

11262

2
2EJ



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Tesis para obtener el grado de Maestría en
Ciencias Médicas

**ESTUDIO DE LOS GENES 1 Y 2 DE LA 5 α -ESTEROIDE
REDUCTASA HUMANA EN PACIENTES CON
DEFICIENCIA PRIMARIA DE ESTA ENZIMA**

ALUMNA: ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

TUTOR: DR. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO
COTUTORES: M. en C. FELIPE VILCHIS URIBE
DR. OSVALDO MUTCHINICK BARINGOLTZ
DR. ALFREDO ULLOA - AGUIRRE

MEXICO, D.F. 1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS HERMANOS Y SOBRINOS

A MIS PADRES

A MIS AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta Tesis fue posible gracias a la invaluable ayuda del personal de la Unidad Metabólica Infantil del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, así como a los integrantes del laboratorio de Bioquímica Hormonal del Departamento de Biología de la Reproducción del mismo Instituto.

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| HIM: | Hormona Inhibidora de las Estructuras Müllarianas |
| T: | Testosterona |
| DHT: | Dihidrotestosterona |
| ADN: | Acido desoxirribonucleico |
| ADNc: | Acido desoxirribonucleico complementario |
| LH: | Hormona Luteinizante |
| ICAA: | Insensibilidad Completa a la Acción de los Andrógenos |
| PHM: | Pseudohermafroditismo masculino |
| PPSH: | Hipospadia Perineoescrotal con Pseudovagina |
| HCG: | Gonadotropina Coriónica Humana |
| aa: | Aminoácido |
| PCR: | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| SSCP: | Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN |
| INNSZ: | Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán |
| RIA: | Radioinmunoanálisis |
| TE: | Tris-EDTA |
| TBE: | Tris-base, ácido bórico y EDTA |
| dNTP's: | Desoxinucleótidos |
| G34P: | Glicina muta en el codón 34 a prolina |
| A207D: | Alanina muta en el codón 207 a ácido aspártico |
| P212R: | Prolina muta en el codón 212 a arginina |
| R227*: | Arginina muta en el codón 227 a un codón sin sentido |

INDICE

| | |
|---|-------|
| RESUMEN | 1-2 |
| INTRODUCCION | 3-14 |
| OBJETIVO E HIPOTESIS | 15 |
| SUJETOS | 16-20 |
| METODOS | 20-26 |
| Extracción de ADN | 21-22 |
| Southern blot | 22-23 |
| Reacción en Cadena de la Polimerasa | 23-24 |
| Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas | 24-25 |
| Secuenciación | 25-26 |
| RESULTADOS | 27-29 |
| DISCUSION | 30-36 |
| BIBLIOGRAFIA | 37-42 |

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | |
|----------------------|--|
| FIGURA 1 | Estructura del gen de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 2 | Mutaciones detectadas en el gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| TABLA 1 | Enzimas Tipo 1 y Tipo 2 de la 5 α -reductasa |
| TABLA 2 | Características clínicas de los pacientes con Deficiencia Primaria de 5 α -reductasa |
| TABLA 3 | Niveles hormonales en sangre de los pacientes con Deficiencia Primaria de 5 α -reductasa |
| TABLA 4 | Indices 5 β /5 α reducidos de los metabolitos urinarios de los pacientes con Deficiencia de 5 α -reductasa |
| FIGURA 3 | Genealogías de los pacientes con Deficiencia Primaria de 5 α -reductasa |
| FIGURAS 4 Y 5 | Southern blot del gen 1 de la 5 α -reductasa |
| FIGURA 6 | Reacción en Cadena de la Polimerasa del exón 4 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 7 | Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 2 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 8 | Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 1 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 9 | Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 4 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 10 | Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 4 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 11 | Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 1 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 12 | Secuenciación del exón 1 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 13 | Secuenciación del exón 4 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 14 | Secuenciación del exón 4 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 15 | Secuenciación del exón 4 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |
| FIGURA 16 | Secuenciación del exón 1 del gen 2 de la 5 α -reductasa Tipo 2 |

TABLA 5**Resumen de las mutaciones puntuales del gen de la 5 α -reductasa Tipo 2 en los pacientes con Deficiencia Primaria de la enzima**

RESUMEN

La deficiencia primaria de 5α -reductasa es una de las causas de PHM en el humano y representa la resistencia androgénica a nivel pre-receptor. La enzima 5α -reductasa es la responsable de convertir a la T en DHT. Al estar bloqueada la conversión de T a DHT, la cual es esencial para un desarrollo adecuado de los genitales externos en el feto masculino, los individuos afectados por esta entidad patológica presentarán: derivados Wolffianos, Müllerianos ausentes y generalmente testículos criptorquídicos bilaterales e hipospadia perineoescrotal con pseudovagina. Al nacimiento, debido a la presencia de un fenotipo primordialmente femenino, casi invariablemente se les otorga un sexo de asignación femenino.

Se ha demostrado mediante estudios farmacológicos y genéticos que existen dos enzimas diferentes con actividad de 5α -reductasa. La 5α -reductasa Tipo 2, representa la enzima específica expresada en tejidos andrógeno-dependientes en el humano. El gen que codifica su síntesis se encuentra en el cromosoma 2. La 5α -reductasa Tipo 1 codificada por un gen localizado en el cromosoma 5, bioquímicamente no presenta especificidad en tejidos andrógeno-dependientes. Diversos estudios moleculares del gen 2 realizados en 38 familias pertenecientes a 25 grupos étnicos diferentes, con diagnóstico comprobado de deficiencia primaria de 5α -reductasa, demostraron que el defecto enzimático era debido a una delección completa del gen (una familia) o mutaciones puntuales del mismo (35 familias). En 24 de éstas se documentaron mutaciones en sentido erróneo, otra fue secundaria a una alteración del sitio de corte y empalme, una más a una delección de un dinucleótido y la última a la presencia de un codón sin sentido.

En este trabajo, presentamos los hallazgos moleculares de 10 pacientes pertenecientes a 7 familias diferentes. El diagnóstico se estableció por el incremento de los índices T/DHT

y de los metabolitos $5\beta/5\alpha$ reducidos de los compuestos C19 y C21. Para el estudio molecular del gen 1 y del gen 2 se extrajo el ADN genómico de sangre periférica. La búsqueda de deleciones en el gen 1 de la 5α -reductasa se realizó con la técnica de Southern blot. Con el fin de descartar la presencia de deleciones y para la amplificación de los 5 exones del gen 2 de la 5α -reductasa Tipo 2, se utilizó la técnica de PCR. Para tratar de evidenciar en cual de los exones se encontraba cada mutación puntual específica, se llevó a cabo el estudio del SSCP del ADN. Con base en estos últimos estudios, los templados de ADN en los que se observaron alteraciones fueron secuenciados.

En ninguno de los sujetos afectados, se encontraron deleciones en el gen 1 de la 5α -reductasa. Tampoco se demostraron dichos rearrreglos en el gen 2. En los pacientes 1 y 8 se observaron alteraciones en la movilidad electroforética en el SSCP en el exón 1. En los otros 8 pacientes dicha alteración se detectó en el exón 4. Asimismo, se observó la presencia de polimorfismo en la migración de las cadenas sencillas del ADN para el exón 1. Posteriormente se procedió a secuenciar, en ambas direcciones, aquellos exones en los que presumiblemente se encontraban las mutaciones. Se demostró la existencia de 7 mutaciones con sentido erróneo y 2 mutaciones sin sentido. No se pudo encontrar la mutación del paciente 1.

En conclusión se pudo confirmar, que las mutaciones en el gen 2 de la 5α -reductasa humana, son las causantes de la deficiencia primaria de dicha enzima. No se pudo establecer correlación fenotipo-mutación salvo en que los sujetos con la existencia del codón de terminación prematuro presentaban un mayor grado de virilización al nacimiento que el resto de los pacientes. Asimismo, se demostró la existencia de un polimorfismo en el exón 1 del gen 2 de la 5α -reductasa.

INTRODUCCION

DIFERENCIACION SEXUAL NORMAL

La diferenciación sexual es uno de los fenómenos biológicos de mayor trascendencia y complejidad el cual permite la perpetuación de las especies con reproducción sexual. El dimorfismo sexual es la consecuencia de una serie de eventos que ocurren en las etapas más tempranas de la vida, requiriéndose para su consecución un alto grado de precisión en sus mecanismos de regulación. Este se realiza en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica. La diferenciación cromosómica se inicia al momento de la fertilización, cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza a un óvulo que aporta un cromosoma X. De esta forma, se establece el dimorfismo sexual que caracteriza a los mamíferos, en los cuales la hembra presenta un complemento cromosómico sexual XX y el macho XY. Los eventos posteriores en la diferenciación sexual, dependerán de la presencia de factores determinantes de masculinización o de feminización (1). La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma de un individuo (2,3).

El dimorfismo sexual gonadal se hace presente hasta la 6a. semana de la vida intrauterina (4,5). Desde el punto de vista embriológico, la gónada primitiva se forma por dos tipos de células: las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales, que por su diferenciación temprana pueden considerarse de origen autónomo (6). La gónada primitiva se transformará en testículo si existe presencia y acción del factor determinante testicular existente en el cromosoma Y; de no existir éste, la gónada primitiva evolucionará hacia ovario (7,8).

Debido a las diferencias funcionales de cada gónada específica, se induce la formación de los fenotipos masculino o femenino. El mecanismo que lleva a cabo este dimorfismo en mamíferos fue descrito originalmente por Jost (9,10) quien demostró, que al diferenciarse la gónada primitiva a testículo, su producción hormonal induce el desarrollo del fenotipo masculino; en cambio, si la diferenciación gonadal se da hacia ovario, el fenotipo, aparentemente de manera pasiva, será femenino. La ausencia temprana de gónadas fetales también induce un fenotipo femenino, lo cual apoya el concepto de inactividad endócrina del ovario fetal (11).

Las estructuras primordiales del tracto genital que dan origen a los genitales internos, incluyen dos sistemas de conductos que se encuentran presentes en los embriones de ambos sexos: los conductos Wolffianos (mesonéfricos) y los conductos Müllerianos (paramesonéfricos). Los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamientos labioescrotales).

Desarrollo Fenotípico Masculino

El desarrollo del fenotipo masculino está dado por el efecto de tres hormonas fetales sobre los primordios genitales. En un inicio se presenta la involución de los conductos Müllerianos, proceso que se observa entre la 6a. y la 8a. semana de la gestación y concluye en la 11a. con la desaparición de estas estructuras. La regresión de dichos conductos está mediada por una hormona fetal de origen testicular, la Hormona Inhibidora de las Estructuras Müllerianas (HIM) secretada por las células de Sertoli del testículo (12).

Inmediatamente después de iniciada la síntesis de la HIM, las células intersticiales del testículo fetal se citodiferencian en células de Leydig. Estas servirán como substrato anatómico para la síntesis y secreción de testosterona (T), que constituye la segunda

hormona fetal que participa en la diferenciación del fenotipo masculino. El efecto virilizante de la T se ejerce sobre los conductos Wolffianos que se diferencian a epidídimo, vas deferens, vesículas seminales y conducto eyaculador. La biosíntesis de novo de testosterona en el testículo fetal se lleva a cabo a partir de acetato, utilizando al colesterol como un intermediario obligatorio (13); ésta, es similar a la observada en el testículo del individuo adulto (14). La síntesis de T a partir de colesterol requiere de la presencia de 5 sistemas enzimáticos diferentes. Debe señalarse que cada uno de éstos posee regulación génica autosómica independiente. La actividad endócrina de la célula de Leydig en etapas tan tempranas de la gestación, representa una excepción en la economía fetal, ya que en general el feto tiene medidas de protección las cuales no permiten la síntesis de hormonas esteroideas activas que podrían poner en peligro su homeostasis (15).

La T es el andrógeno principal secretado por el testículo y es el precursor (o prohormona) de la tercera hormona fetal virilizante, la dihidrotestosterona (DHT) (16-18). Esta se forma en la célula blanco por la acción de la 5α -reductasa extragonadal, y es el mediador intracelular de la gran mayoría de las acciones de los andrógenos. Los niveles plasmáticos de DHT se encuentran en promedio en 1/10 de la concentración de testosterona, pero la DHT posee una mayor actividad biológica. Esta hormona durante la embriogénesis, es la única responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata (18).

La T se une principalmente a dos proteínas: a la globulina transportadora de testosterona (TeBG, también llamada globulina transportadora de hormonas sexuales, o SHBG) y a la albúmina (19). El paso de la T libre hacia las células no es dependiente de energía y probablemente está dado por un fenómeno de difusión pasiva (20). Intracelularmente, la T puede ser reducida por la enzima 5α -reductasa a DHT o aromatizada a estradiol. Tanto la T como la DHT pueden unirse, con la misma afinidad, a los receptores de proteínas. El

complejo andrógeno-receptor (receptor-testosterona y receptor-dihidrotestosterona) promueve la unión al ácido desoxirribonucleico (ADN). La consecuencia de la formación de dicho complejo es la unión de éste a la cromatina del compartimiento nuclear. El receptor nativo en la célula posee un gran tamaño (8S o mayor); sin embargo, el transformado que es recobrado de la cromatina nuclear es de menor tamaño (4S o menor) (21,22). En 1988 se clonó el ADN complementario (ADNc) que codifica para el receptor de andrógenos humano (23-25). El dominio de unión al ADN del receptor es semejante a otros receptores proteicos de hormonas esteroideas. Se cree que el complejo receptor-andrógeno influye en la transcripción de algunos genes, uniéndose a sitios reguladores en la porción 5' de estos genes (26).

Aunque la DHT y la T se unen a la misma proteína receptora, las dos hormonas desempeñan roles diferentes en la fisiología de los andrógenos. El complejo testosterona-receptor es el responsable de la regulación de la secreción de la hormona luteinizante (LH) por parte del eje hipotálamo-hipófisis así como de la virilización de los conductos Wolffianos durante el fenómeno de la diferenciación sexual masculina y del cambio en el tono de la voz durante la pubertad. En contraste, la acción de DHT durante la embriogénesis, es exclusivamente responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata además de algunos de los eventos que conllevan a la virilización en la pubertad (crecimiento del vello facial y corporal y la recesión temporal del cabello). Asimismo, en conjunto ambas hormonas son responsables de otras acciones en la pubertad como son: aumento de la masa muscular y crecimiento de los genitales externos (18,27).

ALTERACIONES DE LA DIFERENCIACION SEXUAL

Las alteraciones en cualquier estadio de la diferenciación sexual, durante la

embriogénesis, conducen a la presencia de malformaciones en el desarrollo sexual. Estas pueden ser clasificadas de acuerdo con la etapa de desarrollo en la que se presentan; éstos es, en errores del cromosoma sexual, errores del sexo gonadal o errores en el sexo fenotípico (28-30). Cada una de estas alteraciones puede estar determinada por diversos mecanismos como son, los ambientales (ingestión materna de drogas virilizantes durante la gestación), las aberraciones no familiares en los cromosomas sexuales (como ocurre en la Disgenesia Gonadal 45, X) o alteraciones hereditarias secundarias a mutaciones de un gen [como es el caso del Síndrome de Insensibilidad Completa a la Acción de los Andrógenos, (ICAA)].

Hasta el momento, se han descrito 19 alteraciones hereditarias en el desarrollo sexual (28,29). Dentro de éstas, se encuentran aquellas en las cuales los sujetos afectados presentan pseudohermafroditismo masculino (PHM), grupo de padecimientos en los cuales existe la conjunción de un cariotipo 46,XY con un fenotipo femenino o ambiguo. Para su estudio el PHM se ha dividido en 3 categorías generales: síndrome de persistencia de los conductos Mülllerianos, deficiencia en la producción de testosterona y síndromes de resistencia a la acción de los andrógenos. El síndrome de persistencia de los conductos Mülllerianos es un padecimiento poco común, que se caracteriza por una virilización masculina normal; sin embargo, no existe regresión de los conductos Mülllerianos (31). Las alteraciones por deficiencia en la producción de T son secundarias a una deficiencia en cualquiera de las enzimas necesarias para la síntesis del andrógeno a partir del colesterol. Por otra parte, el síndrome de resistencia a la acción de los andrógenos es el responsable de la mayoría de los casos de PHM (32-34). En estos pacientes tanto la regresión de los conductos Mülllerianos como la síntesis de T son normales. El defecto molecular responsable de la resistencia a la acción de los andrógenos puede presentarse en cualquiera de los tres

sitios principales de acción de los mismos: anormalidades a nivel pre-receptor, a nivel de receptor o a nivel posreceptor.

RESISTENCIA A LA ACCION DE LOS ANDROGENOS A NIVEL DEL RECEPTOR O POSRECEPTOR

Albright y cols. (35), al estudiar el pseudohipoparatiroidismo, describieron por vez primera una resistencia hormonal a nivel celular. La segunda alteración descrita, secundaria a la resistencia de la acción hormonal, fue la ICAA. En 1957, Wilkins (36) demostró que la administración de andrógenos a sujetos con ICAA no producía virilización. Con ello concluyó que este padecimiento era causado por una resistencia a la acción de los andrógenos durante la embriogénesis y en la vida posnatal. Dicho padecimiento se manifiesta como un PHM, en donde los individuos a pesar de ser genéticamente masculinos con testículos diferenciados, producción normal de T y conversión a DHT, presentan un fenotipo femenino como resultado de una mutación en el gen que codifica la expresión del receptor de andrógenos. En estos pacientes se ha demostrado, que la alteración en el receptor de andrógenos está dada por mutaciones específicas del mismo; generalmente mutaciones puntuales, aunque también se ha descrito deleciones o inserciones del gen (37). Posteriormente, se han descrito otros síndromes de resistencia a la acción de los andrógenos (formas incompleta o parcial) en los que se incluyen otros tipos de PHM, así como otras formas muy localizadas en las cuales la única manifestación es infertilidad en hombres sanos. También en las insensibilidades tanto incompletas como parciales se ha demostrado que son mutaciones generalmente puntuales, del gen del receptor de andrógenos las que condicionan dicha entidad patológica (38).

DEFICIENCIA DE 5 α -REDUCTASA (RESISTENCIA A NIVEL PRERECEPTOR)

Como ya ha sido mencionado la enzima 5 α -reductasa es la responsable de convertir a la T en DHT; además, ésta al parecer cataliza la 5 α -reducción de delta-4-androstendiona, de progesterona y de otros esteroides delta-4-3-ceto a sus respectivos productos reducidos 5 α -dihidro-3-ceto. Sin embargo, la formación de 5 α -DHT a nivel celular parece ser la función más importante de dicha reductasa.

La deficiencia de 5 α -reductasa representa la resistencia androgénica a nivel pre-receptor. En el humano, para su estudio se ha dividido de acuerdo con los hallazgos bioquímicos en dos tipos principales: primaria y secundaria. En la deficiencia primaria existe alteración enzimática tanto a nivel periférico como hepático; mientras que en la deficiencia secundaria solamente existe afección periférica o hepática. La deficiencia primaria da origen a una forma específica de PHM; la secundaria puede serlo a otras causas de PHM o a padecimientos endocrinológicos diversos (hipotiroidismo, síndrome de Cushing o anorexia nervosa). La deficiencia primaria fue originalmente descrita en humanos en 1974 como un forma hereditaria de PHM (39,40). Esta deficiencia es debida a un estado homocigoto de un gen autosómico recesivo y por lo tanto el riesgo de recurrencia en esta entidad patológica es del 25% (41,42). Se han publicado las características clínicas, bioquímicas y psicológicas de varios casos de pacientes con esta deficiencia en diferentes partes del mundo incluidos 7 pacientes estudiados por nuestro grupo de trabajo (43-51). Al estar bloqueada la conversión de T a DHT, la cual es esencial para un desarrollo adecuado de los genitales externos en el feto masculino (52), los individuos afectados por esta entidad patológica presentarán: cariotipo 46,XY, con derivados Wolffianos presentes, Müllerianos ausentes y generalmente testículos criptorquídicos bilaterales e hipospadia perineoescrotal con pseudovagina (PPSH). Al nacimiento, debido a la presencia de un fenotipo

primordialmente femenino, casi invariablemente se les otorga un sexo de asignación femenino (39,40,43-49,51,52). Sin embargo, existen dos informes de tres pacientes, quienes probablemente presentaron un defecto menor de la función enzimática, ya que dichos sujetos exhibieron virilización suficiente de los genitales externos, que condujo a un sexo de asignación masculino (53,54). Estos últimos informes han demostrado, que este síndrome de resistencia a la acción de los andrógenos, al igual que otras causas de PHM puede presentarse con una amplia heterogeneidad fenotípica.

Al llegar a la pubertad los individuos con deficiencia de 5α -reductasa y en quienes a lo largo de su vida ha existido un sexo de asignación y de identidad femeninos, presentan virilización; ésto es, el tono de la voz se torna grave, hay desarrollo de masas musculares, crecimiento del falo (4 a 6 cm), el escroto se torna rugoso e hiperpigmentado y puede existir descenso testicular. El examen histológico testicular del adulto revela generalmente hiperplasia de células de Leydig. En los sujetos adultos con testículos criptorquídicos los túbulos seminíferos contienen solamente células de Sertoli con la túnica propia engrosada además de espermatogénesis aberrante. De la misma forma, en algunos de los adultos que presentan testículos descendidos también se observan estos hallazgos, mientras que otros pueden presentar compartimiento tubular normal y espermatogénesis sin alteraciones (55). La próstata está ausente o es pequeña, y los pacientes tienen erecciones y presentan eyaculado a través de la uretra peneana que consiste en un concentrado espermático con la ausencia de líquidos seminal y de líquido prostático (39,45,55). Las hermanas de los pacientes con deficiencia primaria de 5α -reductasa que son homocigotas afectadas 46,XX son fenotípicamente normales y no poseen alteraciones en la esfera reproductiva (39,56) por lo tanto la mutación es aparentemente silenciosa en las mujeres. Los portadores heterocigotas para la mutación son fenotípicamente normales pero pueden ser identificados

por discretas alteraciones en los índices de los metabolitos urinarios $5\beta/5\alpha$ de los compuestos C19 y C21 (57).

Una de las características más interesantes en los pacientes con este padecimiento es la relacionada con su desarrollo psicosexual. Como se ha descrito, casi todos los individuos con este defecto son criados como mujeres durante su infancia y en la mayoría de los casos en forma concomitante con los cambios fenotípicos, existe un cambio en la identidad psicosexual durante la adolescencia (51,58). Como se ha demostrado en estudios realizados en animales, la administración de andrógenos durante la etapa prenatal, la posnatal o en ambas, puede inducir caracteres sexuales secundarios masculinos (59-62); asimismo, se ha documentado que la administración de andrógenos en animales induce diferencias sexuales tanto en la morfología como en la función del cerebro (63-65). Sin embargo, existe controversia sobre que tanto influyen el medio hormonal como los factores ambientales en la determinación de la identidad del sexo en el humano (45,49,66-68). Pareciera ser que la exposición del cerebro a andrógenos tiene un mayor efecto en la determinación de la identidad hacia el sexo masculino que la influencia existente por la acción del sexo de asignación. Estudios previos han demostrado que los pacientes con deficiencia de 5α -reductasa que viven en un medio social no intervencionista presentan mayor influencia del sexo hormonal que del social para la determinación del sexo definitivo. Aunque esos pacientes se comportan biológicamente como hombres posterior al haber cambiado de sexo de asignación, es común que presenten problemas psicológicos de adaptación debido a la apariencia de sus genitales externos y a la historia del padecimiento (45,49,50,51).

Generalmente, se ha observado que las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas se encuentran dentro de los valores de referencia (40,48,69); sin embargo, en algunos casos se han reportado niveles de gonadotropinas ligeramente aumentados (39,45,50). En

adultos con deficiencia primaria de la 5α -reductasa la proporción basal de T/DHT en suero, se encuentra aumentada con niveles normales o aumentados de T y concentraciones normales o disminuidas de DHT (39,40,45-49,52). En los niños afectados los niveles séricos basales de andrógenos son demasiado bajos para poder hacer una determinación adecuada de este índice, por lo que es necesario realizar un prueba de estimulación con gonadotropina coriónica humana (HCG) para llegar al diagnóstico (70,71). Concomitantemente, la producción de los metabolitos urinarios 5α -reducidos de los andrógenos y la excreción urinaria de los metabolitos 5α -reducidos de los esteroides C19 y C21 diferentes de la T, se encuentran también disminuidos (39,40,43-49,52,54,57,70,71).

La deficiencia primaria de 5α -reductasa se ha dividido de acuerdo a diferentes variables enzimáticas encontrados en estudios "in vitro" en los cuales se ha medido indirectamente la actividad de la enzima mediante la cuantificación de la DHT marcada formada a partir de la administración de T marcada (Dallas, L.A., Nueva York, R. Dominicana). Se ha sugerido que la enzima presenta variaciones a nivel de su dependencia de cofactor (NADPH), de su pH óptimo o bien que la enzima pudiera no estar presente. Las características moleculares de la deficiencia de la 5α -reductasa han sido determinadas en cultivos de fibroblastos de piel de área genital de pacientes con este padecimiento. El pH óptimo para la actividad de la enzima es de 5.5, y presenta un intervalo amplio que se desvía más hacia el pH alcalino (72). En algunos sujetos con deficiencia de esta enzima se ha observado que existe una disminución en la velocidad de la actividad de la enzima en los cultivos de fibroblastos (39,40,46,48,72); sin embargo, en otros individuos de 4 diferentes familias, la velocidad de actividad de la enzima se encontró dentro de los valores de referencia (45,69,73). Cuando la actividad de la enzima es normal, se ha postulado como causa del defecto una

función cualitativamente anormal de la enzima (45,52,69). También se han descrito en la literatura pacientes con grados variables de actividad de la misma (53).

En 1992 Jenkins y cols. (74) demostraron mediante estudios farmacológicos y genéticos específicos que existían dos enzimas diferentes con actividad de 5α -reductasa (tabla 1). La enzima Tipo 1 es una proteína constituida por 259 aminoácidos (aa), su actividad máxima se alcanza a pH básicos y su expresión es baja en tejido prostático; asimismo, se requieren concentraciones altas de Finasteride (inhibidor selectivo de la 5α -reductasa) para que sea inhibida. El gen que codifica la síntesis de dicha enzima se encuentra en la banda 15 del brazo corto del cromosoma 5. Diversos estudios han demostrado que aparentemente esta enzima no está relacionada con la deficiencia primaria de 5α -reductasa ya que en 7 individuos afectados con esta entidad, estudiados molecularmente, se encontró que dicho gen no presentaba alteraciones (74-77).

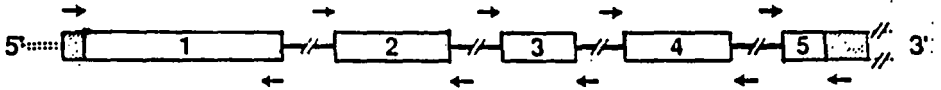
La 5α -reductasa Tipo 2 es una proteína de 254 aa que posee propiedades bioquímicas y farmacológicas diferentes a la Tipo 1. Esta se expresa principalmente en tejido urogenital y representa la enzima determinante en cuanto a 5α -reducción se refiere ya que tiene gran actividad para convertir T en 5α -DHT en el tejido genital; además, "in vitro" puede ser inhibida a bajas concentraciones por Finasteride (78). La caracterización del gen 2 que codifica a dicha enzima, fue reportada recientemente (77,79), habiéndose demostrado que éste se encuentra localizado en la banda 23 del brazo corto del cromosoma 2 y está constituido por 5 exones (fig. 1) (80). Los estudios moleculares de dicho gen en pacientes con deficiencia primaria de 5α -reductasa han demostrado diversos tipos de mutaciones. En el primero de estos estudios se demostró que la delección completa del gen 2 era la directamente responsable de la presencia de deficiencia primaria de 5α -reductasa en una tribu de Nueva Guinea (77). En estudios subsecuentes Thigpen y cols. (80) y Wilson y cols.

TABLA 1
CARACTERISTICAS DE LAS ENZIMAS TIPO 1 Y TIPO 2
DE LA 5 α -REDUCTASA HUMANA

| | TIPO 1 | TIPO 2 |
|--|---------------------------|----------------------|
| TAMAÑO | 259 aa | 254aa |
| LOCALIZACION DEL GEN EN EL CROMOSOMA | 5p15 | 2p23 |
| ESTRUCTURA DEL GEN | 5 exones, 4 intrones | 5 exones, 4 intrones |
| EXPRESION EN PROSTATA | Baja | Alta |
| INHIBICION POR FINASTERIDE | $K_i \geq 300 \text{ nM}$ | $K = 3-5 \text{ nM}$ |
| ACTIVIDAD EN LA DEFICIENCIA DE 5α-REDUCTASA | Normal | Alterada |

aa = aminoácidos

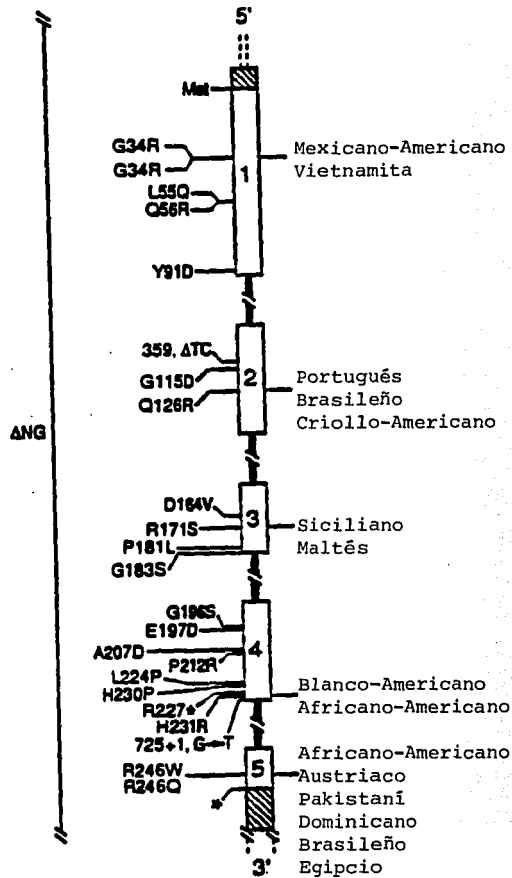
FIGURA 1



Estructura del gen que codifica para la 5 α -reductasa Tipo 2 en el humano. Los 5 exones (rectángulos numerados) están dibujados al tamaño relativo entre sí. La localización, el número y la orientación de los iniciadores de los oligonucleótidos se encuentran indicados arriba y abajo del gen. Los intrones interrumpen al gen en la secuencia de los aminoácidos 94, 149, 183 y 233 respectivamente.

(78) utilizando diversas técnicas de biología molecular que incluyeron: amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), análisis Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN (SSCP) y secuenciación del ADN, analizaron un total de 38 familias pertenecientes a 25 grupos étnicos diferentes distribuidos en diversas partes del mundo. En todos ellos, se había confirmado el diagnóstico clínico de deficiencia primaria de 5 α -reductasa mediante estudios bioquímicos. En estos trabajos se describieron 27 mutaciones puntuales distribuidas a lo largo de los 5 exones del gen. De éstas, 24 fueron mutaciones en sentido erróneo, otra una alteración del sitio de corte y empalme, una más por una deleción de un dinucleótido y la última una mutación sin sentido (fig. 2). Cada una de estas mutaciones alteran aa conservados en el gen 2 del humano como en el de la rata (77). Ninguno de los individuos afectados presentó más de 2 mutaciones. Hasta la fecha no se han detectado mutaciones en los individuos normales estudiados. Se han identificado 27 mutaciones en 24 homocigotos, 9 heterocigotos compuestos y en 4 heterocigotos compuestos inferidos. La alta proporción de heterocigotos compuestos (más del 40%) sugiere que la frecuencia de portadores de la mutación es mayor que lo originalmente estimado. Hay que señalar que en uno de los sujetos estudiados, no se pudo documentar mutación alguna (78).

FIGURA 2



Mutaciones detectadas en el gen de la 5α-reductasa Tipo 2 del humano. En la parte izquierda se encuentra definida la localización específica de 37 mutaciones diferentes ΔNG representa la delección del gen en la cohorte de Nueva Guinea; 359 ΔTC indica la delección de un dinucleótido TC en la posición 359 del ADNc; 227* indica la presencia de un codón de terminación prematuro y 725+1, G→T indica una mutación en el sitio de corte y empalme. El resto de las mutaciones son sustituciones simples de aminoácidos y se designa por la sola letra del código de aminoácidos. En la parte derecha se señalan los grupos poblacionales en los cuales se han identificado mutaciones recurrentes. La metionina de inicio se designa como met en el exón 1 y el codón de terminación normal se encuentra señalado mediante un asterisco en el exón 5.

OBJETIVO

Determinar el tipo de mutación existente en el gen 2 de la 5 α -reductasa humana en pacientes con deficiencia primaria de dicha enzima.

HIPOTESIS

Los pacientes afectados con deficiencia primaria de 5 α -reductasa presentan mutaciones en el gen 2 que codifica para dicha enzima.

SUJETOS Y METODOS

SUJETOS

Se incluyeron a todos los sujetos con deficiencia primaria de 5 α -reductasa diagnosticados en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) desde 1980 hasta la fecha que estuvieron asequibles en los últimos 24 meses (10 de 11). La descripción de las características clínicas, psicológicas y bioquímicas de los 6 primeros de estos pacientes, así como del que no fue posible estudiar en la actualidad, fue publicada recientemente (51). También incluimos en nuestro estudio a los padres de 2 hermanos afectados con el padecimiento. Asimismo, fueron estudiados 20 sujetos sanos (individuos en los cuales después de una historia clínica detallada no se evidenció ningún tipo de alteración).

Criterios de Inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de deficiencia primaria de 5 α -reductasa, mayores de 2 años de edad que aceptaron participar en el estudio.
2. En el caso de menores de edad se solicitó la autorización de los progenitores.

Criterios de Exclusión:

No cumplir con los criterios de inclusión.

Criterios de Eliminación:

Ninguno.

De los 11 sujetos afectados que se han estudiado en el INNSZ a lo largo de los últimos

15 años y que tienen diagnóstico comprobado de deficiencia de 5 α -reductasa se pudieron incluir en este proyecto a 10 de ellos. Estos pertenecían a 7 familias diferentes (3 familias tenían 2 miembros afectados), en 4 de ellos se pudo obtener la información suficiente para realizar los árboles genealógicos correspondientes. Las características clínicas individuales de cada uno de los sujetos se pueden observar en la tabla 2. Todos los pacientes eran de origen étnico mestizo mexicano. Cada una de las familias provenía de diferentes áreas del país y no existía relación alguna entre ellas. Los primeros dos pacientes del estudio viven en la Ciudad de México, mientras que los otros 8 habitan en áreas rurales. En todos los casos dichos sujetos fueron criados como mujeres y, exceptuando a los pacientes 6,9 y 10, acudieron al Instituto después de iniciada la pubertad. La razón por la que acudieron a consulta fue por presentar ambigüedad genital y diversas alteraciones psicosociales. La edad al momento del ingreso fluctuó entre los 3 y los 36 años. Al examen físico, todos presentaron talla y peso por arriba de la percentila 3 para varones normales de la edad. El vello facial y el corporal en los púberes y pospúberes se encontró disminuido en comparación con los otros integrantes masculinos de la misma familia. En todos estos individuos el tono de la voz se encontró grave y ninguno presentó recesión temporal del cabello. Se documentó hipospadia perineoescrotal con pseudovagina en los 10 sujetos y la longitud del pene, en estado de flacidez para los púberes y pospúberes fue de 4.0 a 5.5 cm, mientras que para los prepúberes (sujetos 6,9 y 10) se encontró entre 1.2 y 1.7 cm. Al momento del examen físico ninguno de los pacientes presentó criptorquidia aunque se documentó historia de ella en el sujeto 6 (unilateral) y en los sujetos 2 y 7 (bilateral). El volumen testicular se encontró dentro de los valores de referencia para la edad en todos los sujetos puberales y pospuberales, al igual que en dos de los tres prepúberes (9 y 10); en el paciente 6, éste estuvo disminuido. No se palpó la próstata en ninguno de los pacientes

TABLA 2
CARACTERISTICAS CLINICAS DE 10 PACIENTES CON
DEFICIENCIA PRIMARIA DE 5 α -REDUCTASA

| PACIENTES | EDAD | SEXO DE ASIGNACION | EDAD AL MOMENTO DEL CAMBIO DE IDENTIDAD PSICOSEXUAL | GENITALES EXTERNOS | GONADAS | PROSTATA (EXAMEN RECTAL) |
|-------------|------|--------------------|---|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | 32 | F | 28 (E) | PPSH PENE= 5.0 cm | TD= 25 cc TI= 25 cc | NO SE PALPA |
| 2 | 14 | F | 17 (A) | PPSH PENE= 4.0 cm | TD= 20 cc TI= 20 cc | NO SE PALPA |
| 3* | 36 | F | 20 (E) | PPSH PENE= 5.5 cm | TD= 16 cc TI= 16 cc | NO SE PALPA |
| 4* | 32 | F | 18 (E) | PPSH PENE= 4.0 cm | TD= 25 cc TI= 25 cc | NO SE PALPA |
| 5+ | 17 | F | ♂ | PPSH PENE= 5.2 cm | TD= 16 cc TI= 12 cc | NO SE PALPA |
| 6+ | 11 | F | ♂ | PPSH PENE= 1.2 cm | TD= 1.5 cc TI= 1.3 cc | - |
| 7 | 24 | F | ♂ | PPSH PENE= 4.5 cm | TD= 11 cc TI= 6.3 cc | NO SE PALPA |
| 8 | 22 | F | 18 (E) | PPSH PENE= 4.5 cm | TD= 22 cc TI= 20 cc | NO SE PALPA |
| 9 Δ | 5 | F | ♂ | PPSH PENE= 1.7 cm | TD= 2.7 cc TI= 2.7 cc | - |
| 10 Δ | 3 | F | ♂ | PPSH PENE= 1.5 cm | TD= 3.2 cc TI= 3.2 cc | - |

• HERMANOS
+ HERMANOS
 Δ HERMANOS

E= ESPONTANEO
A = ASISTIDO
♂ = ACTUALMENTE BAJO PSICOTERAPIA

PPSH= HIPOSPADIA PERINEOESCROTAL
CON PSEUDOVAGINA

pospuberales.

Se utilizaron las pruebas proyectivas de manchas de tinta de Rorschach y el Test de apercepción temática con el fin de conocer los rasgos de personalidad (81). Asimismo, se analizó el contenido de los sueños como un instrumento para evaluar el cambio de identidad sexual. Las manifestaciones de los hábitos sexuales se evaluaron de acuerdo a los patrones definidos por Diamond (82). Cuatro sujetos (1,3,4 y 8) cambiaron espontáneamente de identidad psicosexual de mujer a varón varios años antes de su ingreso al Instituto (tabla 2). Los pacientes refirieron haber presentado dificultades de adaptación psicosocial en la adolescencia debido a la incertidumbre de su sexo de identidad, al observar el proceso de virilización y la ausencia de desarrollo mamario y menarca. Posteriormente, cambiaron sus hábitos y actitudes hacia lo masculino, puesto que presentaban atracción hacia el sexo femenino y 3 de ellos (1,3 y 8), habían tenido relaciones heterosexuales satisfactorias. El sujeto 2, de 14 años de edad, fue criado como mujer. Acudió a consulta por presentar virilización progresiva demostrándose identidad sexual femenina. Después de tres años de psicoterapia, las pruebas proyectivas demostraron cambio de identidad psicosexual. Desde hace 5 años vive como hombre, tiene relaciones heterosexuales y planea casarse. Los pacientes 5 y 6 acudieron a consulta a los 17 y 11 años de edad. Fueron criados como mujeres y las pruebas psicológicas revelaron identidad psicosexual femenina. Hasta el momento continúan viviendo como mujeres y debido al bajo nivel escolar y socioeconómico y a que habitan en una comunidad distante del estado de Hidalgo no se ha podido llevar a cabo la psicoterapia adecuadamente. Los pacientes 7,9 y 10 acudieron a consulta a los 24, 5 y 3 años de edad respectivamente. Al igual que en los casos anteriores, fueron criados como mujeres y las pruebas psicológicas realizadas hasta el momento demuestran identidad psicosexual masculina. Actualmente viven como mujeres y se encuentran bajo psicoterapia;

serán intervenidos quirúrgicamente para llevar a cabo la cirugía reparadora en los próximos meses.

En la tabla 3 se muestran las concentraciones hormonales plasmáticas de gonadotropinas y de esteroides sexuales cuantificados por radioinmunoanálisis (RIA) siguiendo la metodología utilizada en nuestro laboratorio en los últimos años (51). En todos los pacientes las gonadotropinas se encontraron dentro de los valores de referencia para la edad. En 9 de los 10 sujetos, las concentraciones basales de T se encontraron dentro de los valores de referencia; el sujeto 4 presentó valores por debajo de los límites normales. En todos los pacientes las concentraciones plasmáticas basales de DHT se encontraron bajas, excepto para el sujeto 1, cuyos valores se encontraron en límites normales. En todos los pacientes puberales y pospuberales, el índice T/DHT basal se encontró elevado, (entre 17 y 50) haciéndose el diagnóstico de deficiencia de 5 α -reductasa. En los 3 prepúberes, dicho índice se encontró normal. Posterior a la prueba de estimulación con HCG [1500 (prepúberes) ó 2500 (púberes o pospúberes) U.I/día/4 días], se observó un aumento significativo en los niveles de T en todos los sujetos, excepto en el paciente 5, quien presentó una pobre respuesta. Por otro lado, en los 3 pacientes prepúberes se observó un aumento significativo en el índice T/DHT con lo que se pudo determinar el diagnóstico de deficiencia de 5 α -reductasa. En todos los individuos las orinas de 24 hrs colectadas fueron congeladas y enviadas para su análisis mediante cromatografía de gas capilar (51) a los Estados Unidos. Se analizaron los metabolitos urinarios 5 α y 5 β reducidos derivados de compuestos C19 y C21. En todos los sujetos los índices 5 β /5 α de los compuestos cuantificados se encontraron elevados (tabla 4), lo que determinó el diagnóstico preciso de deficiencia primaria de 5 α -reductasa.

La actividad enzimática fue determinada en cultivos de fibroblastos de piel de área genital

TABLA 3

**NIVELES BASALES DE GONADOTROPINAS Y ANDROGENOS Y
RESPUESTA MAXIMA (RM) AL ESTIMULO CON HCG EN 10
PACIENTES CON DEFICIENCIA PRIMARIA DE 5 α -REDUCTASA**

| PACIENTES | LH* (U/l) | FSH* (U/l) | T (BASAL) (ng/ml) | DHT (BASAL) (ng/ml) | T/DHT | T (RM) (ng/ml) | DHT (RM) (ng/ml) | T/DHT |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|
| 1 | 5.4 | 5.3 | 11.5 | 0.68 | 17 | 25.0 | 0.75 | 33 |
| 2 | 3.8 | 4.5 | 7.5 | 0.26 | 29 | 15.3 | 0.32 | 48 |
| 3 | 7.6 | 3.5 | 7.2 | 0.33 | 22 | 11.8 | 0.54 | 22 |
| 4 | 5.6 | 1.3 | 2.5 | 0.05 | 50 | 10.9 | 0.13 | 84 |
| 5 | 3.7 | 2.4 | 6.6 | 0.15 | 44 | 7.3 | 0.18 | 40 |
| 6 | 1.6 | 0.6 | 0.8 | 0.07 | 11 | 15.1 | 0.48 | 31 |
| 7 | 8.4 | 3.6 | 6.5 | 0.23 | 28 | 10.6 | 0.17 | 62 |
| 8 | 3.6 | 4.7 | 6.8 | 0.24 | 28 | 8.6 | 0.15 | 57 |
| 9 | N.D | N.D | 0.1 | 0.05 | 2 | 1.9 | 0.05 | 38 |
| 10 | N.D | N.D | 0.2 | 0.08 | 2 | 3.6 | 0.10 | 36 |
| S.C EDAD: 18-50 | 3-12 | 0.5-5.0 | 3.8-9.0 | 0.40-0.94 | 12.33\pm3.1 | 7.3-25.4 | 0.7-2.5 | 5.0-20.0 |

***MEDIA DE DOS VALORES BASALES
S.C. = SUJETOS CONTROL (n=30)**

TABLA 4

**INDICES 5 β /5 α REDUCIDOS DE METABOLITOS URINARIOS DE
 COMPUESTOS C19 Y C21 EN 10 PACIENTES CON
 DEFICIENCIA PRIMARIA DE 5 α -REDUCTASA**

| PACIENTES | E/A | THF/5 α -THF | THB/5 α -THB | 11 β -OHE/11 β -OHA |
|----------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|
| 1 | 4.9 | 11.0 | 2.1 | - |
| 2 | 5.5 | 28.4 | 2.1 | 2.3 |
| 3 | 2.5 | 25.3 | 4.1 | 1.5 |
| 4 | 6.5 | 45.7 | 1.0 | 1.4 |
| 5 | 3.2 | 5.9 | 4.3 | 1.2 |
| 6 | 3.9 | 6.0 | 9.0 | 3.0 |
| 7 | 6.3 | 31.4 | 12.8 | 3.2 |
| 8 | 3.7 | 26.7 | 8.2 | 1.8 |
| 9 | 4.4 | 15.9 | 3.5 | 2.7 |
| 10 | 4.4 | 17.6 | 6.0 | 2.2 |
| CONTROLES n=33 | 0.93 \pm 0.37 | 1.07 \pm 0.36 | 0.50 \pm 0.22 | 0.38 \pm 0.23 |

E= ETIOCOLANOLONA
 A= ANDROSTERONA

THF= TETRAHIDROCORTISOL
 THB= TETRAHIDROCORTICOSTERONA

siguiendo técnicas utilizadas en nuestro laboratorio (51). Cinco de los pacientes (provenientes de 4 familias diferentes) mostraron actividad enzimática normal; mientras que los 5 sujetos restantes presentaron actividad disminuida.

METODOS

Para el estudio del gen 1 y del gen 2, se extrajeron 20 ml de sangre periférica en aquellos pacientes con diagnóstico comprobado de deficiencia primaria de 5 α -reductasa que se pudieron incluir en el estudio.

5 α -Reductasa Tipo 1

Con el fin de complementar el estudio y debido a que hasta la fecha no se han descrito mutaciones en el gen 1 de la 5 α -reductasa humana, en pacientes con deficiencia primaria de la enzima (74,77), solamente se llevaron a cabo estudios moleculares de este gen con la técnica de Southern blot para determinar si existían o no deleciones del mismo (83).

5 α -Reductasa Tipo 2

Dado que las mutaciones descritas en pacientes con deficiencia primaria de 5 α -reductasa en la literatura han sido, en todos los casos menos en dos de ellos, mutaciones puntuales de este gen, se procedió a estudiar el mismo mediante al uso de diversas técnicas de biología molecular. Para la amplificación de los 5 exones del gen de la 5 α -reductasa Tipo 2 y con el fin de descartar la presencia de deleciones, se utilizó la técnica de PCR (84). Para tratar de evidenciar en cual de los exones se encontraba cada mutación puntual específica, se llevó a cabo el estudio de SSCP; técnica mediante la cual la presencia de una mutación puntual en un determinado exón cambia el patrón electroforético con respecto al del control

(85-87). Posteriormente, los templados de ADN en los que se observaron alteraciones en la movilidad electroforética con respecto de los controles fueron secuenciados, de acuerdo con la metodología descrita por Sanger y cols. (88).

Extracción de ADN

Se extrajeron 20 ml de sangre periférica para la obtención del ADN genómico. Esta fue depositada (10 ml por duplicado) en tubos de 50 ml que contenían 200 μ l etilen diamino tetra acetato disódico (EDTA) 0.5 M pH 8 como anticoagulante. Se colocaron las muestras en hielo y se agregaron 25 ml de sacarosa-tritón 2X (Sacarosa 0.64M, Tris-base 0.02M, $MgCl_2$ 0.01M y Tritón 100X 2%) y 15 ml de agua desionizada (ddH₂O). Los leucocitos se separaron por centrifugación (2180 rpm/15 min) decantándose el sobrenadante hasta obtener un botón nuclear (en todos los casos uno de los botones nucleares fue almacenado a -70°C para futuras extracciones). Se añadieron 3 ml de amortiguador de lisis nuclear pH 8.2 (Tris-base 10 mM, NaCl 400 mM y Na₂EDTA 2mM), 108 μ l de sulfato dodecílico sódico (SDS) al 20% y 100 μ l Proteinasa K para la lisis de los leucocitos dejándose incubar por 14-18 hrs a 37°C. Se adicionó 1 ml de NaCl saturado y se centrifugó a 2180 rpm/15 min. El sobrenadante se transfirió a tubos de 15 ml y el ADN fue precipitado con dos volúmenes de etanol absoluto, agitándose por inversión. Posteriormente, el ADN se lavó en etanol frío al 70%, se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 200 μ l de amortiguador TE pH 7.0 (Tris-base 1M, EDTA 0.5 M) y se almacenó para su análisis posterior a 4°C.

En todos los sujetos estudiados, se determinó la concentración de ADN por espectrofotometría, y se leyó a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Por medio de la lectura en la longitud de onda a 260 nm se determinó la concentración de ADN, mientras que la relación 260/280 nos indicó la pureza del mismo. La concentración total de ADN se

obtuvo al multiplicar la cantidad obtenida a la longitud de onda de 260 por una constante preestablecida, de acuerdo con la dilución utilizada:

$$\text{concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{D.O. de 260nm}) (\text{dilución}) (50\mu\text{g de ADN})$$

$$\text{en donde } 50 \mu\text{g de ADN} = 1 \text{ D.O. (260 nm)}$$

Para conocer la calidad de la muestra se llevo a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Southern blot

Se digirieron 10 μg de ADN genómico con Hind III y Eco R1 (Gibco, BRL, Life Technologies, Inc. Gaithersbury, USA). Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.9% en TBE 0.5X (Tris-base 0.44M, ácido bórico 0.045 M y EDTA 0.001 M pH 8), sin bromuro de etidio. Se incluyó fago lambda digerido con Hind III (Gibco, BRL) como marcador de peso molecular. El ADN en el gel fue desnaturalizado in situ durante 30 min mediante: NaCl 1.5 M, NaOH 0.5N y posteriormente fue incluido en solución neutralizante (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 1.0 M, pH 7.0) con agitación moderada durante 30 min. Al termino de la agitación fue transferido a una membrana de nitrocelulosa reforzada con nylon (Zeta Probe, Bio-Rad. California, USA) de acuerdo al procedimiento descrito por Southern (83,84).

El marcaje de la sonda molecular de la 5 α -reductasa Tipo 1 se realizó por el método de marcaje aleatorio (Random Priming, Bio-Labs, Inc. New England, USA), en una reacción estándar de 50 μl . Para ello, se resuspendieron 25 ng de la sonda de ADN en agua libre de endonucleasas, el templado fue desnaturalizado a 95°C por 5 min, transferido al hielo otros 5 min y centrifugado en frío. Se agregaron 5 μl del amortiguador 10X (que contenía los hexadesoxiribonucleótidos al azar), 5 μl de la mezcla de los desoxiribonucleótidos

trifosfatados (dNTP's) (1.7 μ l de dATP, dTTP o dGTP) (Perkin Elmer. New Jersey, USA), 50 μ Ci del α -³²P dCTP (Amersham International plc, UK) y 1 μ l del fragmento Klenow de la ADN Polimerasa I (Perkin Elmer). Esto se incubó a 37°C por una hora; para detener la reacción se agregó 1 μ l de EDTA 0.2 M pH 8. Posteriormente, se purificó la sonda marcada en una columna de sephadex G-50 (84).

La prehibridación, hibridación y los lavados se realizaron bajo las condiciones indicadas por el fabricante (Bio-Rad). Para la prehibridación se colocó la membrana (Zeta-Probe, Bio-Rad) en una bolsa de plástico, se añadió la solución de prehibridar (EDTA 1 mM, NaH₂PO₄ 0.5 M pH 7.2 y SDS al 7%) llevándose a un volumen de 150 μ l/cm² del filtro y se incubó a 65°C por 15 min. Se retiró la solución de prehibridar y se colocó nuevamente la misma cantidad del amortiguador y entonces se agregó la sonda desnaturalizada. El filtro fue hibridado de 4-24 hr a una temperatura de 65°C con agitación, se retiró el amortiguador y la membrana de la bolsa de plástico. La membrana se lavó dos veces durante 30 min a temperatura ambiente con EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM pH 4.2 y SDS al 5%. Posteriormente, se lavó siguiendo las condiciones antes mencionadas salvo por que la concentración de SDS fue disminuida al 1% y se dejó a 65°C. La membrana hibridada fue expuesta por diferentes períodos de tiempo a -70°C en placas Kodak X-OMAT con pantallas intensificadoras (84).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la técnica de PCR, se emplearon los oligonucleótidos sintéticos adelante descritos derivados del gen de la 5 α -reductasa Tipo 2 (79). En todos los casos se preparó una reacción estándar de 50 μ l que contenía 1 μ g de ADN genómico, 1.2 μ M de cada iniciador, 25 μ M de cada uno de los dNTP's, ddH₂O, dimetil sulfóxido (DMSO), amortiguador 10 X

(Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM y Mg₂Cl) y Taq. polimerasa 2 U (Perkin Elmer). Todos los exones fueron amplificados en un termociclador (480, Perkin Elmer) en un programa de 25 ciclos (94°C/1 min, 54-65°C/1 min y 72°C/1 min) y un ciclo de extensión a 72°C durante 5 min.

Secuencia de los oligonucleótidos en dirección 5' → 3':

Exón 1

GCAGCGGCCACCGGCGAGG
AGCAGGGCAGTGCGCTGCACT

Exón 2

TGAATCCTAACCTTTCCTCCC
AGCTGGGAAGTAGGTGAGAA

Exón 3

TGTGAAAAAAGCACCACAATCT
CAGGGAAGAGTGAGAGTCTGG

Exón 4

TGATTGACCTTCCGATTCTT
TGGAGAAGAAGAAAGCTACGT

Exón 5

TCAGCCACTGCTCCATTATAT
CAGTTTTCATCAGCATTGTGG

Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN (SSCP)

El estudio para la detección de los exones mutados del gen de la 5 α -reductasa Tipo 2, se llevó a cabo por la técnica de SSCP, procedimiento descrito por Orita y cols. (85) al cual se le realizaron algunas modificaciones. Se utilizaron las mismas condiciones descritas para el PCR, excepto que se añadieron 12 μ Ci de α -³²P dCTP y 12 μ M de dCTP. La separación de las cadenas de ADN se realizó en geles neutros de poliacrilamida al 5.4% y al 8% (100 ml) que contenían acrilamida:bisacrilamida (29:1), 20 ml de TBE 5X, persulfato de amonio, ddH₂O y 35 μ l de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (en algunos geles se incluyó

glicerol al 10%). Se diluyeron 2 μ l de ADN de los exones amplificados y marcados con α -³²P dCTP en 18 μ l de formamida al 95%, EDTA 20 mM y azul de bromofenol al 0.05% (86), se calentaron a ebullición por 4 min y se colocaron en hielo. Posteriormente, se aplicaron 3 μ l de las muestras por carril y se corrió la electroforesis a 200 V por 14-18 hrs a temperatura ambiente. Asimismo, para determinar la posición de la migración del fragmento del exón de ADN de doble cadena amplificado, se aplicó una muestra no desnaturalizada de ADN (2 μ l) diluida en 36 μ l de sacarosa al 60%, EDTA 50 mM, xilen cianol al 0.05% y azul de bromofenol al 0.05% (80). Se secó el gel durante una hora a 75°C y se expuso por diferentes períodos de tiempo en placas Kodak X-OMAT con pantallas intensificadoras.

Secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó mediante un estuche de AmpliCycle Sequencing Kit (Perkin Elmer), que se basa en el método descrito por Sanger y cols. (88) con algunas modificaciones. Previa a la secuenciación de los exones 1 y 4, las muestras de ADN amplificadas se electroeluyeron y precipitaron por técnica estándar (84). Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de marcaje final de los oligonucleótidos con 5 μ l de γ -³²P ATP (Amersham International plc, UK), 1 μ l de amortiguador cinasa 10X (Tris HCl 700 mM pH 7.6, MgCl₂ 100 mM, ditiotritol 50 mM) (Promega, USA), 0.8 μ l del iniciador (5' o 3') 20 μ M, 3 μ l de T4 polinucleótido cinasa (10 U/ μ l) (Gibco BRL) y ddH₂O para un volumen final de 10.8 μ l. Se incubó a 37°C por 10 min y a 90°C durante 5 min; asimismo, se añadió 1 μ l de la preparación anterior a la reacción de marcaje que contenía 4 μ l de amortiguador 10X (100 U de AmpliTaq polimerasa, Tris HCl 500 mM pH 8.9, KCl 100 mM, MgCl₂ 25 mM y Tween 0.25%), 5 μ l de ADN genómico y ddH₂O para un volumen final de 30 μ l. En tubos de microcentrifuga de 0.5 ml se agregaron 2 μ l de cada una de las mezclas de terminación:

guanina (c^7dGTP 22.5 μM , dATP, dCTP y dTTP 10 μM y ddGTP 80 μM); adenina (c^7dGTP 22.5 μM , dATP, dCTP y dTTP 10 μM y ddATP 600 μM); timina (c^7dGTP 22.5 μM , dATP, dCTP y dTTP 10 μM y ddTTP 900 μM) y citocina (c^7dGTP 22.5 μM , dATP, dCTP y dTTP 10 μM , ddCTP 300 μM). Posteriormente, se añadieron 6 μl de la reacción de marcaje a cada uno de los tubos de microcentrífuga que contenían las mezclas de terminación para dar un volumen final de 8 μl . Se llevó a cabo el PCR de cada una de las reacciones de secuenciación, con las temperaturas de desnaturalización, reasociación y extensión de cada uno de los exones previamente estandarizadas. Al finalizar el PCR, se añadieron a cada una de las reacciones de secuenciación 4 μl de la solución de terminación (0.8 ml formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y xilen cianol al 0.02 %). Las muestras se calentaron a temperatura de ebullición y se colocaron en hielo. El ADN marcado fue secuenciado en un gel de poliacrilamida al 5% (100 ml) que contenía acrilamida 30%, urea 45 g, bisacrilamida:acrilamida (18:2), 20 ml de TBE 5X, 30 ml ddH₂O, 670 μl NH₄SO₄ 10%, y 25 μl de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina. Se precalentó el gel a 1900 V, 70 W, 49 mAmp, a 50°C durante 1 hora, se colocaron las muestras (3 μl /carril) y se corrió la electroforesis con el voltaje y las temperaturas anteriores durante 2-3 hrs. Posteriormente, se secó el gel durante una hora a 75°C, y se expuso por diferentes períodos de tiempo en placas Kodak X-OMAT con pantallas intensificadoras.

RESULTADOS

Los árboles genealógicos, practicados en los pacientes 1, 2, 3, 4, 9 y 10 (en el resto de las familias no fue posible llevarlos a cabo), no permitieron confirmar consanguinidad en ninguna de las familias, ni relación entre las mismas. Todas pertenecían a genealogías diferentes (fig. 3). Asimismo, mediante este interrogatorio no se pudo documentar la existencia de otros individuos afectados en las mismas. Por otro lado, tampoco se observó que existiesen otras patologías relacionadas con la diferenciación sexual anormal.

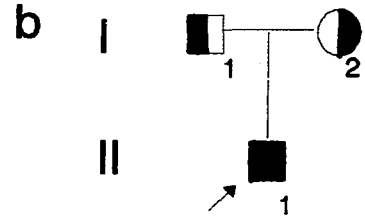
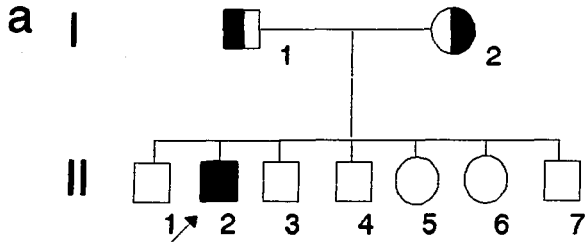
El ADN genómico extraído a cada uno de los individuos afectados fue analizado mediante la técnica de Southern blot para el estudio del gen 1. En todos los sujetos afectados, al igual que en los padres de los pacientes 9 y 10 se observó un patrón de restricción igual al de los controles, con lo que se demostró que en ninguno de estos casos existía la presencia de deleciones en dicho gen (figs. 4 y 5). Esto sugería que de existir mutaciones éstas serían puntuales. El análisis secuencial de este gen no se llevó a cabo por las razones previamente descritas (ver metodología).

El análisis por PCR del ADN genómico del gen 2 no demostró deleciones en ninguno de los sujetos afectados. En todos los casos se observó que el tamaño de los productos del ADN fue la esperada de acuerdo a su peso molecular y que hubo amplificación de los 5 exones del gen (fig. 6).

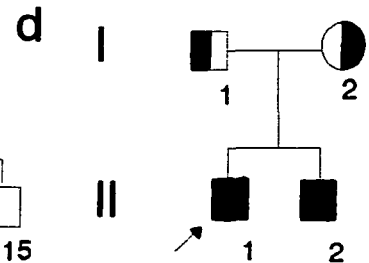
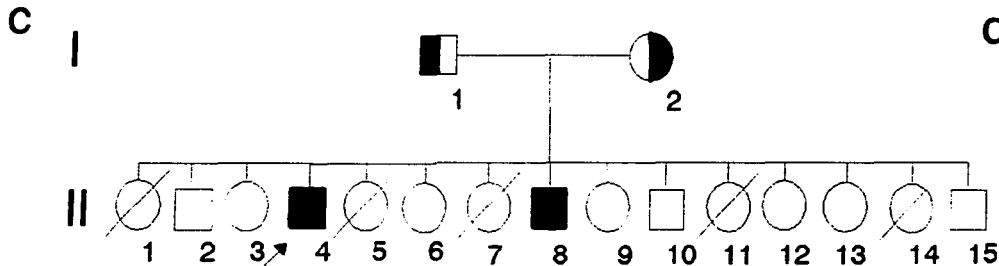
Con base en los hallazgos anteriores, se procedió a realizar el estudio de las posibles mutaciones puntuales en cada uno de los individuos. Con el fin de detectar el exón en el cual se encontraba dicha mutación, se sometieron las muestras a análisis por SSCP. En ninguno de los sujetos estudiados se detectaron alteraciones en el patrón de migración electroforética de las cadenas sencillas del ADN para los exones 2,3 y 5 (fig. 7); con ello, se descartó la posibilidad de la existencia de mutaciones en dichos exones. En los pacientes

FIGURA 3

■ Deficiencia primaria de 5α -reductasa

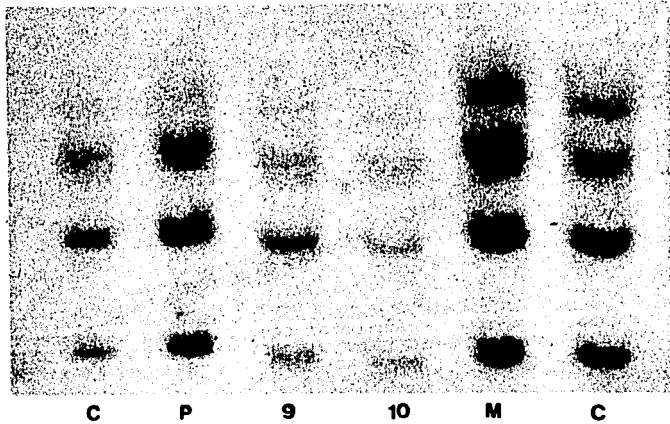
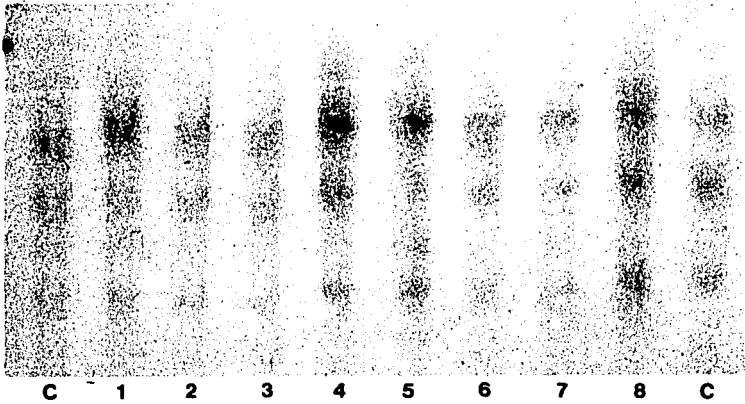


Arbol genealógico del paciente 1 (a) y del paciente 2 (b). Se puede apreciar que en estas familias solamente el paciente se encontraba afectado.



Arbol genealógico de los pacientes 3 y 4 (c) y de los pacientes 9 y 10 (d). Se puede apreciar que en estas familias dos sujetos se encontraban afectados.

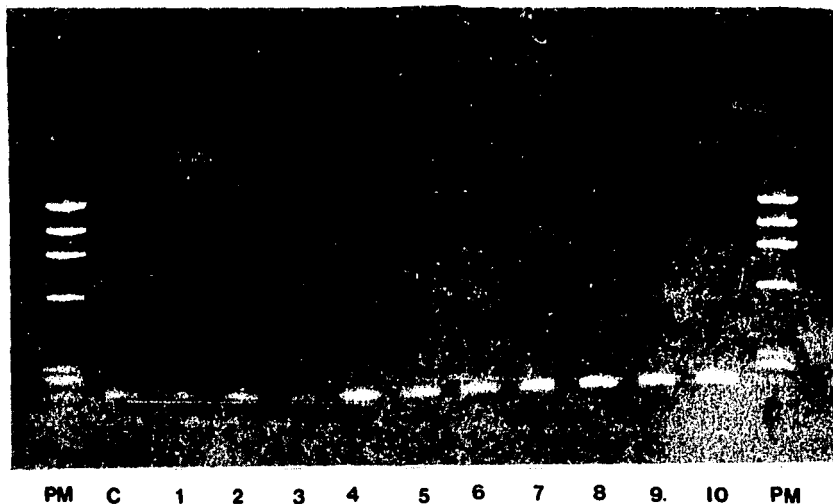
FIGURAS 4 Y 5



Southern blot del gen de la enzima Tipo 1 de la 5α -reductasa humana. Se puede observar que todos los sujetos estudiados (pacientes 1 al 8), así como el de los pacientes 9 y 10 y de sus padres (M y P) presentaron un patrón de restricción igual al de los controles (C).

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 6

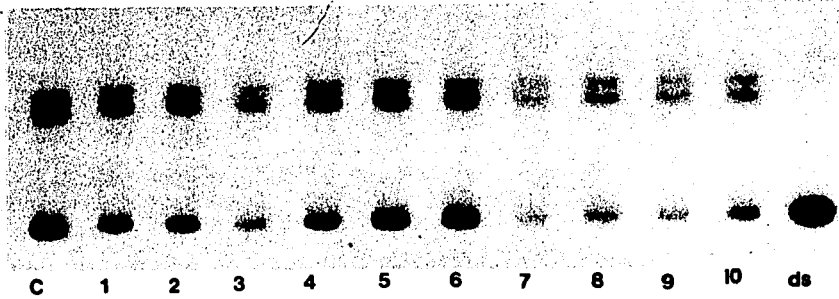


C = control
PM = Peso Molecular

Reacción en Cadena de la Polimerasa del exón 4 del gen de la enzima Tipo 2 de la 5 α -reductasa humana. En todos los sujetos estudiados (pacientes 1 al 10) se observa amplificación de dicho exón. Este patrón se encontró también presente en el resto de los exones estudiados.

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 7



C= control
ds= ADN de doble cadena

Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 2 del gen de la enzima Tipo 2 de la 5 α -reductasa humana. El patrón de migración electroforética de todos los pacientes es igual al de los controles.

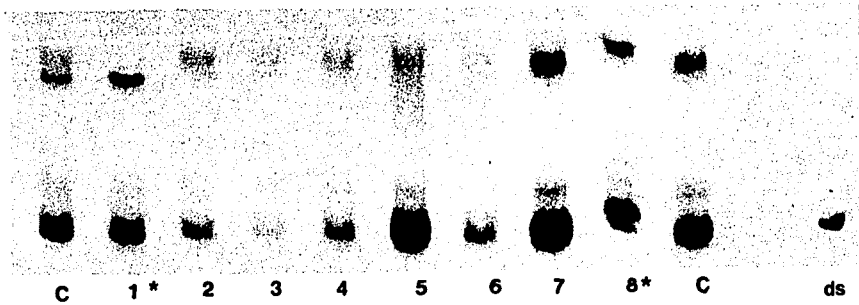
FALLA DE ORIGEN

1 y 8 se observó un patrón diferente en relación con la movilidad de las cadenas sencillas del exón 1, con respecto a los sujetos controles (fig. 8). En los 8 pacientes restantes el patrón diferente se encontró en el exón 4 (fig. 9). Sin embargo, para demostrar dicho hallazgo en los sujetos 5 y 6 (fig. 10) fue necesario modificar las condiciones experimentales aumentándose la concentración de poliacrilamida en el gel correspondiente y detectándose así los cambios de la movilidad electroforética de dichos sujetos con respecto a los controles.

Por otro lado, hay que señalar que al realizarse el estudio de SSCP en el exón 1, el patrón electroforético de los pacientes 9 y 10 fue igual al de los controles, pero diferente al de sus padres y al de otros controles (fig. 11). Se demostró que los padres de dichos sujetos presentaban un patrón electroforético peculiar ya que se observaban dos bandas de migración electroforética; este hecho fue también observado en varios sujetos sanos utilizados como controles, lo cual habla de un estado heterocigoto en el exón 1. Con base en todos los datos anteriores se pudo establecer que en el exón 1 del gen de la 5 α -reductasa Tipo 2 existe un polimorfismo génico.

Posterior a la identificación de los exones en los que presumiblemente se encontraban las mutaciones en los individuos afectados, se procedió a secuenciar, en ambas direcciones, cada uno de dichos exones. En todos los casos estudiados, salvo en el paciente 1, se determinó que las mutaciones eran puntuales. En el paciente 8 se pudo determinar con precisión la mutación existente en el exón 1. Esta consistió en la sustitución del aa glicina por arginina en la posición 34 (G34R) (fig. 12). En el resto de los individuos estudiados, se encontró que la mutación específica estaba localizada en el exón 4. Los pacientes 2, 3 y 4 (hermanos) y 7 presentaron la misma mutación; esto es, la sustitución del aa prolina por arginina en la posición 212 (P212R) (fig. 13). Los hermanos (sujetos 5 y 6) presentaron

FIGURA 8

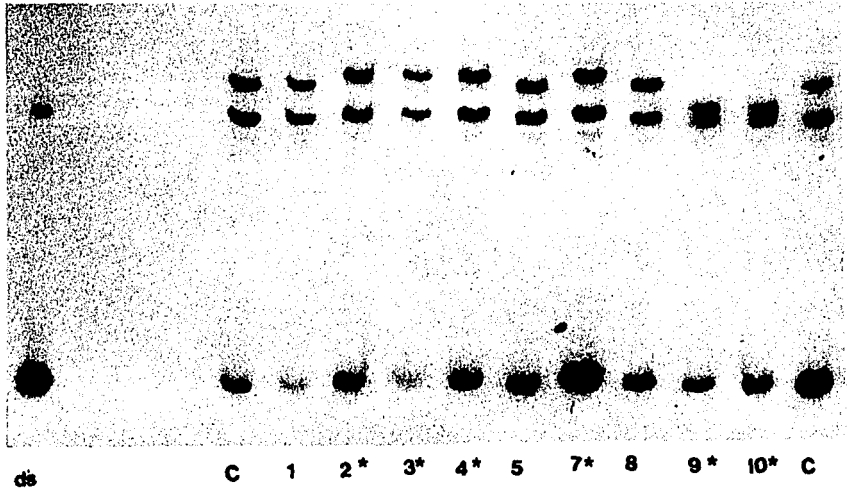


C = control
ds = ADN de doble cadena

Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 1 del gen de la enzima Tipo 2 de la 5α -reductasa humana. El patrón de migración electroforética de todos los pacientes es igual al de los controles; sin embargo, dicho patrón se encontró alterado en los sujetos 1 y 8.

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 9

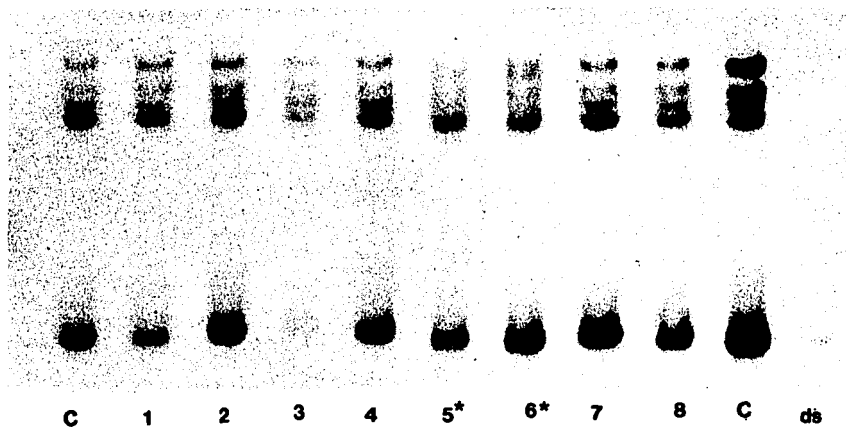


C = control
ds = ADN de doble cadena

Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 4 del gen de la enzima Tipo 2 de la 5α -reductasa humana. El patrón de migración electroforética de los pacientes 2,3,4,7,9 y 10 se encontró alterado con respecto al de los controles.

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 10

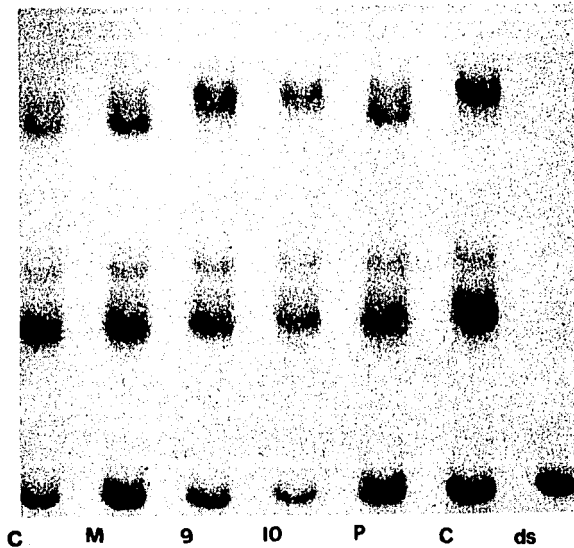


C = control
ds = ADN de doble cadena

Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 4 del gen de la enzima Tipo 2 de la 5 α -reductasa humana. El patrón de migración electroforética de los pacientes 5 y 6 se encontró alterado con respecto al de los controles.

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 11



ds = ADN de doble cadena

Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas del ADN del exón 1 del gen de la enzima Tipo 2 de la 5 α -reductasa humana. En el patrón de migración electroforética se puede observar dos bandas de migración diferentes tanto en los padres de los sujetos 9 y 10 (M y P), así como en el control (C) de la izquierda. Los pacientes 9 y 10 al igual que el control de la derecha presentan un sola banda.

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 12



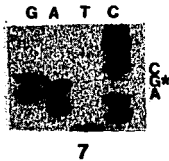
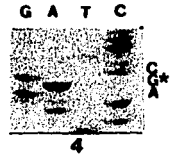
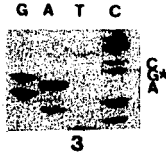
G34R

C = control

Secuenciación del exón 1 del gen de la 5α -reductasa Tipo 2 en el humano. Obsérvese que el sujeto afectado (paciente 8) presenta una sustitución de la base G por la base A, que conduce al cambio del aminoácido glicina por el aminoácido arginina en la posición 34 de la proteína.

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 13



P212R

C = control

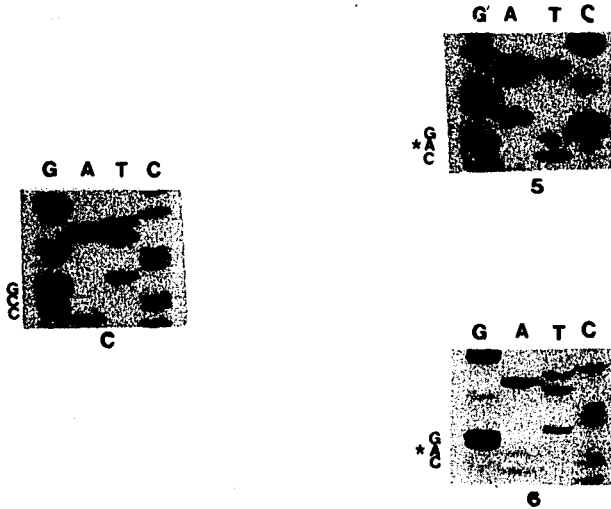
Secuenciación del exón 4 del gen de la 5 α -reductasa Tipo 2 en el humano. Obsérvese que los sujetos afectados (2,7 y hermanos 3 y 4) presentan una sustitución de la base C por la base G, que conduce al cambio del aminoácido prolina por el aminoácido arginina en la posición 212 de la proteína.

FALLA DE ORIGEN

sustitución del aa alanina por ácido aspártico en la posición 207 (A207D) (fig. 14). En los pacientes 9 y 10 (hermanos) se detectó una mutación sin sentido en la cual el aa arginina fue sustituido por un codón de terminación prematuro en la posición 227 (R227*). Los padres de estos sujetos por su condición de portadores heterocigotos, presentaron tanto el alelo normal que codifica para el aa arginina (codón CGA), como el mutado que corresponde a un codón de terminación prematuro (codón TGA) (fig. 15). Debido al hallazgo, mediante el SSCP, de la existencia de polimorfismo en la migración de las cadenas sencillas del ADN del exón 1, se procedió a secuenciar el mismo en los pacientes 9, 10, en sus padres y en los dos controles, en los que se había observado dicho fenómeno. En ambos padres y en un control se identificó la presencia de dos alelos, uno que codifica para el aa valina (codón GTA) y el otro para el aa leucina (codón CTA) en la posición 89, lo que demuestra su condición de heterocigotos. A diferencia de los sujetos anteriores, los dos hermanos y el otro control fueron homocigotos para el aa valina (codón GTA) (fig. 16). Hasta el momento no hemos podido encontrar sujetos normales homocigotos para el aa leucina.

En resumen, se encontraron 7 mutaciones con sentido erróneo y 2 mutaciones sin sentido (tabla 5). No se pudo encontrar la mutación después de la secuenciación de todos los 5 exones del paciente 1.

FIGURA 14



A207D

C= control

Secuenciación del exón 4 del gen de la 5α -reductasa Tipo 2 en el humano. Obsérvese que los sujetos afectados (hermanos 5 y 6) presentan una sustitución de la base C por la base A, que conduce al cambio del aminoácido alanina por el ácido aspártico en la posición 207 de la proteína.

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 15



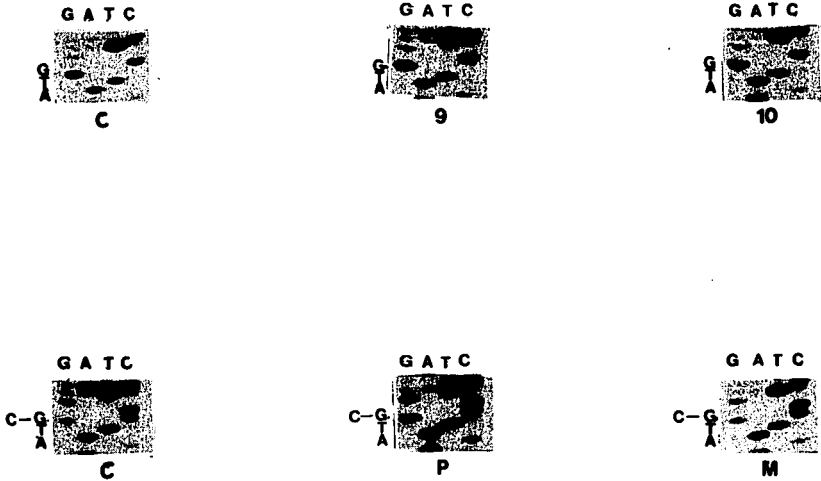
R227*

C= control

Secuenciación del exón 4 del gen de la 5α -reductasa Tipo 2 en el humano. Obsérvese que los sujetos afectados (hermanos 9 y 10) presentan una sustitución de la base C por la base T, que conduce al cambio del aminoácido arginina por un codón de terminación prematuro en la posición 227 de la proteína. Los padres (M y P) de los pacientes afectados presentan tanto el alelo observado en los controles como aquel existente en los pacientes afectados.

FALLA DE ORIGEN

FIGURA 16



V89/L89

C = control

Secuenciación del exón 1 del gen de la 5 α -reductasa Tipo 2 en el humano. Obsérvese que los sujetos afectados (hermanos 9 y 10) y un sujeto control presentan en el codón 89 el triplete GTA que codifica al aminoácido valina. Los padres (M y P) de los pacientes afectados, así como un control presentan tanto el codón CTA que codifica para el aminoácido leucina como aquel existente en los pacientes afectados.

FALLA DE ORIGEN

TABLA 5**MUTACIONES PUNTUALES DEL GEN DE LA
5 α -REDUCTASA TIPO 2 EN 10 PACIENTES CON
DEFICIENCIA PRIMARIA DE LA ENZIMA**

| PACIENTE | EXON | NUCLEOTIDO | MUTACION |
|-----------------|-------------|-------------------|-----------------|
| 1 | - | N.D. | N.D. |
| 2 | 4 | C \rightarrow G | P212R |
| 3 | 4 | C \rightarrow G | P212R |
| 4 | 4 | C \rightarrow G | P212R |
| 5 | 4 | C \rightarrow A | A207D |
| 6 | 4 | C \rightarrow A | A207D |
| 7 | 4 | C \rightarrow G | P212R |
| 8 | 1 | G \rightarrow A | G34R |
| 9 | 4 | C \rightarrow T | R227* |
| 10 | 4 | C \rightarrow T | R227* |

N.D. = NO DETECTADO

DISCUSION

Se realizó el estudio molecular de 10 sujetos con diagnóstico comprobado de pseudohermafroditismo masculino secundario a deficiencia primaria de 5α -reductasa, así como a los padres de 2 hermanos afectados. Previo al inicio de este proyecto, seis de estos pacientes habían sido estudiados clínica, bioquímica y endocrinológicamente (51).

La deficiencia primaria de 5α -reductasa fue originalmente descrita en 1974 tanto en una familia de la República Dominicana como en 2 individuos afectados de los E.U. (39,40). Desde entonces se han reportado varios casos de pacientes con esta deficiencia en diferentes partes del mundo (43-51). En nuestros 10 pacientes, los genitales externos al nacimiento fueron ambiguos, caracterizados por hipospadia perineoescrotal con pseudovagina y en todos ellos el sexo de asignación fue femenino. A su ingreso los estudios endocrinológicos confirmaron, en todos los casos, el diagnóstico de deficiencia primaria de 5α -reductasa.

Se han descrito dos genes que codifican la síntesis de dos enzimas diferentes con actividad de 5α -reductasa (74-77,79). La Tipo 1, de la cual se ha documentado que no está relacionada con la deficiencia primaria de 5α -reductasa, ya que en los pocos individuos estudiados, se expresa normalmente y en los estudios moleculares realizados en los cinco exones del gen que la codifica en 5 pacientes con la deficiencia, no relacionados y de diferentes grupos étnicos, no demostraron la presencia de ningún tipo de mutación (74). Por otro lado, la clonación del ADNc de la 5α -reductasa Tipo 2, que es la enzima específica relacionada con la 5α -reducción en el área genital, ha permitido determinar con precisión las mutaciones responsables de la deficiencia de dicha enzima (77), como se demuestra con el estudio molecular de 37 familias pertenecientes a 25 grupos étnicos diferentes (78,80,89).

Los pacientes pertenecían a 7 familias de diversas entidades de la República Mexicana y no se encontraban relacionados entre sí. En ninguno de los sujetos estudiados, se encontró la presencia de delección del gen 1 de la 5 α -reductasa humana, lo que concuerda con lo descrito previamente en los pacientes con deficiencia primaria de 5 α -reductasa estudiados genéticamente y molecularmente (74,77). Este hallazgo confirma que la enzima Tipo 1, codificada por el gen 1 no es la enzima específica encargada de la 5 α -reducción genital en el humano. El primer estudio molecular del gen 2 en pacientes con deficiencia primaria de 5 α -reductasa en un grupo de sujetos de Nueva Guinea, demostró la presencia de delección completa del gen 2 (77). Nosotros no observamos este tipo de alteración molecular en ninguno de nuestros pacientes estudiados mediante la técnica de PCR.

La técnica de SSCP nos indicó que los 10 pacientes de las 7 familias estudiadas presentaban alteraciones en la movilidad electroforética de las cadenas sencillas del ADN, dos de ellos en el exón 1, y 8 en el exón 4, lo que se traduce en presencia de mutaciones en dichos exones. Esta técnica también demostró que los padres de 2 de esos sujetos (9 y 10) eran portadores heterocigotos, lo que concuerda con la forma de herencia de este padecimiento que es autosómica recesiva (41,42). La secuenciación de los exones presumiblemente afectados reveló la existencia de mutaciones puntuales en todos los sujetos estudiados salvo en el caso 1. Todas las mutaciones determinadas en nuestros pacientes, son iguales a otras previamente descritas en la literatura (78,80,89). El 80% de éstas se localizaron en el exón 4, siendo la mutación que predominó en nuestras familias la sustitución del aa P212R (42% de los casos). Si bien la alta frecuencia de la mutación mencionada podría explicarse perfectamente por una mutación tipo recurrente ("hot spots"), como se observa en el caso de la mutación R246W entre familias de Egipto (5R2-Cairo-1), Brasil (5R2-Sao Paulo-1) y la República Dominicana; no puede descartarse totalmente un

efecto de gen fundador comunicado en otras poblaciones (90). Por ejemplo, 5R2-Malta 1 y 5R2-Malta-2 descritos por Thigpen (80) son debidos a una delección homocigótica de 2 pares de bases en el nucleótido 359 del exón 2. Otro sujeto de Malta (5R2-London-2) es un heterocigoto compuesto quien posee la misma delección en un alelo y una mutación en sentido erróneo en el otro alelo (R171S). Asimismo, un sujeto siciliano (5R2-Nueva York-1) posee la mutación en sentido erróneo R171S en un alelo y una segunda mutación en sentido erróneo en otro alelo (G34R). Con base en lo anterior, pareciese que un portador heterocigoto de Malta o de Sicilia fue el responsable de diseminar la mutación R171S. Es por demás interesante que tres grandes grupos con deficiencia de 5 α -reductasa han sido descritos en diferentes partes del mundo ya que la familia de la República Dominicana tiene 47 miembros afectados (39,91), el grupo Turco posee 12 sujetos afectados (50) y el de Nueva Guinea 13 miembros afectados (49). En el caso de los grupos de la República Dominicana y Turquía la recurrencia de la mutación probablemente sea consecuencia de un efecto de fundador en regiones geográficas aisladas en las que hay un alto coeficiente de consanguinidad. Por ello, también el grupo Turco posee una alta incidencia de otra enfermedad poco común heredada de manera recesiva que es la deficiencia de 17 β -oxoesteroide reductasa (92). Estos hallazgos amplían lo reportado en cuanto a la existencia de mutaciones idénticas en individuos que habitan en diferentes partes del mundo y que pertenecen a diferentes grupos étnicos (78,80,80). En el caso de nuestros pacientes se observó que éstos presentaban las mismas mutaciones que los individuos de origen mexicano-americano y vietnamita (G34R; sujeto 8), mexicano-americano (P212R; pacientes 2, 7 y los hermanos 3 y 4), austriaco (A207D; hermanos 5 y 6), criollo-brasileño y mexicano-americano (R227*; hermanos 9 y 10). Con base en lo anterior se podría postular que en esta deficiencia enzimática existen sitios susceptibles a mutaciones en el gen.

Por otro lado, hay que señalar que intencionadamente se intentó determinar si las mutaciones encontradas tenían correlación con el fenotipo presente en nuestros pacientes. Como se mencionó anteriormente todos ellos presentaban PPSH y durante la infancia no se había presentado ningún dato que indicase virilización o ambigüedad genital. Sin embargo, los dos últimos casos presentaron durante la infancia un fenotipo más virilizado que el existente en el resto de los individuos, fue por ello que los padres solicitaron atención médica para los niños desde la infancia. Ahora bien, dichos sujetos presentaron una mutación diferente (codón de terminación prematuro en la posición 227) a la del resto de los sujetos estudiados. Dicha mutación también ha sido reportada en un paciente estudiado por Johnson (69) y en otro estudiado por Thigpen (80). El paciente reportado por Thigpen también presentó un grado de virilización en la infancia mayor a lo habitual en estos pacientes, razón por la cual fue diagnosticado a los 3 años de edad; sin embargo, en el caso reportado por Johnson dicho paciente aparentemente presentó genitales femeninos durante la infancia. Es por demás importante señalar que son muy raros los casos de deficiencia de 5α -reductasa que se diagnostican en etapas tempranas de la vida ya que habitualmente no se presenta ambigüedad genital. Por ello, es significativo que 3 de los 4 casos existentes en la literatura en los que existe mutación de este tipo presentan un fenotipo "más masculino" durante la infancia. Ahora bien, el porqué la terminación prematura en esa posición condiciona el fenotipo antes descrito tendrá que ser motivo de estudio posterior ya que por el momento no nos es posible determinar con precisión la causa de este hallazgo. La posibilidad de que este fenotipo sea debido a que la mutación se encuentra en la parte final del gen y que por ello se sintetice una proteína con mayor actividad que aquella existente en otros sujetos afectados, queda descartada ya que han sido reportado pacientes con mutaciones puntuales en el exón 5 que presentan fenotipo totalmente

femenino durante la infancia.

En el caso del paciente 1, el SSCP indicó la presencia de alteración del exón 1. Después de haberse secuenciado dicho exón en 5 ocasiones diferentes, en ambos sentidos, no se pudo precisar la mutación específica. Ahora bien, en este sujeto en el codón 89 se encuentra la presencia de una leucina (CTA) en lugar de una valina (GTA) que fue el aa encontrado en el resto de nuestros pacientes. Se ha descrito que dicha sustitución en la secuencia del gen 2 de la 5α -reductasa es normal, refiriéndose que probablemente se trata de un polimorfismo genético sin expresión fenotípica (79). Si tomamos en consideración que el SSCP detecta cambios tan sutiles como es la sustitución de una sola base, este polimorfismo que se observa inclusive en sujetos normales y en pacientes con deficiencia de esta enzima en los cuales se ha demostrado la mutación en otro codón, condicionó los cambios observados en el SSCP del exón 1 de este individuo. Con base en lo anterior y tomando en consideración que en este sujeto se realizaron cuando menos 3 SSCP para cada exón (variando las condiciones experimentales) y en ningún caso se logró determinar alteración alguna en el patrón de movilidad electroforética, podemos concluir que en este caso la mutación que dió origen a la deficiencia de 5α -reductasa es intrónica, que se encuentra a nivel de promotor o que es una mutación *trans*. Hay que señalar que en uno de los sujetos estudiados por Thigpen (80) y posteriormente por Wilson (78) tampoco se pudo determinar la mutación precisa que dio origen a la deficiencia de 5α -reductasa.

En relación con el polimorfismo antes referido hay que señalar que en el SSCP del exón 1 de los sujetos 9 y 10 (hermanos) así como en un control normal, se observó un patrón de migración electroforética que indicaba un estado homocigoto; a diferencia de los padres de dichos pacientes, quienes tenían un patrón de migración heterocigoto. Al secuenciar dicho exón en los sujetos anteriores, se demostró que esta diferencia de migración era en

efecto debido a la presencia del aa valina en el codón 89 en los pacientes 9, 10 y en uno de los controles que difería de los otros pacientes y de otros controles que presentaban un estado heterocigoto en el aa antes referido (valina y leucina). En este estudio no encontramos pacientes y/o controles homocigotos para leucina como fue descrito originalmente por Labrie (79). Con base en los datos anteriores podemos concluir que efectivamente existe un polimorfismo del gen 2 de la 5 α -reductasa para el codón 89 localizado en el exón 1.

En conclusión se pudo confirmar, mediante este estudio que abarca el 16% del total de las familias afectadas en el mundo, que es el gen conocido como el 2 de la 5 α -reductasa humana el que al presentar mutaciones (por lo general puntuales) en su genoma determina las alteraciones fenotípicas, bioquímicas y endocrinológicas previamente descritas. Sin embargo, en uno de nuestros pacientes, al igual que en otro informado en la literatura, no se pudo precisar con exactitud la mutación específica que dió origen al padecimiento. Las diversas mutaciones no manifiestan diferencias fenotípicas entre los sujetos afectados y tanto en el presente estudio como en el de otros autores ha sido imposible precisar una correlación entre las características clínicas y endocrinológicas con las mutaciones detectadas. Esto es cierto excepto por lo observado en los casos 9 y 10, pacientes que son portadores en estado homocigoto de una mutación sin sentido que dió lugar a un codón de terminación prematuro en la posición 227. Dichos sujetos presentan un fenotipo "más masculino", pudiéndose interpretar esta hallazgo como una correlación fenotipo-mutación.

Otro hallazgo muy interesante en esta familia es que ambos pacientes son homocigotos para la mutación de un codón de terminación prematuro (tripleto UGA) en el exón 4 y para el polimorfismo dado por el codón GTA que codifica para el aa valina en el exón 1. Sus progenitores son heterocigotos tanto para el primero (codones UGA/CGA) como para el

segundo (GTA/CTA); es decir, valina/leucina. La única interpretación posible para este hallazgo sería que tanto la mutación responsable de la deficiencia primaria de 5 α -reductasa, como el polimorfismo detectado, estén en posición intragénica *cis*; es decir, que el codón de terminación prematuro UGA del exón 4, está en posición *cis* con el codón GTA del exón 1, que codifica para el aa valina. Esto demuestra que tanto la mutación como el polimorfismo segregan juntos, ya que sería casi imposible que ocurriese un entrecruzamiento intragénico que separase el exón 1 del exón 4 dando lugar a un gen recombinado que tuviese la mutación en el exón 4 además del codón CTA el cual codifica para el aa leucina, modificando la posición *cis* (UGA-GTA) a posición *trans* (UGA-CTA). Si bien en esta familia no se pudo, por interrogatorio, confirmar consanguinidad de los padres, los hallazgos mencionados sugieren fuertemente esta posibilidad; ya que los padres comparten "un mismo cromosoma" con la mutación para la deficiencia primaria de 5 α -reductasa y el polimorfismo sin expresión fenotípica en el exón 1, son originarios de una misma ciudad y sus antepasados por generaciones oriundos del mismo estado.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. In: Labhart A, et al. eds. *Monographs on Endocrinology*. Berlin. Springer Verlag. 1967;5
2. Jacobs P and Ross A. Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature (London)*. 1966;210:352.
3. Book J, et al. Isochromosome Y and female phenotype. *Clin Genet*. 1973;4:410.
4. Jirásek J. Development of the genital system and male pseudohermaphroditism. In: Cohen M. ed. Baltimore. John Hopkins University Press. 1971.
5. Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H y Pérez-Palacios G. Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Invest Clin (Mex)*. 1982;34:349.
6. McKay D, et al. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rev*. 1953;117:201.
7. Sinclair A, Berta P, Palmer M, et al. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346:240.
8. López M, Torres L, Méndez JP, et al. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am J Med Genet*. 1995;55:356.
9. Jost A. Problems of fetal endocrinology. The gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Progr Horm Res*. 1953;8:379.
10. Jost A, et al. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res*. 1973;29:1.
11. Grumbach M and Conte F. Disorders of sex differentiation. In: Wilson J and Foster D. eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 8th. ed. Philadelphia. Saunders. 1992;853.
12. Jirásek J. The relationship between the structure of the testis and differentiation of the external genitalia and phenotype in man. In: Wolstenholme G and O'Connor M. eds. *Endocrinology of the testis*. Boston. Little Brown & Co. 1967;3.
13. Serra G, Pérez-Palacios G, and Jaffe R. De novo testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1979;10:128.
14. Savard K, et al. Biosynthesis of androgen from progesterone by human testicular tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1956;16:1629.
15. Pérez-Palacios G y Pérez A. Integración endócrina de la unidad fetoplacentaria y patología del testículo fetal. En: Malacara J y cols. eds. *Fundamentos de Endocrinología Clínica*. México. La prensa Médica Mexicana. 1978;232.
16. Siitari P and MacDonald P. Role of extraglandular estrogen in human endocrinology. In: Greep R and Astwood E. eds. *Handbook of Physiology*, vol II, Endocrinology. Washington. American Physiological Society. 1973;Sec7:615.
17. MacDonald P, Madden J, Brenner P, et al. Origin of estrogen in normal men and in women with testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab*. 1979;49:905.

18. Wilson J. Metabolism of testicular androgens. In: Greep R and Astwood E. eds. Handbook of Physiology. Endocrinology, Male Reproductive System vol V. Washington. American Physiological Society. 1975;Sec 7:491.
19. Pardridge W. Serum bioavailability of sex steroid hormones. Clin Endocrinol Metab. 1986;15:259.
20. Lasznitzki I, Franklin H and Wilson J. The mechanism of androgen uptake and concentration by rat ventral prostate in organ culture. J Endocrinol. 1974;60:81.
21. Wilbert D, Griffin J and Wilson J. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. J Clin Endocrinol Metab. 1983;56:113.
22. Grino P, Griffin J and Wilson J. Transformation of the androgen receptor to the deoxyribonucleic acid-binding state: Studies in homogenates and intact cells. Endocrinology. 1987;120:1914.
23. Lubahn D, Joseph D, Sullivan P, et al. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. Science. 1988;240:1914.
24. Chang C, Kokontis J and Liao S. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. Science. 1988;240:324.
25. Trapman J, Klaassen P, Kuiper G, et al. Cloning, structure, and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1988;153:241.
26. Clark J, Schrader W and O'Malley B. Mechanisms of steroid hormone action. In: Wilson J and Foster D. eds. Williams Textbook of Endocrinology, 7th. ed. Philadelphia. Saunders. 1985;33.
27. George F and Wilson J. Embryology of the genital tract. In: Walsh P, et al. eds. Campbell's Urology. Philadelphia. Saunders. 1986;1804.
28. Goldstein J and Wilson J. Hereditary disorders of sexual development in man. In: Motulsky A and Lentz W. eds. Birth Defects International Congress Series 310. Amsterdam. Excerpta Medica. 1974;11:1.
29. Wilson J and Goldstein J. Classification of hereditary disorders of sexual development. In: Bergsma D. ed. Genetic Forms of Hypogonadism. New York. Birth Defects: Original Article Series. Stratton Corp. 1975;11:1.
30. Griffin J and Wilson J. Disorders of sexual differentiation. In: Walsh PC, et al. ed. Campbell's Urology. Philadelphia. Saunders. 1986;1819.
31. Guerrier D, Tran D, Vanderwinden J, et al. The persistent Müllerian duct syndrome: A molecular approach. J Clin Endocrinol Metab. 1989;68:46.
32. Savage M, Chaussain J, Evain D, et al. Endocrine studies in male pseudohermaphroditism in childhood and adolescence. Clin Endocrinol. 1978;8:219.
33. Campo S, Monteagudo C, Nicolau G, et al. Testicular function in prepubertal male pseudohermaphroditism. Clin Endocrinol. 1979;11:481.
34. Campo S, Monteagudo C, Nicolau G, et al. Testicular function in prepubertal male pseudohermaphroditism. Clin Endocrinol. 1981;14:11.
35. Albright F, Burnett C, Smith P and Parson W. Pseudohypoparathyroidism- An example of "Seabright-Bantam Syndrome". Endocrinology. 1942;30:922.

36. Wilkins L. Abnormal sex differentiation: Hermaphroditism and gonadal dysgenesis. In: Springfield I and Thomas Ch. *The Diagnosis and Treatment of Endocrine Disorders in Childhood and Adolescence*. 2th. ed. 1975;258.
37. Sai T, Seino S, Chang C, et al. An exoning point mutation of the androgen receptor gene in a family with complete androgen insensitivity. *Am J Hum Genet*. 1990;46:1095.
38. Quigley Ch, De Bellis A, Marschke K, et al. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev*. 1995;16:271.
39. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T and Peterson R. Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*. 1974;186:1213.
40. Walsh P, Madden J, Harrod M, et al. Familial incomplete male pseudohermaphroditism type 2: decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *N Engl J Med*. 1974;291:944.
41. Simpson J, New M, Peterson R, German J. Pseudovaginal perineoscrotal hipospadias (PPSH) in sibs. *Birth Defects. Original artical series*. Baltimore. Willians and Wilkins. 1971;7:140.
42. Opitz J, Simpson J, Sarto G, et al. Pseudovaginal perineoscrotal hipospadias. *Clin Genet*. 1972;3:1.
43. Saenger P, Goldman A, Levine L, et al. Prepubertal diagnosis of steroid 5 α -reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978;47:627.
44. Fisher L, Kogut M, Moore R, et al. Clinical, endocrinological, and enzymatic characterization of two patients with 5 α -reductase deficiency: evidence that a single enzyme is responsible for the 5 α reduction of cortisol and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978;47:653.
45. Imperato-McGinley J, Peterson R, Leshin M, et al. Steroid 5 α -reductase deficiency in a 65-year-old male pseudohermaphrodite: the nature history, ultrastructure of the testes, and evidence for inherited enzyme heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;50:15.
46. Savage M, Preece M, Jeffcoate S, et al. Familial male pseudohermaphroditism due to deficiency of 5 α -reductase. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1980;12:397.
47. Mauvais-Jarvis P, Kuttann F, Mowszowicz I and Wright F. Different aspects of 5 α -reductase deficiency in male pseudohermaphroditism and hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1981;14:459.
48. Price P, Wass J, Griffin J, et al. High dose androgen therapy in male pseudohermaphroditism due to 5 α -reductase deficiency and disorders of the androgen receptor. *J Clin Invest*. 1984;74:1496.
49. Imperato-McGinley J, Miller M, Wilson J, et al. A cluster of male pseudohermaphrodites with 5 α -reductase deficiency in Papua New Guinea. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1991;34:293.
50. Akgun S, Ertel N, Imperato-McGinley, et al. Familial male pseudohermaphroditism due to 5 α -reductase deficiency in a turkish village. *Am J Med*. 1986;81:267.
51. Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Imperato McGinley J, et al. Male pseudohermaphroditism due to primary 5 α -reductase deficiency: variation in gender identity reversal in seven mexican patients from five different pedigrees. *J Endocrinol Invest*. 1995;18:205.
52. Griffin J and Wilson J. The androgen resistance síndrome: 5 α - reductase deficiency, testicular feminization and related disorders. In: Scriver C, et al. eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 6th. ed. New York. Mc Graw-Hill. 1989;1919.

53. Carpenter T, Imperato-McGinley J, Boulware S, et al. Variable expression of 5- α -reductase deficiency: presentation with male phenotype in a child of greek origin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71:318.
54. Ng W, Taylor N, Hughes I, et al. 5 α -reductase deficiency without hypospadias. *Arch Dis Child.* 1990;65:1166.
55. Cai L, Fratianni C, Gautier T and Imperato-McGinley J. Dihydrotestosterone regulation of semen in males pseudohermaphrodites with 5 α -reductase-2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:409.
56. Imperato-McGinley J, Peterson R, Gautier T, et al. Decreased urinary C19 and C21 steroid 5 α -metabolites in parents of male pseudohermaphrodites with 5 α -reductase deficiency: detection of carries. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60:553.
57. Imperato-McGinley J, Peterson R, Gautier T, et al. Decreased urinary C19 and C21 steroid 5 α metabolites in parents of male pseudohermaphrodites with 5 α -reductase deficiency: Detection of carriers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;54:931.
58. Imperato-McGinley J, Peterson R, Gautier T and Sturla E. The impact of androgens on the evolution of male gender identity. *N Engl J Med.* 1979;300:1233.
59. Harris G. Sex hormones, brain development and brain function. *Endocrinology.* 1964,75:627.
60. Pfaff D and Zigmond R. Neonatal androgen effects on sexual and non-sexual behavior of adult rats tested under various hormone regimens. *Neuroendocrinology.* 1971;7:129.
61. Clarke I. The sexual behavior of prenatally androgenized ewes observed in the field. *J Reprod Fertil.* 1977;49:311.
62. Goy R, Wolf J and Eisle S. Experimental female hermaphroditism in rhesus monkeys: anatomical and psychological characteristics. In: Husaph H and Money J, eds. *Handbook of Sexology.* Amsterdam. Excerpta Medica. 1976;136.
63. Barraclough C. Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones. *Recent Prog Horm Res.* 1966;22:503.
64. Nottenbohm and Arnold A. Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science.* 1976;194:211.
65. Gorski R, Gorden J, Shryne J, et al. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 1978;148:333.
66. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248.
67. Money J and Hampson J. Hermaphroditism: recommendations concerning assignment of sex, change of sex, and psychologic management. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1955;97:284.
68. Money J and Ehrhardt A. *Man and Woman Boy and Girl: The differentiation and dimorphism of gender identity from conception to maturity.* Baltimore. Johns Hopkins University Press. 1972.
69. Johnson L, George F, Neaves W, et al. Characterization of the testicular abnormality in 5 α -reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63:1091.
70. Imperato-McGinley J, Gautier T, Pichardo M and Shackleton C. The diagnosis of 5 α -reductase deficiency in infancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63:1313.

71. Greene S, Zachmann M, Manella B, et al. Comparison of two tests to recognize or exclude 5 α -reductase deficiency in prepubertal children. *Acta Endocrinol.* 1987;114:113.
72. Moore R, Griffin J and Wilson J. Diminished 5 α -reductase activity in extracts of fibroblasts cultured from patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism, Type 2. *J Biol Chem.* 1975;250:7168.
73. Leshin M, Griffin J and Wilson J. Hereditary male pseudohermaphroditism associated with an unstable form of 5 α -reductase. *J Clin Invest.* 1978;62:685.
74. Jenkins E, Andersson S, Imperato-Mc Ginley J, et al. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 α -reductase. *J Clin Invest.* 1992;89:293.
75. Jenkins E, Hsieh C, Milatovich A, et al. Characterization and chromosomal mapping of human steroid 5 α -reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue. *Genomics.* 1991;11:1102.
76. Andersson S, Bishop R and Russell D. Expression cloning and regulation of steroid 5 α -reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. *J Biol Chem.* 1989;264:16249.
77. Andersson S, Berman D, Jenkins E, and Russell D. Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature.* 1991;354:159.
78. Wilson J, Griffin J and Russell D. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev.* 1993;14:577.
79. Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, et al. Structure of human II 5 α -reductase gene. *Endocrinology.* 1992;131:1571.
80. Thigpen A, Davis D, Milatovich A, et al. Molecular genetics of steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *J Clin Invest.* 1992; 90:799.
81. Rosenwald A. Psychological examination. In: Arieti S. ed. *American Handbook of Psychiatry.* New York. Basic Books INC. 1974;1184
82. Diamond M. Human sexual development: biological foundations for sexual development. In: Beach F. ed. *Human Sexuality in Four Perspectives.* Baltimore. Johns Hopkins University Press. 1974:29.
83. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98:503
84. Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor La. Press 2nd ed. 1989:1
85. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T and Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 1989;5:874.
86. Vidal-Puig A and Moller D. Comparative sensitivity of alternative single-strand conformation polymorphism (SSCP) methods. *Biotechniques.* 1994;17:490.
87. Fratianni C and Imperato-McGinley J. The Syndrome of 5 α -reductase deficiency. *Endocrinologist.* 1994;4:302.
88. Sanger F, Nicklen S and Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74:5463.

89. Wigly W, Prihoda J, Mowszowicz I, et al. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 α -reductase 2 isoenzyme. *Biochem*. 1994;33:1265.
90. Cavalli-Sforza L, Merozzi P and Piazza A. *The history and geography of human genes*. Princeton, New Jersey. Princeton University Press. 1994.
91. Thigpen A, Davis D, Gautier T, et al. Brief report: The molecular basis of steroid 5 α -reductase deficiency in a large Dominican kindred. *N Engl J Med*. 1992;327:1216.
92. Imperato-McGinley J, Akgun S, Ertel N, et al. The coexistence of male pseudohermaphrodites with 17-ketosteroid reductase deficiency and 5 α -reductase deficiency within a Turkish kindred. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1987;27:135.