión más baja del gen. Sin embargo, los hombres trans, antes del GAHT, mostraron el nivel más

bajo de metilación, lo que debería estar relacionado con la expresión más alta del gen *ESRI*. Por otro lado, las mujeres trans mostraron un grado de metilación intermedio entre hombres y mujeres cis, lo que se debería corresponder con una expresión intermedia del gen, mayor que los hombres cis, pero menor que las mujeres cis.

Por lo tanto, antes del GAHT, la población trans presentó un grado de metilación que no coincidía con ninguno de los grupos cis, pero después de 6 meses de tratamiento ambos grupos trans incrementaron su nivel de metilación alcanzando niveles de metilación intermedios entre los niveles de metilación de hombres y mujeres cis. Por tanto, después del GAHT sus niveles de metilación se asemejaron más al nivel correspondiente de su género, pero continuaban siendo característicos de esos grupos.

Hasta donde sabemos, solo hay un estudio sobre la metilación del *ESRI* en personas trans. Aranda et al (2017) compararon una población trans antes y después de seis y doce meses de GAHT. Nuestros datos son consistentes con este trabajo ya que los autores también encontraron un incremento en el grado de metilación del gen *ESRI* en hombres trans y no encontraron significación estadística en mujeres trans. Por otro lado, nuestros datos también son consistentes con los datos genéticos previos sobre la participación del gen *ESRI* en la base genética de la disforia de género (Cortés-Cortés et al., 2017; Fernández et al., 2018; 2020). En resumen, nuestros datos avalan que las variaciones en la metilación del RIII están relacionadas con el proceso de masculinización del cerebro y, por lo tanto, con la etiología de la IG.

Este trabajo presenta algunas limitaciones. En primer lugar, dado el número limitado de individuos analizados, sería necesario la inclusión de una muestra mayor para lograr un mayor peso estadístico. Sin duda, un estudio de seguimiento más prolongado (a los 12 y 18 meses de tratamiento) aportaría información adicional importante, aunque Colizzi et al (2015) advierten que los cambios metabólicos son más notorios durante los primeros 12 meses de tratamiento. Además, aumentar el número de regiones analizadas de la región promotora del *ESRI* y aumentar el número de tejidos analizados proporcionaría una mejor comprensión de la variación en el patrón de metilación. Por otro lado, la fortaleza principal

de nuestro estudio es que es el primer trabajo que analiza el patrón de metilación del RIII en una población trans género utilizando secuenciación genómica por bisulfito.

5.2 Estudios de metilación del ADN global mediante microarray

Estudio de metilación antes del GAHT

En cuanto a los estudios de metilación del ADN global mediante microarray, se realizó un estudio en una población de 16 individuos trans y 16 individuos cis, en una población caucásica belga con la misma procedencia geográfica, raza y sexo. El análisis se realizó con el microarray de metilación de Illumina© Infinium Human Methylation 850k BeadChip (Illumina, San Diego, USA) que evalúa 862.927 sitios de metilación CpG distribuidos por todo el genoma, y que cubren el 99% de los genes conocidos, el 95% de las islas CpG y una alta cobertura de regiones potenciadoras (Moran et al., 2016).

El principal resultado de este estudio es que las poblaciones cis y trans ya presentan diferencias estadísticamente significativas antes del GAHT. El análisis de los componentes principales (PCA) mostró una representación tridimensional de las poblaciones cis y trans claramente diferentes entre sí. Cuando se compararon las poblaciones según el sexo biológico o sexo natal asignado, en la población masculina se encontraron 22 islas CpG con significación estadística. Entre ellas se encontraron al menos cuatro genes implicados en la neurogénesis y el desarrollo cerebral: *SLC6A20*, *PLEKHA5*, *NHLH1* and *MPPED2*. Mientras que en la población femenina se encontraron 2 sitios CpGs con diferencias estadísticas, ninguno ubicado en islas. Uno de ellos, el localizado en el gen *MPPED2*, fue significativo en ambas poblaciones tras.

Más específicamente, cuando se comparó la población con sexo natal masculino (cis vs trans), se encontraron 87 CpGs que cumplían ambos criterios (FDR $p < 0.05$; *fold change* $\geq \pm 2$), de las cuales 22 CpGs estaban localizadas en islas: 14 se encontraban hipometiladas mientras que 8 estaban hipermetiladas en la población cis. En el presente estudio se seleccionaron las islas CpG por su coincidencia con las regiones promotoras (Illingworth & Bird, 2009), ya que la modificación de la metilación de las regiones promotoras tiene la

capacidad de modificar la expresión genética (Maurano et al., 2015) pues previene la unión de la RNA polimerasa y diversos factores de transcripción a las regiones promotoras, inhibiendo así la transcripción (Kang, Park, Ko, & Kim, 2019).

Las islas CpG con mayor significación estadística en la población con sexo masculino estaban ubicados en los genes *WDR45B*, *SLC6A20*, *NHLH1*, *PLEKHA5*, *UBALD1*, *SLC37A1*, *ARL6IP1*, *GRASP*, *NCOA6*, *ABT1* and *C17orf79*. Entre ellos al menos cuatro genes estaban involucrados en la neurogénesis y el desarrollo cerebral (*WDR45B*, *SLC6A20*, *NHLH1*, y *PLEKHA5*), tres estaban relacionados con la transcripción (*NHLH1*, *NCOA6* and *ABT1*), mientras que el gen *C17orf79* está relacionado con la organización de la cromatina, y su activación estimula la transcripción del AR. Finalmente, otros dos genes estaban relacionados con la sinapsis glutamatérgica (*ARL6IP1* and *GRASP*). Todo ello parece indicar que estos genes podrían estar relacionados con la base epigenética de la IG.

Cuando analizamos específicamente las funciones de cada gen, encontramos que *WDR45B* es un componente de la maquinaria autofágica de la célula que controla el proceso intracelular de degradación más importante, mediante el cual los materiales citoplasmáticos son empaquetados en autofagosomas y entregados a los lisosomas para su degradación. Los ratones knockout (KO) presentan un mayor número de axones inflamados y además presentan atrofia cerebelosa (Ji et al., 2020).

Por otro lado, el gen *SLC6A20* sintetiza un transportador de aminoácidos como la prolina y es un regulador de los niveles de glicina en el cerebro. Estudios recientes han informado que este gen está altamente expresado en varias regiones del cerebro y también se encuentra altamente expresado en astrocitos y microglía, pero solo se expresa mínimamente en neuronas GABAérgicas (Bae et al., 2021). Esto podría sugerir que la proteína SLC6A20 actúa como reguladora de la homeostasis de la prolina y la glicina en el cerebro.

El gen *NHLH1* está involucrado en la neurogénesis y codifica una proteína hélice-bucle-hélice (HLH) que pertenece a una familia de factores de transcripción. Algunas de estas proteínas juegan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de una gran variedad

de tejidos. Esta proteína se expresa fundamentalmente en el cerebro, específicamente en el cerebelo. Ware et al., (2016) propusieron que la proteína NHLH1 es realmente un marcador neuronal cuya función podría ser regular la expresión de genes neuronales específicos a nivel de las primeras neuronas, estableciendo los tractos de andamiaje de axones tempranos.

Por otro lado, el gen *PLEKHA5* está relacionado con la migración celular y con las interacciones célula-célula y también podría ser un mediador del fenotipo cerebral (Eisele, Gill, Shankar, & Brastianos, 2015). Yamada et al., (2012) demostraron que este gen podría jugar un papel importante en el desarrollo cerebral en ratones.

En el presente estudio también se encontraron diferencias en el grado de metilación del gen *UBALDI*, pero su función no es totalmente desconocida, porque se sabe que está relacionado con la secreción de Interleucina-8 (IL-8) y la señalización de NF-kappa-B (NF-kB) (Frenkel et al., 2019). Es importante señalar que NF-kB es un factor de transcripción que se ha relacionado con la activación de genes que pueden modular la excitabilidad neuronal (Albensi & Mattson, 2000) Por otra parte, se ha demostrado en tumores cerebrales, un aumento en la actividad de NF-kB induce un incremento en la expresión de la IL-8 (Raychaudhuri & Vogelbaum, 2011).

Respecto al gen *NCOA6*, la proteína que codifica es un coactivador transcripcional que puede interaccionar con los receptores hormonales nucleares incrementando su función activadora de la transcripción. Se trata de un coactivador que directamente se une a receptores nucleares como los receptores de esteroides (GR y ERs) estimulando la función transcripcional de manera dependiente de los niveles hormonales (Eyster, 2016). Además, estudios previos de los polimorfismos genéticos del ADN relacionados con los coactivadores SRC-1 y SRC-2, han señalado su posible implicación en la etiología de la IG (Fernández et al., 2021; Ramírez et al., 2021).

Los estudios con ratones sugieren que es probable que la proteína codificada por el gen *NCOA6* active la transcripción basal de los promotores de clase II mediante la interacción con el ADN. Las anotaciones GO relacionadas con este gen incluyen además de la

actividad coactivadora de la transcripción, la unión al ADN, la unión al ARN, la actividad coactivadora de la transcripción o la regulación de la transcripción por la ARN polimerasa II, entre otras.

Respecto a la población con sexo femenino, encontramos cambios de metilación significativos en solo 2 CpG, y ninguno de ellos estaba situado en islas. El análisis de Venn mostró que una de estas dos CpGs era significativa en ambas poblaciones trans. Así, el cg23944405, localizado en el gen *MPPED2* mostró cambios estadísticamente significativos en la metilación tanto en hombres como en mujeres trans. Este gen se expresa en la mayoría de los tejidos humanos, también en el cerebro, tanto en hombres como en mujeres, y se expresa predominantemente en cerebros fetales. Liguori et al., (2012) caracterizaron la expresión del gen *MPPED2* en tejidos humanos de origen neuronal, y demostraron que la expresión de este gen se modula durante el desarrollo, atribuyendo a este gen un papel importante en los procesos de diferenciación neuronal que ocurren en la etapa embrionaria, durante el desarrollo del SNC. Además, este gen está relacionado con la inhibición del ciclo celular, ya que induce apoptosis así como diferenciación de precursores neuronales (Liguori et al., 2012).

En nuestra población el cg23944405, relativo al gen *MPPED2*, se encuentra hipermetilado en ambas poblaciones trans antes del GAHT, lo que estaría relacionado con una menor expresión de este gen en la población trans. Pero esta CpG no se encuentra en una isla, por lo que no podemos concluir que su hipermetilación esté relacionada con una baja expresión del gen. No obstante, en general, debemos señalar que la baja actividad de la metalofosfoesterasa (*in vitro*) puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del SNC.

En resumen, nuestros datos confirman la hipótesis de un origen complejo de la IG, como resultado de la combinación de múltiples factores como las hormonas, los receptores hormonales, la genética, y ahora también la epigenética.

Estudio de metilación antes vs después del GAHT

El principal resultado de este estudio indica que el GAHT durante tan solo seis meses, modifica el metiloma en ambas poblaciones trans. Después del GAHT, la población trans masculina mostró modificaciones significativas de la metilación en 200 CpGs (95 ubicadas en islas). Entre las islas CpGs, el 27,37% aumentó su grado de metilación después del GAHT, mientras que el 72,63% lo disminuyó. Dado que estos sitios CpGs están ubicados en islas, parece que seis meses de GAHT en la población trans masculina fueron suficientes para producir una disminución en el grado de metilación, y por lo tanto un aumento en la expresión, de 69 genes.

Respecto a la población de mujeres trans, el GAHT modificó la metilación de 134 CpGs (78 ubicados en islas), y que 67 islas CpG (85,9%) fueron hipometiladas después del GAHT. Por lo tanto, el 85,9% de estas islas CpG disminuyó el grado de metilación después de tan solo seis meses de GAHT, lo que se relaciona con un aumento en la expresión génica.

Por tanto, en ambas poblaciones trans, seis meses de GAHT indujeron una reducción significativa de la metilación. Además, ambas poblaciones trans compartieron 70 de estas islas CpG que cambiaron significativamente su grado de metilación después del tratamiento.

Cuando comparamos las poblaciones trans con las poblaciones cis, con el mismo sexo biológico, antes del GAHT se pudo observar que la población con sexo masculino (mujeres trans) presentaban 13 islas CpG hipermetiladas y 7 islas CpG hipometiladas en comparación con la población cis masculina. Tras el GAHT la cantidad de CpGs que experimentaron un cambio significativo en el grado de metilación aumentó a 239 (109 ubicadas en islas). De estas 109 islas CpG, 32 (29,36%) estaban hipermetiladas, mientras que 77 (70,64%) estaban hipometiladas en la población trans respecto a la cis. Los cambios de metilación más significativos se relacionaron con los genes *SPATA4*, *PTTG1IP*, *TAF4*, *STXBP5*, *DMWD*, *HIFNT*, *PCDHGA4* y *AFG3L1*.

Respecto a las poblaciones con sexo femenino (hombres trans), antes del GAHT tan solo presentaban 4 CpGs significativas, y solo una de ellas estaba ubicada en una isla. Esta isla CpG, relacionado con el gen *NEK1*, se encontraba hipometilada en la población de hombres trans y, por lo tanto, este gen se sobreexpresaba en la población trans respecto a la población cis. Pero después del GAHT la cantidad de CpGs que cambiaron su grado de metilación aumentó a 317 (135 ubicadas en islas). 40 islas CpG (29,63%) estaban hipermetiladas, mientras que 95 (70,37%) estaban hipometiladas en la población trans. Los CpG más significativos se relacionaron con los genes *SPATA4*, *PTTGIIP*, *TAF4*, *STXBP5*, *HIFNT*, *DMWD*, *PCDHGA4*, *LPHN1* y *AFG3L1*. Por tanto, un breve GAHT desencadenó en la población trans, una disminución del grado de metilación en el 70% de las islas CpG. Antes del GAHT las diferencias en el grado de metilación entre las poblaciones cis y trans con sexo femenino, eran pequeñas, pero el GAHT produjo principalmente una disminución de la metilación. Al tratarse de islas CpG, podemos inferir que el GAHT produjo un aumento en la expresión de estos genes. En ambas poblaciones trans, las CpG más significativas se relacionaron con los mismos genes: *SPATA4*, *PTTGIIP*, *TAF4*, *STXBP5*, *HIFNT*, *DMWD*, *PCDHGA4*, *LPHN1* y *AFG3L1*.

Los genes *SPATA4* y *HIFNT* juegan un papel importante en la espermatogénesis. *TAF4* participa en la transcripción basal, además sirve como coactivador y funciona en el reconocimiento de regiones promotoras o modifica los factores de transcripción generales (GTF) para facilitar el complejo de ensamblaje y el inicio de la transcripción. *STXBP5* por otro lado, codifica una proteína de unión a sintaxina 1 (Tamosyn) que participa en el acoplamiento y fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática presináptica. Además, tomosyn regula la estabilidad dendrítica. Por otro lado, *PCDHGA4* es un miembro del grupo de genes de la protocadherina gamma y desempeña un papel fundamental en el establecimiento y la función de conexiones específicas entre células en el cerebro.

En cuanto al cg27158490, relacionado con el gen *NEK1*, fue el único sitio CpG que antes del GAHT, en hombres trans mostraba significación y además estaba ubicado en una isla. Este sitio CpG se encontraba hipometilado en la población trans antes del GAHT, pero después de seis meses de GAHT se encontraba hipermetilado en esta población. La

proteína sintetizada por este gen es una serina/treonina quinasa involucrada en la regulación del ciclo celular (mitosis, meiosis y progresión del ciclo celular). Esta proteína se encuentra en un complejo centrosomal junto con la proteína FEZ1, una proteína neuronal que juega un papel fundamental en el desarrollo axonal y dendrítico, y que está involucrada con el comienzo de la respuesta celular al estrés genotóxico y juega un papel importante en la prevención de la muerte celular inducida por daño en el ADN.

Por otro lado, el cg23944405 ubicado en el gen *MPPED2*, mostró cambios estadísticamente significativos en el grado de metilación tanto en hombres como en mujeres trans, antes y después del GAHT. El cg23944405, relacionado con el gen *MPPED2*, está hipermetilado en ambas poblaciones trans, antes y después del tratamiento. Por tanto, este CpG permanece hipermetilado en ambas poblaciones trans, incluso después del GAHT. Pero este CpG no se encuentra en una isla, por lo que no podemos concluir que su hipermetilación esté relacionada con una baja expresión génica. Sin embargo, como hemos señalado con anterioridad, debemos señalar que la baja actividad metalofosfoesterasa (*in vitro*) puede jugar un papel importante en el desarrollo del SNC (Shen et al., 2016).

Los resultados de las pruebas de enriquecimiento arrojaron una sobrerrepresentación significativa para las categorías de procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares. Entre los 10 principales procesos biológicos con resultados de enriquecimiento podemos destacar algunos importantes como regulación negativa de la expresión génica (GO: 0010629), proceso homeostático (GO: 0042592) y regulación positiva de la actividad catalítica (GO: 0043085). Y entre las 10 funciones moleculares con mayores resultados de enriquecimiento encontramos funciones de unión fundamentalmente: unión de nucleótidos de purina (GO: 0017076), unión de ribonucleótidos (GO: 0032553), regulador de función molecular (GO: 0098772), unión de fármacos (GO: 0008144) y unión de ARN (GO: 0003723).

Nuestro trabajo presenta una serie de limitaciones entre las que podemos mencionar el tamaño de la muestra. Tan solo fueron analizados 32 sujetos, por lo tanto, para poder obtener un estudio más robusto estadísticamente hablando, sería beneficioso repetir la

investigación en una muestra de mayor tamaño, o validar los resultados obtenidos en otra muestra de similares características.

Como conclusión se puede afirmar que hemos identificado cambios epigenéticos en ambas poblaciones trans, después de seis meses de GAHT que afectaron a genes relacionados con procesos cruciales del desarrollo del sistema nervioso central. En las poblaciones de hombres y mujeres trans, seis meses de GAHT provocó una disminución significativa en el grado de metilación. Estos cambios de metilación ocurrieron en 70 islas CpG que fueron compartidas en hombres y mujeres trans. Por tanto, nuestros datos avalan la hipótesis de que el GAHT modifica el metiloma de la población con IG.

6.CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Respecto al estudio del perfil de metilación del fragmento RIII de la región promotora del receptor de estrógenos α , se pudo concluir:

1. Existe un patrón de metilación sexualmente diferente, tanto en la población cis como en la trans, antes y después del GAHT. En la población cis, este fragmento está más densamente metilado en hombres que en mujeres, mientras que en la población trans el grado de metilación es mayor en mujeres que en hombres.

2. La población trans mostró un perfil de metilación característico del RIII, diferente al de la población cis, tanto antes del GAHT como después.

2.1. Antes del GAHT, la población trans de mujeres mostró un grado de metilación intermedio entre ambas poblaciones cis, mayor que el de las mujeres, pero menor que el de los varones. Sin embargo, la población trans masculina mostró el grado de metilación más bajo del resto de poblaciones.

2.2. Después de seis meses de GAHT, tanto los hombres como las mujeres trans incrementaron el grado de metilación en este fragmento, alcanzando niveles intermedios de metilación entre los hombres y las mujeres cis.

2.3. En la población masculina se produjo un incremento significativo del grado de metilación, mientras que en la población femenina este incremento fue más moderado.

Respecto al estudio de metilación CpG del ADN global mediante microarray, se pudo concluir:

3. Las poblaciones cis y trans presentan diferencias estadísticamente significativas en su metiloma antes del GAHT.

4. Cuando se compararon las poblaciones según el sexo biológico, en la población trans de mujeres se encontró un mayor número de cambios significativos que en la población trans de hombres.

5. En la población trans de mujeres, entre los sitios CpG con mayor significación estadística, al menos se encontraron cuatro genes implicados en la neurogénesis y el desarrollo cerebral: *SLC6A20*, *PLEKHA5*, *NHLH1* and *MPPED2*. Mientras que en la población trans de hombres se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los CpGs cg23944405 y cg27158490, relacionados con los genes *MPPED2* y *NEK1*. El gen *MPPED2* juega un papel importante en los procesos de diferenciación neuronal durante la etapa embrionaria, mientras que el gen *NEK1* está involucrado en la regulación del ciclo celular y juega un papel fundamental en el desarrollo axonal y dendrítico.

6. El GAHT durante seis meses modificó el metiloma en ambas poblaciones trans.

7. En ambas poblaciones trans el GAHT indujo una reducción significativa de la metilación en 69 islas CpGs que fueron compartidas por ambas poblaciones trans.

8. Nuestros datos apoyan la hipótesis de que el GAHT modifica el metiloma en personas con incongruencia de género.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Akk, G., Bracamontes, J. R., Covey, D. F., Evers, A., Dao, T., & Steinbach, J. H. (2004). Neuroactive steroids have multiple actions to potentiate GABAA receptors. *The Journal of Physiology*, 558(1), 59–74. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.066571>
- Alam, R., Abdolmaleky, H. M., & Zhou, J. R. (2017). Microbiome, inflammation, epigenetic alterations, and mental diseases. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 174(6), 651–660. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32567>
- Albensi, B. C., & Mattson, M. P. (2000). Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse (New York, N.Y.)*, 35(2), 151–159. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(200002\)35:2<151::AID-SYN8>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(200002)35:2<151::AID-SYN8>3.0.CO;2-P)
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed. DSM-5*. Washington, DC.
- American Psychological Association. (2012). Guidelines for psychological practice with lesbian, gay, and bisexual clients. *The American Psychologist*, 67(1), 10–42. <https://doi.org/10.1037/a0024659>
- Aranda, G., Fernández-Rebollo, E., Pradas-Juni, M., Hanzu, F. A., Kalko, S. G., Halperin, I., & Mora, M. (2017). Effects of sex steroids on the pattern of methylation and expression of the promoter region of estrogen and androgen receptors in people with gender dysphoria under cross-sex hormone treatment. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 172, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.05.010>
- Arnold, A. P. (2009). The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Hormones and Behavior*, 55(5), 570–578. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.03.011>
- Asada, H., Yamagata, Y., Taketani, T., Matsuoka, A., Tamura, H., Hattori, N., ... Sugino, N. (2008). Potential link between estrogen receptor-alpha gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Molecular Human Reproduction*, 14(9), 539–545.

<https://doi.org/10.1093/molehr/gan045>

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. (n.d.). Retrieved from <http://atlasgeneticsoncology.org>

Audí Parera, L., Azcona San Julián, C., Barreiro Conde, J., Bermúdez de la Vega, J. A., Carcavilla Urquí, A., Castaño González, L. A., ... Guerrero-Fernández, J. (2019). Anomalías del desarrollo sexual. Desarrollo sexual diferente. *Protoc Diagn Ter Pediatr*, 1, 1–19.

Auger, A. P., Jessen, H. M., & Edelman, M. N. (2011). Epigenetic organization of brain sex differences and juvenile social play behavior. *Hormones and Behavior*, 59(3), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.017>

Avery, O. T., Macleod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus Type III. *The Journal of Experimental Medicine*, 79(2), 137–158. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>

Aylwin, C. F., Toro, C. A., Shirtcliff, E., & Lomniczi, A. (2019). Emerging Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Pubertal Maturation in Adolescence. *Journal of Research on Adolescence: The Official Journal of the Society for Research on Adolescence*, 29(1), 54–79. <https://doi.org/10.1111/jora.12385>

Bae, M., Roh, J. D., Kim, Y., Kim, S. S., Han, H. M., Yang, E., ... Kim, E. (2021). SLC6A20 transporter: a novel regulator of brain glycine homeostasis and NMDAR function. *EMBO Molecular Medicine*, 13(2), e12632. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012632>

Baker-Andresen, D., Flavell, C. R., Li, X., & Bredy, T. W. (2013). Activation of BDNF signaling prevents the return of fear in female mice. *Learning & Memory*, 20(5), 237–240. <https://doi.org/10.1101/lm.029520.112>

Bakker, J. (2018). The sexual differentiation of the human brain: role of sex hormones versus sex chromosomes. In L. Coolen & D. Grattan (Eds.), *Neuroendocrine*

- Regulation of Behavior. Current Topics in Behavioral Neurosciences*, vol 43 (pp. 45–67). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/7854_2018_70
- Balthazart, J., Absil, P., Gérard, M., Appeltants, D., & Ball, G. F. (1998). Appetitive and consummatory male sexual behavior in Japanese quail are differentially regulated by subregions of the preoptic medial nucleus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(16), 6512–6527. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-16-06512.1998>
- Batie, M., & Rocha, S. (2020). Gene transcription and chromatin regulation in hypoxia. *Biochemical Society Transactions*, 48(3), 1121–1128. <https://doi.org/10.1042/BST20191106>
- Baulieu, E.-E., & Robel, P. (1990). Neurosteroids: A new brain function? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3), 395–403. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(90\)90490-C](https://doi.org/10.1016/0960-0760(90)90490-C)
- Beek, T. F., Cohen-Kettenis, P. T., & Kreukels, B. P. C. (2016). Gender incongruence/gender dysphoria and its classification history. *International Review of Psychiatry*, 28(1), 5–12. <https://doi.org/10.3109/09540261.2015.1091293>
- Bewley, S., Clifford, D., McCartney, M., & Byng, R. (2019). Gender incongruence in children, adolescents, and adults. *The British Journal of General Practice: The Journal of the Royal College of General Practitioners*, 69(681), 170–171. <https://doi.org/10.3399/bjgp19X701909>
- Beyenburg, S., Stoffel-Wagner, B., Bauer, J., Watzka, M., Blümcke, I., Bidlingmaier, F., & Elger, C. E. (2001). Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Research*, 44(2–3), 141–153. [https://doi.org/10.1016/s0920-1211\(01\)00194-2](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(01)00194-2)
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., ... Shen, R. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.007>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>

- Björnström, L., & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology*, *19*(4), 833–842. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
- Bošković, A., & Rando, O. J. (2018). Transgenerational epigenetic inheritance. *Annual Review of Genetics*, *52*, 21–41. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031404>
- Carrer, H. F., & Aoki, A. (1982). Ultrastructural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of ovariectomized rats after estrogen treatment. *Brain Research*, *240*(2), 221–233. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90218-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90218-9)
- Cavagnari, B. M. (2012). [Regulation of gene expression: how do epigenetic mechanisms work]. *Archivos argentinos de pediatria*, *110*(2), 132–136. <https://doi.org/10.5546/aap.2012.132>
- Charlier, T. D. (2009). Importance of steroid receptor coactivators in the modulation of steroid action on brain and behavior. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(Suppl 1), S20–29. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.05.004>
- Charlier, T. D., Seredynski, A. L., Niessen, N.-A., & Balthazart, J. (2013). Modulation of testosterone-dependent male sexual behavior and the associated neuroplasticity. *General and Comparative Endocrinology*, *190*, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.003>
- Cohen, R. S., & Pfaff, D. W. (1981). Ultrastructure of neurons in the ventromedial nucleus or the hypothalamus in ovariectomized rats with or without estrogen treatment. *Cell and Tissue Research*, *217*(3), 451–470. <https://doi.org/10.1007/bf00219357>
- Cokus, S. J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C. D., ... Jacobsen, S. E. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, *452*(7184), 215–219. <https://doi.org/10.1038/nature06745>
- Colizzi, M., Costa, R., Scaramuzzi, F., Palumbo, C., Tyropani, M., Pace, V., ... Todarello, O. (2015). Concomitant psychiatric problems and hormonal treatment induced metabolic syndrome in gender dysphoria individuals: a 2 year follow-up study.

- Journal of Psychosomatic Research*, 78(4), 399–406.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2015.02.001>
- Compagnone, N. A., & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(1), 1–56.
<https://doi.org/10.1006/frne.1999.0188>
- Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., & Hess, R. A. (2017). Estrogens in Male Physiology. *Physiological Reviews*, 97(3), 995–1043.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>
- Cortés-Cortés, J. (2019). *Vulnerabilidad genética de la transexualidad. Análisis de una población española* (Universidade da Coruña).
- <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15284.19844>.
- Cortés-Cortés, J., Fernández, R., Teijeiro, N., Gómez-Gil, E., Esteva, I., Almaraz, M. C., ... Pásaro, E. (2017). Genotypes and haplotypes of the estrogen receptor α gene (ESR1) are associated with Female-to-Male gender dysphoria. *The Journal of Sexual Medicine*, 14(3), 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2016.12.234>
- Dall’Aglío, L., Muka, T., Cecil, C. A. M., Bramer, W. M., Verbiest, M. M. P. J., Nano, J., ... Tiemeier, H. (2018). The role of epigenetic modifications in neurodevelopmental disorders: A systematic review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 94, 17–30.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.07.011>
- de Vries, G. J., Jardon, M., Reza, M., Rosen, G. J., Immerman, E., & Forger, N. G. (2008). Sexual differentiation of vasopressin innervation of the brain: cell death versus phenotypic differentiation. *Endocrinology*, 149(9), 4632–4637.
<https://doi.org/10.1210/en.2008-0448>
- Denny, S. K., Yang, D., Chuang, C.-H., Brady, J. J., Lim, J. S., Grüner, B. M., ... Winslow, M. M. (2016). Nfib promotes metastasis through a widespread increase in chromatin accessibility. *Cell*, 166(2), 328–342.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.052>
- Díaz-Hernández, V., & Merchant-Larios, H. (2017). Consideraciones generales en el

- establecimiento del sexo en mamíferos. *TIP*, 20(1), 27–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.11.003>.
- DonCarlos, L. L. (1996). Developmental profile and regulation of estrogen receptor (ER) mRNA expression in the preoptic area of prenatal rats. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 94(2), 224–233. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(96\)00067-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(96)00067-3)
- Draghici, S. (2012). *Statistics and Data Analysis for Microarrays Using R and Bioconductor* (Second). London, UK: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Drescher, J., Cohen-Kettenis, P., & Winter, S. (2012). Minding the body: situating gender identity diagnoses in the ICD-11. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, 24(6), 568–577. <https://doi.org/10.3109/09540261.2012.741575>
- Du, P., Zhang, X., Huang, C.-C., Jafari, N., Kibbe, W. A., Hou, L., & Lin, S. M. (2010). Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*, 11, 587. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-587>
- du Prel, J.-B., Röhrig, B., Hommel, G., & Blettner, M. (2010). Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Deutsches Arzteblatt International*, 107(19), 343–348. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0343>
- Eisele, S. C., Gill, C. M., Shankar, G. M., & Brastianos, P. K. (2015). PLEKHA5: A key to unlock the blood-brain barrier? *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(9), 1978–1980. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2604>
- Eyster, K. M. (2016). The estrogen receptors : An overview from different perspectives. *Methods in Molecular Biology*, 1366, 1–10. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3127-9>
- Fan, G., Beard, C., Chen, R. Z., Csankovszki, G., Sun, Y., Siniaia, M., ... Jaenisch, R. (2001). DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society*

- for Neuroscience*, 21(3), 788–797. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-03-00788.2001>
- Fane, M., Harris, L., Smith, A. G., & Piper, M. (2017). Nuclear factor one transcription factors as epigenetic regulators in cancer. *International Journal of Cancer*, 140(12), 2634–2641. <https://doi.org/10.1002/ijc.30603>
- Fernández, R., Cortes-Cortes, J., Esteva, I., Gomez-Gil, E., Lema, E., Mallo, M., ... Pásaro, E. (2015). A cytogenetic and molecular study of transsexualism. *20th International Chromosome Conference (ICC)*.
- Fernández, R., Cortés-Cortés, J., Gómez-Gil, E., Esteva de Antonio, I., Almaraz, M. C., Guillamón, A., & Pásaro, E. (2016). The CYP17-MspA1 rs743572 polymorphism is not associated with gender dysphoria. *Genes & Genomics*, 38(12), 1145–1150. <https://doi.org/10.1007/s13258-016-0456-9>
- Fernández, R., Delgado-Zayas, E., Ramírez, K., Cortés-Cortés, J., Gómez-Gil, E., Esteva, I., ... Pásaro, E. (2020). Analysis of four polymorphisms located at the promoter of the estrogen receptor alpha ESR1 gene in a population with gender incongruence. *Sexual Medicine*, 8, 490-500. <https://doi.org/10.1016/j.esxm.2020.04.002>
- Fernández, R., Esteva, I., Gómez-Gil, E., Rumbo, T., Almaraz, M. C., Roda, E., ... Pásaro, E. (2014a). The (CA)_n polymorphism of ER β gene is associated with FtM transsexualism. *The Journal of Sexual Medicine*, 11(3), 720–728. <https://doi.org/10.1111/jsm.12398>
- Fernández, R., Esteva, I., Gómez-Gil, E., Rumbo, T., Almaraz, M., Roda, E., ... Pásaro, E. (2014b). Association study of ER β , AR, and CYP19A1 genes and MtF transsexualism. *The Journal of Sexual Medicine*, 11(12), 2986–2994. <https://doi.org/10.1111/jsm.12673>
- Fernández, R., Guillamon, A., Cortés-Cortés, J., Gómez-Gil, E., Jácome, A., Esteva, I., ... Pásaro, E. (2018). Molecular basis of gender dysphoria: androgen and estrogen receptor interaction. *Psychoneuroendocrinology*, 98, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.032>

- Fernández, R., Guillamón, A., Cortés-Cortés, J., Gómez-Gil, E., Jacome, A., Esteva, I., ... Pásaro, E. (2018). Molecular basis of gender: androgen and estrogen receptor interaction. *Psychoneuroendocrinology*, *98*, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.032>
- Fernández, R., Ramírez, K., Delgado-Zayas, E., Gómez-Gil, E., Esteva, I., Guillamon, A., & Pásaro, E. (2021). An analysis of the role of estrogens and the receptor coactivators in the basis of gender incongruence. In D. I. Kostoglou-Athanassiou (Ed.), *Psychoneuroendocrinology* (pp. 1–22). <https://doi.org/10.5772/intechopen.96668>
- Filová, B., Ostatníková, D., Celec, P., & Hodosy, J. (2013). The effect of testosterone on the formation of brain structures. *Cells, Tissues, Organs*, *197*(3), 169–177. <https://doi.org/10.1159/000345567>
- Flanagan, J. M. (2015). Epigenome-wide association studies (EWAS): past, present, and future. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1238*, 51–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_3
- Foreman, M., Hare, L., York, K., Balakrishnan, K., Sánchez, F. J., Harte, F., ... Harley, V. R. (2019). Genetic link between gender dysphoria and sex hormone signaling. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *104*(2), 390–396. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-01105>
- Frenkel, S., Bernstein, C. N., Sargent, M., Kuang, Q., Jiang, W., Wei, J., ... Hu, P. (2019). Genome-wide analysis identifies rare copy number variations associated with inflammatory bowel disease. *PloS One*, *14*(6), e0217846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217846>
- Fu, Y., Dominissini, D., Rechavi, G., & He, C. (2014). Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation. *Nature Reviews. Genetics*, *15*(5), 293–306. <https://doi.org/10.1038/nrg3724>
- Garcia-Falgueras, A., Pinos, H., Fernández, R., Collado, P., Pasaro, E., Segovia, S., & Guillamon, A. (2006). Sexual dimorphism in hybrids rats. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.053>

- García-Segura, L. M., Pérez, J., Jones, E., & Naftolin, F. (1991). Loss of sexual dimorphism in rat arcuate nucleus neuronal membranes with reproductive aging. *Experimental Neurology*, *112*(1), 125–128. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(91\)90122-S](https://doi.org/10.1016/0014-4886(91)90122-S)
- Gómez-Gil. (2019). Disforia de género. In *Manual de Sexología Clínica* (p. 400). Editorial Médica Panamericana.
- Gómez-Gil, E., Esteva de Antonio, I., Fernández Rodríguez, M., Almaraz Almaraz, M., Hurtado Murillo, F., Gómez Balaguer, M., ... Gidseen, G. (2020). [New care models for transgender people in the Spanish Health System: demands, controversies and reflections.]. *Revista española de salud pública*, *94*, e1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202330>.
- Gómez-Gil, E., Esteva, I., Almaraz, M. C., Pasaro, E., Segovia, S., & Guillamon, A. (2010). Familiarity of gender identity disorder in non-twin siblings. *Archives of Sexual Behavior*, *39*(2), 546–552. <https://doi.org/10.1007/s10508-009-9524-4>
- Gómez-Gil, E., Esteva, I., Carrasco, R., Almaraz, M. C., Pasaro, E., Salamero, M., & Guillamon, A. (2011). Birth order and ratio of brothers to sisters in Spanish transsexuals. *Archives of Sexual Behavior*, *40*(3), 505–510. <https://doi.org/10.1007/s10508-010-9614-3>
- Gómez-Gil, E., Flo, M., Fernández, R., Esteva, I., & Gómez-Gil, F. J. (2020). Spanish research in gender dysphoria: A review of more than 20 years of biomedical literature. *Actas Espanolas de Psiquiatria*, *48*(6), 271–286.
- Guillamón, A., Junque, C., & Gómez-Gil, E. (2016). A review of the status of brain structure research in transsexualism. *Archives of Sexual Behavior*, *45*(7), 1615–1648. <https://doi.org/10.1007/s10508-016-0768-5>
- Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., Ball, M. P., Jang, M.-H., Bonaguidi, M. A., ... Song, H. (2011). Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nature Neuroscience*, *14*(10), 1345–1351. <https://doi.org/10.1038/nn.2900>
- Hare, L., Bernard, P., Sánchez, F. J. J., Baird, P. N. N., Vilain, E., Kennedy, T., & Harley,

- V. R. R. (2009). Androgen receptor repeat length polymorphism associated with male-to-female transsexualism. *Biological Psychiatry*, 65(1), 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.08.033>
- Henningsson, S., Westberg, L., Nilsson, S., Lundstrom, B., Ekselius, L., Bodlund, O., ... Landen, M. (2005). Sex steroid-related genes and male-to-female transsexualism. *Psychoneuroendocrinology*, 30(7), 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.02.006>
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042–2054. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>
- Hines, M. (2020). Neuroscience and sex/gender: Looking back and forward. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 40(1), 37–43. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0750-19.2019>
- Huang, W. C., Bennett, K., & Gregg, C. (2018). Epigenetic and cellular diversity in the brain through allele-specific effects. *Trends in Neurosciences*, 41(12), 925–937. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.07.005>
- Illingworth, R. S., & Bird, A. P. (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Letters*, 583(11), 1713–1720. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>
- Ji, C., Zhao, H., Li, D., Sun, H., Hao, J., Chen, R., ... Zhao, Y. G. (2020). Role of Wdr45b in maintaining neural autophagy and cognitive function. *Autophagy*, 16(4), 615–625. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1632621>
- Joel, D, Berman, Z., Tavor, I., Wexler, N., Gaber, O., Stein, Y., ... Assaf, Y. (2015). Sex beyond the genitalia : The human brain mosaic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1509654112>
- Joel, Daphna. (2021). Beyond the binary: Rethinking sex and the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 122, 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.11.018>

- Joel, Daphna, Garcia-Falgueras, A., & Swaab, D. (2020). The complex relationships between sex and the brain. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 26(2), 156–169. <https://doi.org/10.1177/1073858419867298>
- Joel, Daphna, & McCarthy, M. M. (2017). Incorporating sex as a biological variable in neuropsychiatric research: where are we now and where should we be? *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(2), 379–385. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.79>
- Kang, J. G., Park, J. S., Ko, J.-H., & Kim, Y.-S. (2019). Regulation of gene expression by altered promoter methylation using a CRISPR/Cas9-mediated epigenetic editing system. *Scientific Reports*, 9(1), 11960. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48130-3>
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Research*, 12(6), 996–1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
- Kiyar, M., Collet, S., T'Sjoen, G., & Mueller, S. (2020). Neuroscience in transgender people: an update. *Neuroforum*, 2(26). <https://doi.org/10.1515/nf-2020-0007>
- Kmieczyk, V., Riechert, E., Kalinski, L., Boileau, E., Malovrh, E., Malone, B., ... Völkers, M. (2019). m(6)A-mRNA methylation regulates cardiac gene expression and cellular growth. *Life Science Alliance*, 2(2). <https://doi.org/10.26508/lsa.201800233>
- Knoedler, J. R., & Shah, N. M. (2018). Molecular mechanisms underlying sexual differentiation of the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 53, 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.09.005>
- Konkle, A. T. M., & McCarthy, M. M. (2011). Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology*, 152(1), 223–235. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0607>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

- Kraus, W. L. E. E., Manning, E. T., & Kadonaga, J. T. (1999). Biochemical analysis of distinct activation functions in p300 that enhance transcription initiation with chromatin templates. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(12), 8123–8135. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.12.8123>
- Kreukels, B. P. C., & Guillamon, A. (2016). Neuroimaging studies in people with gender incongruence. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, 1–9. <https://doi.org/10.3109/09540261.2015.1113163>
- Kumaki, Y., Oda, M., & Okano, M. (2008). QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, *36*((Web Server issue)), W170–175. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn294>
- Kurian, J. R., Olesen, K. M., & Auger, A. P. (2010). Sex differences in epigenetic regulation of the estrogen receptor- α promoter within the developing preoptic area. *Endocrinology*, *151*(5), 2297–2305. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0649>
- Lephart, E. D., Lund, T. D., & Horvath, T. L. (2001). Brain androgen and progesterone metabolizing enzymes: biosynthesis, distribution and function. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *37*(1–3), 25–37. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00111-4](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00111-4)
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, *128*(4), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E. J., Shi, Z., & Zhang, B. (2019). WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W199–W205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz401>
- Liguori, L., Andolfo, I., de Antonellis, P., Aglio, V., di Dato, V., Marino, N., ... Zollo, M. (2012). The metallophosphodiesterase Mpped2 impairs tumorigenesis in neuroblastoma. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *11*(3), 569–581. <https://doi.org/10.4161/cc.11.3.19063>
- Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., ... Ecker, J. R. (2013). Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*, *341*(6146), 1237905. <https://doi.org/10.1126/science.1237905>

- Logue, M. W., Miller, M. W., Wolf, E. J., Huber, B. R., Morrison, F. G., Zhou, Z., ... Verfaellie, M. (2020). An epigenome-wide association study of posttraumatic stress disorder in US veterans implicates several new DNA methylation loci. *Clinical Epigenetics*, *12*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-0820-0>
- López, A. J., Hecking, J. K., & White, A. O. (2020). The emerging role of ATP-dependent chromatin remodeling in memory and substance use disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186816>
- López, A. J., & Wood, M. A. (2015). Role of nucleosome remodeling in neurodevelopmental and intellectual disability disorders. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *9*, 100. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00100>
- Lu, H., Chen, D., Hu, L.-P., Zhou, L.-L., Xu, H.-Y., Bai, Y.-H., & Lin, X.-Y. (2014). Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk: a case-control study with meta-analysis combined. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, *14*(11), 6743–6749. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.11.6743>
- Lunnon, K., Smith, R., Hannon, E., De Jager, P. L., Srivastava, G., Volta, M., ... Mill, J. (2014). Methylomic profiling implicates cortical deregulation of ANK1 in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, *17*(9), 1164–1170. <https://doi.org/10.1038/nn.3782>
- Maekawa, R., Sato, S., Okada, M., Lee, L., Tamura, I., Jozaki, K., ... Sugino, N. (2016). Tissue-specific expression of estrogen receptor 1 is regulated by DNA methylation in a T-DMR. *Molecular Endocrinology*, *30*(3), 335–347. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1058>
- Marrocco, J., & McEwen, B. S. (2016). Sex in the brain: hormones and sex differences. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *18*(4), 373–383. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.4/jmarrocco>
- Maurano, M. T., Wang, H., John, S., Shafer, A., Canfield, T., Lee, K., & Stamatoyannopoulos, J. A. (2015). Role of DNA methylation in modulating transcription factor occupancy. *Cell Reports*, *12*(7), 1184–1195. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.024>

- McCarthy, M. (2008). Estradiol and the developing brain. *Physiological Reviews*, 88(1), 91–124. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2007>
- McCarthy, M.M. (2019). A new view of sexual differentiation of mammalian brain. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. <https://doi.org/10.1007/s00359-019-01376-8>
- McCarthy, M M, Davis, A. M., & Mong, J. A. (1997). Excitatory neurotransmission and sexual differentiation of the brain. *Brain Research Bulletin*, 44(4), 487–495. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(97\)00230-x](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(97)00230-x)
- McCarthy, M, Schlenker, E., & Pfaff, D. (1993). Enduring consequences of neonatal treatment with antisense oligodeoxynucleotides to estrogen receptor messenger ribonucleic acid on sexual differentiation of rat brain. *Endocrinology*, 133(2), 433–439. <https://doi.org/10.1210/endo.133.2.8344188>
- McCarthy, Margaret, Herold, K., & Stockman, S. (2018). Fast, furious and enduring: Sensitive versus critical periods in sexual differentiation of the brain. *Physiology & Behavior*, 187, 13—19. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.030>
- McCarthy, Margaret M. (2009). The two faces of estradiol: effects on the developing brain. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 15(6), 599–610. <https://doi.org/10.1177/1073858409340924>
- McCarthy, Margaret M. (2016). Sex differences in the developing brain as a source of inherent risk. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(4), 361–372. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.4/mmccarthy>
- McCarthy, Margaret M, & Arnold, A. P. (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nature Neuroscience*, 14(6), 677–683. <https://doi.org/10.1038/nn.2834>
- McCarthy, Margaret M, & Konkle, A. T. M. (2005). When is a sex difference not a sex difference? *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26(2), 85–102. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.06.001>
- McCarthy, Margaret M, Nugent, B. M., & Lenz, K. M. (2017). Neuroimmunology and

- neuroepigenetics in the establishment of sex differences in the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(8), 471–484. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.61>
- McCarty, M., & Avery, O. T. (1946). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal Types: II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *The Journal of Experimental Medicine*, 83(2), 89–96.
- Métivier, R., Penot, G., Hübner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., & Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, 115(6), 751–763. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00934-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00934-6)
- Meyer, G., Boczek, U., & Bojunga, J. (2020). Hormonal gender reassignment treatment for gender dysphoria. *Deutsches Arzteblatt International*, 117(43), 725–732. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2020.0725>
- Michels, K. B., Binder, A. M., Dedeurwaerder, S., Epstein, C. B., Grealley, J. M., Gut, I., ... Irizarry, R. A. (2013). Recommendations for the design and analysis of epigenome-wide association studies. *Nature Methods*, 10(10), 949–955. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2632>
- Minchin, S., & Lodge, J. (2019). Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry*, 63(4), 433–456. <https://doi.org/10.1042/EBC20180038>
- Molenda, H. A., Griffin, A. L., Auger, A. P., McCarthy, M. M., & Tetel, M. J. (2002). Nuclear receptor coactivators modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats. *Endocrinology*, 143(2), 436–444. <https://doi.org/10.1210/endo.143.2.8659>
- Mongelli, A., Atlante, S., Bachetti, T., Martelli, F., Farsetti, A., & Gaetano, C. (2020). Epigenetic signaling and RNA regulation in cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020509>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function.

Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 38(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

Moran, S., Arribas, C., & Esteller, M. (2016). Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*, 8(3), 389–399. <https://doi.org/10.2217/epi.15.114>

Mueller, S. C., Guillamon, A., Zubiaurre-Elorza, L., Junque, C., Gomez-Gil, E., Uribe, C., ... Luders, E. (2021). The neuroanatomy of transgender identity: mega-analytic findings from the ENIGMA transgender persons working group. *Journal of Sexual Medicine, In press*.

Nguyen, H. B., Loughhead, J., Lipner, E., Hantsoo, L., Kornfield, S. L., & Epperson, C. N. (2019). What has sex got to do with it? The role of hormones in the transgender brain. *Neuropsychopharmacology*, Vol. 44, pp. 22–37. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0140-7>

Nugent, B. M., Wright, C. L., Shetty, A. C., Hodes, G. E., Lenz, K. M., Mahurkar, A., ... McCarthy, M. M. (2015). Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nature Neuroscience*, 18(5), 690–697. <https://doi.org/10.1038/nn.3988>

Phoenix, C. H., Goy, R. W., Gerall, A. A., & Young, W. C. (1959). Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, 65(3), 369–382. <https://doi.org/10.1210/endo-65-3-369>

Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>

Prado, F., Jimeno-González, S., & Reyes, J. C. (2017). Histone availability as a strategy to control gene expression. *RNA Biology*, 14(3), 281–286. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1189071>

Ramírez, K., Fernández, R., Delgado-Zayas, E., Gómez-Gil, E., Esteva, I., Guillamón, A., & Pásaro, E. (2021). Implications of the estrogen receptor coactivators SRC1 and

- SRC2 in the biological basis of gender incongruence. *Sexual Medicine*, 9(3), XXX–XXX. <https://doi.org/10.1016/j.esxm.2021.100368>
- Raychaudhuri, B., & Vogelbaum, M. A. (2011). IL-8 is a mediator of NF- κ B induced invasion by gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 101(2), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0261-2>
- Razin, A., & Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiological Reviews*, 55(3), 451–458.
- Reddy, D. S. (2010). Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Progress in Brain Research*, 186, 113–137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7>
- Reiter, F., Wienerroither, S., & Stark, A. (2017). Combinatorial function of transcription factors and cofactors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 43, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.12.007>
- Robles, R. G., Ayala Ramírez, P., & Perdomo Velásquez, S. P. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Revista Ciencias de La Salud*, 10(1), 59–71.
- Salinas, R. D., Connolly, D. R., & Song, H. (2020). Invited review: Epigenetics in neurodevelopment. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 46(1), 6–27. <https://doi.org/10.1111/nan.12608>
- Sánchez-Álvarez, J., & Acevedo-Toro, P. (2015). Principales herramientas epigenéticas para el diagnóstico y seguimiento de neoplasias hematológicas. *Medicina & Laboratorio*, 21(1–2), 43–62.
- Sánchez, FJ and Vilain, E. (2010). Genes and brain sex differences. In S. editor Ivanka (Ed.), *Sex Differences in the Human Brain. Their Underpinnings and Implications* (pp. 63–76). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00005-1>
- Schwartz, N., Verma, A., Bivens, C. B., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. (2016). Biochimica et biophysica acta rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *BBA -*

Molecular Cell Research, 1863(9), 2289–2298.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.004>

Schwarz, J. M., Nugent, B. M., & McCarthy, M. M. (2010). Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology*, 151(10), 4871–4881.
<https://doi.org/10.1210/en.2010-0142>

Segovia, S., Guillamón, A., del Cerro, M. C., Ortega, E., Pérez-Laso, C., Rodríguez-Zafra, M., & Beyer, C. (1999). The development of brain sex differences: A multisignaling process. *Behavioural Brain Research*, 105(1), 69–80. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(99\)00083-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(99)00083-2)

Shen, L., Liu, L., Ge, L., Xie, L., Liu, S., Sang, L., ... Li, H. (2016). miR-448 downregulates MPPED2 to promote cancer proliferation and inhibit apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(4), 2747–2752. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3659>

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., ... Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240–244. <https://doi.org/10.1038/346240a0>

Sindhu, C., Samavarchi-Tehrani, P., & Meissner, A. (2012). Transcription factor-mediated epigenetic reprogramming. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(37), 30922–30931. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.319046>

Stoller, R. J. (1964). Gender-role change in intersexed patients. *JAMA*, 188, 684–685.
<https://doi.org/10.1001/jama.1964.03060330064020>

Suppakitjanusant, P., Ji, Y., Stevenson, M. O., Chantrapanichkul, P., Sineath, R. C., Goodman, M., ... Tangpricha, V. (2020). Effects of gender affirming hormone therapy on body mass index in transgender individuals: A longitudinal cohort study. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 21, 100230.
<https://doi.org/10.1016/j.jcte.2020.100230>

- Uribe, C., Junque, C., Gómez-Gil, E., Abos, A., Mueller, S. C., & Guillamon, A. (2020). Brain network interactions in transgender individuals with gender incongruence. *NeuroImage*, *211*, 116613. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.116613>
- Wählin-Jacobsen, S., Flanagan, J. N., Pedersen, A. T., Kristensen, E., Arver, S., & Giraldi, A. (2018). Androgen receptor polymorphism and female sexual function and desire. *J Sex Med*, *15*, 1537–1546. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2018.09.013>
- Ware, M., Hamdi-Rozé, H., Le Fricc, J., David, V., & Dupé, V. (2016). Regulation of downstream neuronal genes by proneural transcription factors during initial neurogenesis in the vertebrate brain. *Neural Development*, *11*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13064-016-0077-7>
- Wei, Y.-C., Wang, S.-R., & Xu, X.-H. (2017). Sex differences in brain-derived neurotrophic factor signaling: Functions and implications. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(1–2), 336–344. <https://doi.org/10.1002/jnr.23897>
- World Health Organization. (2018). *The ICD-11. International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics Eleventh Revision*. <https://doi.org/https://icd.who.int/>
- Xie, H., Yuan, C., Li, J.-J., Li, Z.-Y., & Lu, W.-C. (2021). Potential molecular mechanism of TNF superfamily-related genes in glioblastoma multiforme based on transcriptome and epigenome. *Frontiers in Neurology*, *12*, 576382. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.576382>
- Yamada, K., Nomura, N., Yamano, A., Yamada, Y., & Wakamatsu, N. (2012). Identification and characterization of splicing variants of PLEKHA5 (Plekha5) during brain development. *Gene*, *492*(1), 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.018>
- Yi, P., Wang, Z., Chiu, W., Malley, B. W. O., Yi, P., Wang, Z., ... Ludtke, S. J. (2015). Structure of a biologically active estrogen receptor-coactivator complex on DNA. *Molecular Cell*, *57*, 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.025>
- Zhang, Lian, Lu, Q., & Chang, C. (2020). Epigenetics in health and disease. In C. Chang &

Q. Lu (Eds.), *Epigenetics in Allergy and Autoimmunity* (pp. 3–55).
https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1

Zhang, Limei, Neme-Bechara, V., Escobar, A., & Irlles, C. (2013). [Are xenoestrogens already impacting our human social structure?]. *Gaceta medica de Mexico*, 149(3), 325–333.

Zitzmann, M. (2006). Testosterone and the brain. *The Aging Male: The Official Journal of the International Society for the Study of the Aging Male*, 9(4), 195–199.
<https://doi.org/10.1080/13685530601040679>

Zucker, K. J. (2017). Epidemiology of gender dysphoria and transgender identity. *Sexual Health*, 14(5), 404–411. <https://doi.org/10.1071/SH17067>