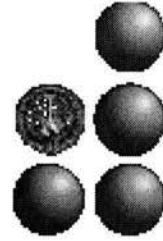


11204



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN

DEFICIENCIA DE 5 ALFA REDUCTASA TIPO 2:
DESCRIPCIÓN CLÍNICA, ENDOCRINOLÓGICA Y
GENÉTICA DE LOS CASOS EN EL INCMNSZ.

TESIS DE ESPECIALIDAD
PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
HUMANA

PRESENTA:
DRA. ANA ROSAURA ABAROA SALVATIERRA

TUTOR DE TESIS:
DR. FERNANDO LARREA GALLO

México D. F. Septiembre del 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

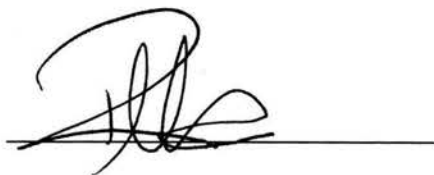
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Dr. Fernando Larrea Gallo
Profesor Titular del Curso en
Biología de la Reproducción Humana
INCMNSZ



Dr. Luis Federico Uscanga
Director de Enseñanza
INCMNSZ



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIRECCION DE ENSEÑANZA
México, D.F.



SUBDIRECCIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por que me ha permitido llegar hasta donde estoy.

Gracias a mi madre y a Víctor por su apoyo, paciencia y cariño.

Gracias al Dr. Larrea por todas sus enseñanzas y

a la Dra. Bertha Chávez por el apoyo
recibido para llevar a cabo este trabajo.

ÍNDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Justificación.....	12
Objetivos.....	13
Materiales y Métodos.....	14
Resultados.....	17
Discusión.....	22
Conclusiones.....	25
Bibliografía.....	26

RESUMEN

Introducción: La deficiencia de 5 alfa reductasa es una condición clínica heredada de manera autosómica recesiva. Los sujetos afectados presentan la deficiencia completa o parcial de la actividad enzimática de la isoenzima tipo 2. Existen descritas alrededor de 38 mutaciones distintas con un patrón homocigoto o heterocigoto compuesto. La importancia de la enfermedad radica en su impacto sobre los mecanismos de diferenciación fenotípica, en sujetos genética y gonadalmente masculinos y sobre todo en el desarrollo adecuado de la identidad de género de los sujetos afectados. Las características clínicas están circunscritas a nivel del desarrollo de los genitales exteriores y el diagnóstico definitivo se basa en el análisis molecular del gen de la isoenzima tipo 2 de la 5 alfa reductasa. El establecimiento de la deficiencia enzimática puede establecerse también a través de la determinación de la actividad enzimática utilizando cultivos de fibroblastos obtenidos de la piel del área genital, o bien por la determinación de los metabolitos 5 alfa reducidos de la testosterona. El tratamiento se basa en la adecuada asignación o reasignación de género quirúrgico y psicológico.

Materiales y Métodos: Se revisaron 13 pacientes con diagnóstico de deficiencia primaria de 5 alfa reductasa en quienes se recopilaron los hallazgos clínicos, los métodos diagnósticos y las diferencias entre el sexo asignado al nacimiento y la identidad sexual en etapa adulta.

Resultados: El antecedente de consanguinidad fue positivo en 6 de los sujetos (46%). La presencia de familiares afectados fue en 7 /13 pacientes (53 %). El promedio de edad de los sujetos al tiempo de diagnóstico fue de 17 años, sin embargo las manifestaciones clínicas de los pacientes ocurrieron desde el inicio de la pubertad. El cariotipo en todos los casos fue 46, XY. Los hallazgos clínicos al ingreso fueron: pseudovagina en 8/13 (61.5%), seno urogenital 2/13(15.3%), hipospadias 13/13(100%), testículos inguinales, en labios o escrotos en 12 /13(92.3%), ginecomastia en 2 /13(15.3%). El diagnóstico bioquímico o de actividad enzimática se estableció con relación de T/DHT aumentada (basal o post estimulación con hormona gonadotropina coriónica) en 13/13(100%). Las concentraciones en suero de LH y FSH fueron normales de acuerdo con las observadas en sujetos normales de la misma edad. En el 92% de los sujetos el sexo de asignación al nacimiento fue femenino. El 83% de los sujetos con sexo de asignación femenino cambiaron, en la adolescencia, al sexo masculino y el resto (2 sujetos) permanecieron como femeninos. En todos los sujetos se llevó a cabo la identificación de mutaciones en el gen de la 5 alfa reductasa tipo 2 en muestras de DNA genómico obtenidas de sangre periférica, encontrando mutaciones en todos los casos pero al momento de este estudio solo fue posible obtener información de 10 casos encontrando: 4 casos con mutaciones homocigotas P212R del exón 4, 4 casos con mutaciones homocigotas A207D del exón 4 y 1 heterocigoto compuesto con mutaciones G115D del exón 2 y G203S del exón 4.

Conclusión: En todos los sujetos con sospecha clínica de deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2 se identificaron mutaciones a nivel molecular. La mayoría correspondieron a mutaciones puntuales localizadas en ambos alelos, ocasionando un simple cambio de base. Por otra parte, en este estudio se discuten los posibles mecanismos endocrinológicos que conducen a la instalación del sexo de identidad, independientes del sexo de asignación al nacimiento.

INTRODUCCIÓN

Bases endocrinológicas y moleculares de la deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2.

Los desordenes en la producción y acción de los andrógenos son las causas principales del cuadro clínico conocido como pseudohermafroditismo masculino. Entre estos se incluyen aquellas secundarias a mutaciones en los genes que codifican a las enzimas responsables de la síntesis de la testosterona, así como las que ocurren a nivel del receptor de andrógenos en los órganos blanco. ¹ Dentro de estas se encuentran la deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2 y los síndromes de insensibilidad parcial y completa a la acción de los andrógenos, respectivamente. ²

La acción de los andrógenos depende del tipo de tejido así como de la capacidad de los mismos de biotransformar a la testosterona en metabolitos con mayor actividad biológica. La testosterona es el principal andrógeno sintetizado y secretado por los testículos. La testosterona, por otra parte, es biotransformada en órganos periféricos como la próstata a su metabolito 5 alfa reducido la dihidrotestosterona. Ambas hormonas son reconocidas por el mismo receptor nuclear; sin embargo, la actividad biológica es diferente. Durante los procesos de diferenciación sexual y del desarrollo fenotípico del feto genéticamente masculino, la testosterona ocasiona la estimulación de los conductos Wolffianos y la dihidrotestosterona la virilización de los genitales externos, incluyendo la canalización de la uretra y el desarrollo de la próstata. ³

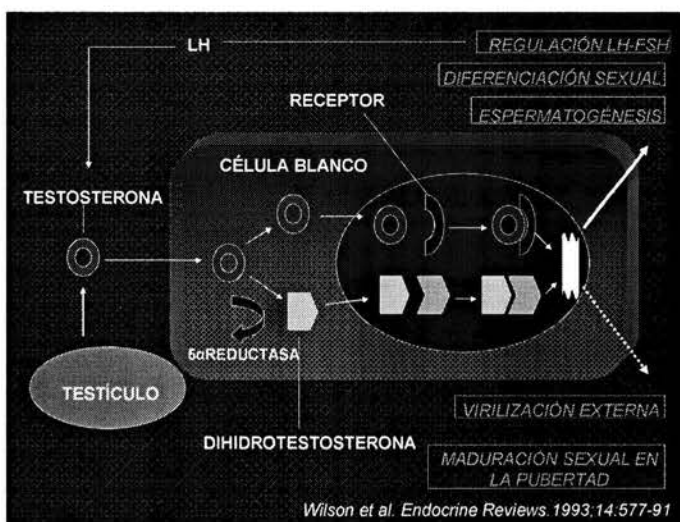


Figura 1.- Mecanismo de acción de los andrógenos. La testosterona se biotransforma en dihidrotestosterona en la célula blanco y actuando a través del mismo receptor nuclear ejercen distintos efectos biológicos.

En términos generales, el proceso de diferenciación sexual durante la embriogénesis consiste en tres eventos: el primero es el establecimiento del sexo cromosómico (46, XY en el hombre y 46, XX en la mujer), el segundo es la diferenciación de la gónada (determinación sexual) en donde, en caso del testículo, se han involucrado distintos genes, entre ellos el SRY, WT1, SF1 y SOX9 localizados en el cromosoma Y. Por último la tercera fase consiste en la formación del sexo fenotípico, el cual es ocasionado por la presencia de hormonas testiculares en el caso del varón o por la ausencia de las mismas en el caso de la mujer (diferenciación sexual).⁴

Para el desarrollo del fenotipo masculino se requiere de tres hormonas dos de origen testicular y una de origen periférico. La primera hormona antimulleriana es una glicoproteína sintetizada por las células de Sertoli del testículo fetal y cuya función es la regresión de los conductos Mullerianos, previniendo de esta manera el desarrollo del útero, las trompas de Falopio y el tercio superior de la vagina. La segunda hormona es la testosterona (T) formada por el testículo fetal y que actúa directamente sobre los conductos Wolffianos para diferenciarlos hacia el desarrollo de ambos epidídimos, los conductos deferentes y las vesículas seminales. La tercera hormona es la dihidrotestosterona (DHT), producto de la biotransformación de la testosterona por acción de la 5 alfa reductasa que tiene como función la virilización de los genitales exteriores y del seno urogenital.⁵

La testosterona es biotransformada a DHT por la enzima 5 α -reductasa la cual fue identificada en cultivos de fibroblastos de las personas afectadas con el síndrome ocasionado por la deficiencia de la misma.⁶ Se conocen dos isoenzimas de la 5 alfa reductasa la del tipo 1 y la del tipo 2. Estas enzimas son codificadas por distintos genes localizados en cromosomas diferentes, difiriendo en sus características fisicoquímicas tales como el pH óptimo de su acción catalítica. El gen de la 5 alfa reductasa tipo 2 se expresa principalmente en los tejidos blancos para la acción de los andrógenos y la tipo 1 en órganos como la piel y el hígado (tabla 1).⁷

	TIPO 1	TIPO 2
Tamaño	259 aminoácidos	254 aminoácidos
PH optimo	Neutro a básico	Ácido
Gen, localización cromosoma	SRD5A1, 5p15	SRD5A2, 2p23
Estructura del Gen	5 exones, 4 intrones	5 exones, 4 intrones
Actividad en el síndrome	Normal	Mutada
Expresión en próstata	Baja	Alta
Inhibición con Finasteride	Ki ≥ 300 nM	Ki = 3-5 nM

Tabla I.- Comparación de isoenzimas humanas de 5 α - reductasa.
Ki = concentración mínima inhibitoria.

La deficiencia de 5 alfa reductasa fue descrita en 1961 como una forma de pseudohermafroditismo masculino conocida como hipospadias perineoescrotal con pseudovagina o pseudohermafroditismo masculino incompleto familiar tipo 2. Esta condición se hereda con un patrón Mendeliano autosómico recesivo, pero no fue sino hasta 1974 cuando se describió la deficiencia de 5 alfa reductasa como la causa primaria del síndrome. En 1990, mediante el uso de metodología aplicada en biología molecular, se logró la purificación y caracterización de las propiedades de la enzima.^{8,9}

Los enfoques iniciales, utilizando tanto técnicas moleculares como bioquímicas dieron lugar a la identificación de una segunda isoenzima, así como a la identificación de mutaciones en las regiones codificantes del gen de la 5 alfa reductasa tipo 2¹⁰

La isoenzima tipo 1 es codificada por el gen SRD5A1 que se encuentra localizado en el cromosoma 5, y la isoenzima tipo 2 codificada por el gen SRD5A2 se ubica en la banda p23 del brazo corto del cromosoma 2. Ambos genes están constituidos por 5 exones y 4 intrones.^{11, 12} Estas dos enzimas comparten aproximadamente el 50% de homología en la secuencia de aminoácidos, y contienen, en la región aminoterminal, el dominio de reconocimiento a la testosterona y en el carboxilterminal el dominio de unión a la coenzima NADPH.

El estudio molecular de sujetos y familiares afectados, utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR), ha logrado identificar aproximadamente 38 mutaciones en 52 familias de distintas razas. Estas mutaciones incluyen: mutaciones puntuales, codones sin sentido y deleciones. Además ha permitido la descripción e identificación de genotipos homocigotos y heterocigotos compuestos, e incluso la presencia de patrones de herencia compatibles con disomía unipaternal.^{13,14}

Las poblaciones en donde la incidencia y prevalencia de pseudohermafroditismo masculino por deficiencia de 5 alfa reductasa es mayor se caracterizan por localizarse en

sitios apartados en donde la endogamia favorece la transmisión de enfermedades con patrones de herencia autosómicos recesivos.^{15,16}

Características clínicas y endocrinológicas

Como se describió previamente, la deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2 se acompaña de la disminución significativa de las concentraciones circulantes de DHT. Esta condición, en individuos 46, XY se acompaña de alteraciones en los mecanismos de diferenciación fenotípica durante el desarrollo embrionario y se manifiesta por la presencia de genitales exteriores ambiguos incluyendo hipospadias perineoescrotal, pseudovagina y criptorquidia bilateral. Estas características fenotípicas ocasionan que frecuentemente los individuos afectados sean asignados al sexo femenino, y por lo tanto educados con un patrón sociocultural propio del sexo.¹⁷ Es interesante mencionar que los individuos afectados al llegar a la edad de la pubertad desarrollan las características sexuales secundarias propias del sexo masculino (engrosamiento del tono de la voz, desarrollo de musculatura y talla de acuerdo al sexo masculino, crecimiento del falo, hiperpigmentación escrotal y en algunos casos descenso testicular). Por otra parte y como resultado de la deficiencia de 5 alfa reductasa los individuos afectados presentan alteraciones en el desarrollo adecuado de la glándula prostática la cual es de características prepuberales así como la presencia de escaso vello facial. Algunos individuos pueden presentar erecciones y eyaculaciones nocturnas.^{18 19}

El grado de alteración en el desarrollo y diferenciación fenotípica de los genitales exteriores al nacimiento es heterogéneo y puede variar en el grado de virilización. De esta manera se ha propuesto una clasificación de acuerdo al grado de alteración del desarrollo fenotípico, que incluye desde la presencia de genitales completamente femeninos hasta genitales de apariencia normal masculina. (Tabla 2)²⁰

TIPO	FENOTIPO
Tipo 1	Completamente masculino.
Tipo 2	Predomina fenotipo masculino con micropene e hipospadias.
Tipo 3	Ambigüedad completa.
Tipo 4	Predomina fenotipo femenino.
Tipo 5	Completamente femenino.

Tabla 2.-Clasificación fenotípica de la deficiencia de 5 alfa reductasa 2

Wilson y cols. describieron las características clínicas y endocrinológicas de 48 sujetos de distintas familias afectados con la deficiencia de 5 alfa reductasa encontrando consanguinidad en 18/48 sujetos y mutaciones homocigotos en 24/38 sujetos, lo cual podría parecer contradictorio, pero se puede explicar por ser sujetos provenientes de zonas rurales muy pequeñas en donde es frecuente la endogamia. Aproximadamente el 55% de los sujetos presentó pseudovagina como originalmente fue descrito sin embargo las características anatómicas variaron desde una ambigüedad parcial hasta una completa, incluso dentro de los sujetos pertenecientes a una misma familia. Las características que fueron comunes a todos los pacientes fueron la hipoplasia prostática y la identificación de testículos en área genital externa. (Tabla 3).³

Tabla 3.- Características clínicas, endocrinológicas y genéticas en la deficiencia de 5 α reductasa 2

Característica	Número sujetos afectados	Porcentaje
Consanguinidad	18/48	38
Historia familiar positiva	21/51	41
Pseudovagina	19/35	54
Seno urogenital	12/35	34
Hipospadias	8/38	21
Testículos en canal inguinal, labios o escroto	45/45	100
Espermatogénesis, ausente o muy disminuida	9/9	100

Ginecomastia	1/52	2
Metabolitos 5β/5α†	14/48	29
T/DHT en plasma†	48/49	99
Actividad ↓ de 5 alfa reductasa en fibroblastos	27/53	51
Elevación de LH	10/23	43
Elevación de FSH	12/23	52
Criados como hombres	7/42	17
Cambiaron de mujeres a hombres	19/42	45
Mujeres	10/42	24
Demasiado jóvenes	7/42	17
Homocigotos	24/38	63
Heterocigotos compuestos o probables.	13/38	34

Un aspecto interesante en esta condición clínica corresponde al impacto que las bajas concentraciones de DHT, en suero, tienen sobre la matriz ósea. A este respecto, la observación de que finasteride, un inhibidor de la 5 alfa reductasa, no modifica la masa ósea en el humano y el roedor²¹, sugiere a la testosterona y/o al estradiol como los esteroides con mayor impacto sobre el metabolismo óseo.

En las áreas psicológicas y de orientación psicosexual es bien conocida la predisposición, sin intervención alguna, de los sujetos afectados de orientarse hacia el sexo masculino. A este respecto, la edad promedio en la que los sujetos afectados con sexo de asignación femenino deciden optar por un sexo de identidad masculino corresponde a los 16 años con un rango entre 14 a 24 años²²

Este fenómeno de cambio en el sexo de asignación por un sexo de identidad diferente ha sido descrito en varios países lo cual excluye variables culturales como condicionantes del cambio. Estos hallazgos están de acuerdo con evidencias experimentales que sugieren la importante participación de los andrógenos durante la vida intrauterina en determinar los mecanismos que conducen al establecimiento del sexo de identidad de los individuos..^{23,24,25}

En sujetos pospuberales afectados con la deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2 la relación de las concentraciones en suero de la testosterona y la dihidrotestosterona (T/DHT) es mayor que la observada en sujetos normales de la misma edad.,^{26, 27} En los sujetos afectados en estadios prepuberales, , las concentraciones en suero de testosterona y dihidrotestosterona se encuentran por debajo de los límites de sensibilidad de los análisis de cuantificación hormonal, por lo que la estimulación del testículo con la gonadotropina coriónica humana (hGC) es necesaria para establecer el

diagnóstico.²⁶ La determinación en la orina de metabolitos urinarios reducidos en el anillo A en orientación 5 alfa, así como de la estimación de la actividad enzimática de la 5 alfa reductasa tipo 2 en cultivo de fibroblastos, obtenidos de piel del área genital de los sujetos afectados, son de ayuda para el diagnóstico.²⁸

Diagnóstico diferencial

El diagnóstico de esta patología debe de llevarse a cabo al nacimiento para prevenir las consecuencias tardías en la esfera psicosexual de los individuos afectados. Sin embargo en un número elevado de casos, el diagnóstico se realiza durante la pubertad. En el diagnóstico de este síndrome se debe de tener en consideración el descartar otras entidades que conducen a un cuadro clínico similar cuyo tratamiento y curso de la enfermedad es en algunos casos totalmente distinto como son la insensibilidad parcial a la acción de los andrógenos y cualquier alteración enzimática involucrada en la síntesis de T.^{29 30}

El diagnóstico definitivo se establece mediante la identificación de mutaciones o alteraciones estructurales en el gen de la enzima 5 alfa reductasa 2.

Tratamiento

Este dependerá del sexo de identidad y de la orientación psicosexual que caracterice al paciente, previa evaluación psicológica.

En caso de optarse por el sexo masculino será necesaria la corrección quirúrgica para la reparación de la uretra y el descenso testicular, además como el grado de virilización es poco satisfactorio, será necesario un aporte de andrógenos durante la pubertad, siendo lo ideal la DHT parenteral o tópica³¹. Otra opción puede ser administración de T a dosis suprafisiológicas lo cual permite normalizar las concentraciones de DHT en suero y una mayor virilización.²³

En caso de adoptarse el sexo femenino también será necesaria la corrección quirúrgica con vaginoplastia y extirpación testicular. Además será necesaria la terapia estrogénica para promover la feminización.³²

Desafortunadamente a pesar de estas intervenciones quirúrgicas y farmacológicas, en muchas de las ocasiones estos pacientes no logran identificarse

plenamente con el rol masculino dentro de una sociedad, debido a que la falta de una intervención psicológica oportuna impide el claro establecimiento de la identidad sexual del individuo. Por estos motivos Imperato y cols.⁶ han descrito que el tratamiento efectivo consiste en identificar a este síndrome lo mas tempranamente posible y de preferencia durante la infancia para intervenir con terapia psicológica y farmacológica, permitiendo que el individuo adopte el cambio de identidad incluso antes de alcanzar la pubertad.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2 es una enfermedad poco frecuente, sin embargo, las implicaciones físicas, psicológicas y sociales de la misma nos obligan a establecer el diagnóstico en estadios tempranos de la vida e instituir el o los tratamientos de manera oportuna y basados, cuando así se requiera, en el conocimiento adecuado de la esfera psicosexual de los individuos afectados. El presente trabajo tiene como objetivos establecer los lineamientos a ser considerados en el diagnóstico diferencial de la deficiencia de 5 alfa reductasa.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la descripción clínica, genética y endocrinológica del síndrome de pseudohermafroditismo masculino por deficiencia de 5 alfa reductasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Casos

Para este estudio se revisaron 13 expedientes de pacientes con diagnóstico de deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2 de la consulta externa del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ.,

Los siguientes criterios fueron considerados para la inclusión de los casos:

- 1) Criterios clínicos: ambigüedad de genitales al nacimiento, virilización y fenotipo masculino durante la pubertad, cambios en la identidad de género y el rol de género con respecto al sexo de asignación al nacimiento.
- 2) Criterios bioquímicos: concentraciones de LH, FSH, T, DHT, relación T/DHT basal o postestimulación con hGC compatibles con el diagnóstico de deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2.
- 3) Cariotipo 46,XY
- 4) Criterios moleculares: Detección de mutaciones en el gen de la 5 alfa reductasa.

Métodos

Concentraciones Hormonales

Para las cuantificaciones hormonales se recolectó sangre venosa de los pacientes, posterior a la formación del coagulo, las muestras fueron centrifugadas y el suero se congeló a -20° C. Las concentraciones circulantes de LH y FSH fueron determinadas por radioinmunoanálisis (RIA) específicos utilizando los reactivos proporcionados por el Programa Especial en Investigación y Desarrollo en Reproducción Humana WHO (Suiza).³³ Los resultados fueron expresados en miliUnidades Internacionales por mililitro (mUI/ml). Los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron menores del 6% y 11% para LH y 7% y 10% para FSH, respectivamente.

Las concentraciones de T y DHT en suero fueron cuantificadas utilizando RIAs específicos de doble anticuerpos descritos anteriormente.³⁴

Los coeficientes de variación inter e intraanálisis fueron menores de 10% y 8% para los dos esteroides, respectivamente. Los resultados fueron expresados en nanogramos por mililitro (ng/ml).

Prueba de estimulación con hGC

Se administraron 2,500 UI de hGC (Pregnyl, Organon Mexicana, S.A) por vía intramuscular cada 24 horas por 4 días consecutivos. Testosterona y dihidrotestosterona en suero fueron cuantificados antes, durante y después de la prueba.

Evaluación psicológica de la identidad de género

Las evaluaciones psicológicas se realizaron en todos los paciente utilizando la escala de inteligencia para adultos de Bender-Gestalt Wechsler, así como la prueba de mancha de tinta Rorschach y Técnicas proyectivas de apreciación temática.³⁵ Las técnicas proyectivas se aplicaron cada 6 meses. También se evaluó el contenido de los sueños como herramienta adicional en el cambio de identidad de género. Las manifestaciones del comportamiento sexual fueron evaluadas de acuerdo a los patrones descritos por Diamond.³⁶ Las sesiones psicoterapéuticas se realizaron una o dos veces por semana hasta que se determinó una identidad de género definida con base en los resultados de los cuestionarios y las entrevistas.

Estudio molecular

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

El DNA genómico se extrajo de leucocitos por métodos ya descritos.³⁷ Se utilizaron 5 pares de oligonucleótidos o iniciadores (Tabla 4) para la amplificación de los exones 1 al 5 del gen de la 5 alfa reductasa tipo 2.³⁸ Las reacciones se realizaron en un volumen de 50 μ l conteniendo 0.5-1.0 μ l de DNA genómico, 1.5 μ M de cada oligonucleótido, 25 μ M de dNTPs mezclados, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.3, 4% DMSO y 2.0 U de polimerasa termoestable (Ampli-Taq, Perkin Elmer Corp. NJ, USA). Se realizaron 25 ciclos de amplificación en un ciclador térmico. Los productos de PCR fueron colocados en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio para su visualización y verificación de la talla.

Exon Amplificado	Nombre del primer	Secuencia(5'→3')	Longitud (bp)	Temperatura De templete
Exon 1	501	GCAGCGGCCACCGGCGAGG	358	65
	502	AGCAGGGCAGTGCCTGCACT		
Exon 2	503	TGAATCCTAACCTTTCCTCCC	235	58
	504	AGCTGGGAAGTAGGTGAGAA		
Exon 3	505	TGTGAAAAAAGCACCACAATCT	208	58
	506	CAGGGAAGAGTGAGAGTCTGG		
Exon 4	507	TGATTGACCTTCCGATTCTT	232	54
	508	TGGAGAAGAAGAAAGCTACGT		
Exon 5	509	TCAGCCACTGCTCCATTATAT	166	58
	510	CAGTTTTCATCAGCATTGTGG		

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados para gen de 5 alfa reductasa tipo 2

Análisis de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP)

Para buscar secuencias variables se utilizó SSCP.³⁹ Brevemente: en cada reacción se utilizaron 50 µl conteniendo 20-30 ng de exon DNA purificado (Centricon-100 columns; Amicon Inc., Beverly, MA, USA), 25 µM dNTPs, 2.5 U Taq DNA polimerasa, 1.25 µM , y 10 µCi de[alpha]-32P-dCTP (sp.act. 3000 Ci/mmol; NEN-DuPont, Boston, MA, USA), en 10 mM Tris (pH 8.8), 50 mM KCl y 1.5 mM MgCl₂. Todos los exones fueron amplificados usando estas mismas condiciones. Después del PCR, 2.0 µl de cada mezcla de reacción fueron transferidos a 18 µl de amortiguador (95% formamide, 40 mM EDTA, 0.05% azul de bromophenol); las muestras fueron calentada a 94°C por 5 minutos y luego enfriadas en hielo. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis y visualizados después de exponerlos a placas de rayos X Kodak XAR-5 X por 4-14 horas.

RESULTADOS

Características Clínicas

Se incluyeron 13 pacientes quienes cumplieron con los criterios clínicos, de laboratorio y moleculares de deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2. De los casos incluidos todos correspondieron a nacionalidad mexicana, de origen mestizo y pertenecen a 11 distintas familias no relacionadas. Solo tres pacientes viven en la ciudad de México y el resto en comunidades rurales. Seis de los casos presentaron antecedente confirmado de consanguinidad y siete de los casos presentaron al menos un familiar afectado por el mismo problema. Los casos 3 y 4 son hermanos, así como los casos 8 y 9 en los cuales se observó el mismo fenotipo (Tipo3). El fenotipo mas frecuente, al igual que lo reportado en la literatura fue el tipo 3 (10/13) caracterizado por hipospadias perineoescrotal con pseudovagina y el resto de los pacientes presentaron fenotipo tipo 2 caracterizado por hipospadias con seno urogenital (hoyuelo en periné, con micropene) o micropene con hipospadias peneano (3/10).

El diagnóstico clínico y bioquímico se realizó en promedio a los 17 años (rango 3 - 32 años). En los 13 casos se corroboró un cariotipo 46, XY. Al momento del diagnóstico, los 13 pacientes se encontraron con talla y peso por arriba de la percentila 10, de acuerdo a lo esperado en sus familiares masculinos. El vello corporal y facial se encontraba disminuido con respecto a sus familiares. Los 13 casos manifestaron cambios en la conformación corporal, volviéndose de tipo masculina, así como engrosamiento de la voz al llegar a la pubertad. Al momento del diagnóstico se encontraron testículos descendidos y de volumen dentro de límites normales, de acuerdo a su edad, en los 13 casos. 12 de los casos fueron asignados al sexo femenino al nacimiento y solo el caso 5 se asignó al sexo masculino.

Las características clínicas se describen en la Tabla 5.

Tabla 5 Características clínicas

# de Caso	Edad Dx.	Consanguinidad	# Familiares afectados	Fenotipo de acuerdo a genitales	Características De los genitales	Cariotipo
1	24	-	0	3	Pseudovagina / HPE	46XY
2	22	+	0	3	Pseudovagina / HPE	46XY
3	5	+	1	3	Pseudovagina / HPE	46XY
4	3	+	1	3	Pseudovagina / HPE	46XY
5	17	-	0	2	Micropene / HP	46XY
6	16	+	0	3	Pseudovagina / HPE	46XY
7	32	-	0	3	Pseudovagina / HPE	46XY
8	14	-	1	3	Pseudovagina / HPE	46XY
9	20	-	1	3	Pseudovagina / HPE	46XY
10	17	+	1	3	Pseudovagina / HPE	46XY
11	14	-	0	2	Seno urogenital / HP	46XY
12	12	+	1	3	Pseudovagina / HPE	46XY
13	22	-	1	2	Seno urogenital / HP	46XY

FENOTIPO: 1= Completamente masculino, 2= Micropene e hipospadias, 3= ambigüedad completa 4= Predomina lo femenino 5= completamente femenino

Dx = Diagnóstico HPE = Hipospadias perineoescretal HP = Hipospadias peniano

Características bioquímicas

Las concentraciones hormonales en suero de las gonadotropinas, T y DHT previas y posteriores a la estimulación con hGC, al momento del diagnóstico, se muestran en la tabla 6. Las concentraciones en suero de las gonadotropinas se encontraron dentro de los valores de referencia y de acuerdo a la edad en todos los pacientes. En los casos 3 y 4 ambas gonadotropinas se encontraron de acuerdo a su edad (5 y 3 años, respectivamente).

En todos los sujetos, las concentraciones basales en suero de la T se encontraron dentro de los valores de referencia; sin embargo, las concentraciones en suero de la DHT fueron significativamente menores en todos los casos con excepción del caso 11. En este caso las concentraciones en suero basales de DHT fueron normales para su edad, pero a la estimulación con hGC no mostró elevación de la misma. La estimación de la relación basal y posestimulación con hGC de T/DHT se encontró elevada en todos los sujetos con un rango entre 13 - 67 y 39-86, respectivamente.(Tabla 6).

Tabla 6.- Concentraciones hormonales en evaluación endocrinológica

CASO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
LH UI/l	7.3	5.3	1.3	0.5	7.9	2.1	8.3	5.6	8.1	3.1	6.8	5.4	10.5
FSH UI/l	6.8	3.6	0.4	1.1	0.4	3.3	6.3	1.3	4.3	3.3	11.6	5.3	6
T4 ng/ml	7.5	5.2	2.2	2.4	7.46	7.4	6.7	2.52	2.8	6.59	5.36	6.5	4.52
	25	14	10	12	15.9	NR	15	10.9	14.1	7.35	15	15	12.7
DHT ng/ml	.25	.133	.056	.105	.17	.11	.193	.052	.102	.152	.407	.183	.081
	.32	.172	.180	.163	.30	NR	.245	.13	.221	.184	.174	.240	.18
T/DH T	30	39	39	22	43	67	34	48	27	43	13	35	55
	78	81	55	73	53	NR	61	83	63	39	86	62	70

Valores hormonales de referencia en hombres adultos normales:
 FSH: Hormona folículo estimulante (1-8 mUI/mL),
 LH: Hormona luteinizante (0.5-12 mUI/mL)
 Testosterona (2.86-15.1 ng/mL)
 DHT: 0.300 a 0.800 ng/mL

■ Concentraciones máximas post hCG

Características psicosexuales

Los estudios de orientación psicosexual revelaron que en 10 sujetos de los 12 con sexo de asignación femenino al nacimiento, al momento de la pubertad presentaron sexo de identidad masculino y solo en 2 casos de estos se mantuvo el sexo de asignación al nacimiento. El cambio en el género ante la sociedad se realizó en 9 de estos pacientes y el cambio de sexo legal solo en 7 de los casos. La edad de cambio al género masculino, en estos pacientes se realizó entre los 18 y 32 años. Los casos 7, 8 y 9 cambiaron su género ante la sociedad espontáneamente 4 o 5 años antes de buscar atención médica. El caso 7 y 9 incluso habían reportado relaciones sexuales con parejas del sexo femenino. En el caso 1 se encontró una identidad de género masculino sin embargo por presiones familiares y poca independencia económica decidió permanecer con sexo social femenino. El caso 4 y 12 presentaron una identidad de género femenino con imagen corporal pobremente diferenciada, y debido a problemas económicos y de traslados desde su comunidad a este Instituto, han recibido poca terapia psicológica y actualmente continúan desempeñando labores y actividades del sexo femenino. (Tabla 7 y 8).

Tabla 7.- Identidad de Género en 5ª reductasa

CASO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
SEXO NACER	F	F	F	F	M	F	F	F	F	F	F	F	F
SEXO IDENT.	M	M	M	F	M	M	M	M	M	M	M	F	M
ROL DE GENERO	F	M	M	F	M	M	M	M	M	M	M	F	M
SEXO LEGAL	F	M	M	F	M	F	M	M	M	M	M	F	F
EDAD DE CAMBIO	-	22	18	-	NA	18	32	18	20	20	18	-	22

F= FEMENINO
M= MASCULINO

Tabla 8.- Estudios psicosexuales

<i>Sexo: asignación/identidad</i>	<i>Casos</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>Sexo de asignación masculino.</i>	<i>1/13</i>	<i>7.6%</i>
<i>Sexo de asignación femenino.</i>	<i>12/13</i>	<i>92.3%</i>
<i>Sexo de identidad femenino</i>	<i>2/12</i>	<i>16.6%</i>
<i>Sexo de identidad masculino</i>	<i>10/12</i>	<i>83.3%</i>
<i>Permanecen como rol de género femenino.</i>	<i>3/12</i>	<i>25%</i>

Estudio molecular

El estudio molecular del gen de la 5 alfa reductasa reveló la presencia de mutaciones en todos los casos. Sin embargo en 3 de los pacientes no fue posible recuperar la información al momento del estudio. En los otros 10 casos se demostró la presencia de mutaciones sin sentido, de estos 9 correspondieron a mutaciones homocigotas y 1 fue heterocigoto compuesto. En 4 casos, en los que se incluyen los casos 8 y 9 que son hermanos, se identificó una sustitución de guanina por citosina en el codón 212 localizado en el exón 4. Esta mutación puntual es responsable de la sustitución de arginina por prolina (P212R) la cual ya ha sido descrita anteriormente en población Mexico-Americana.⁴⁰ En 4 casos incluyendo a los casos 3 y 4 que son hermanos se encontró una sustitución de adenina por citosina en el codón 207 del exón 4 lo cual ocasiona una sustitución de adenina por aspartato (A207D). En el caso 2 se encontró una sustitución de guanina por adenina en el codón 34 del exón 1 que ocasiona una sustitución de arginina por glicina (G34R). Todas estas mutaciones de tipo homocigota. Por último en el caso 5 se encontraron 2 mutaciones con patrón heterocigoto compuesto: la primera una sustitución de adenina por guanina en el codón 115 del exón 2 responsable por la sustitución de aspartato por glicina (G115D) y la segunda una sustitución de adenina por guanina en el codón 203 del exón 4 ocasionando el cambio de serina por glicina (G203S). (Tabla 9).

Tabla 9.- Estudio Molecular

# de Caso	Edad Dx.	Fenotipo de acuerdo a genitales	Características De los genitales	Mutación
1	24	3	Pseudovagina / HPE	No disponible
2	22	3	Pseudovagina / HPE	Exón 1 G→A G34R*
3a	5	3	Pseudovagina / HPE	Exón 4 C→A A207D*
4a	3	3	Pseudovagina / HPE	Exón 4 C→A A207D*
5	17	2	Micropene / H P	Exon 2 G→A G115D Exon 4 G→A G203S#
6	16	3	Pseudovagina / HPE	Exón 4 C→G P212R*
7	32	3	Pseudovagina / HPE	No disponible
8b	14	3	Pseudovagina / HPE	Exón 4 C→G P212R*
9b	20	3	Pseudovagina / HPE	Exón 4 C→G P212R*
10	17	3	Pseudovagina / HPE	Exón 4 C→A A207D*
11	14	2	Seno urogenital / HP	No disponible
12	12	3	Pseudovagina / HPE	Exón 4 C→A A207D*
13	22	2	Seno urogenital / HP	Exón 4 C→G P212R*

FENOTIPO: 1= Completamente masculino. 2 = Micropene e hipospedias.
3= ambigüedad completa 4= Predomina femenino 5 = completamente femenino

Dx = Diagnóstico HPE = Hipospedias perineoscrotal HP = Hipospedias peniano
*Homocigoto #Heterocigoto Compuesto a v b hermanos

DISCUSIÓN

En este estudio se describen 13 casos con pseudohermafroditismo masculino secundarios a la deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2. En todos los casos el diagnóstico se corroboró y se estableció tanto por criterios clínicos, bioquímicos y moleculares.

Durante la pubertad y edad adulta el diagnóstico de deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2 puede ser fácilmente realizado con base en la virilización sin ginecomastia, aunada a la cuantificación de concentraciones de T y DHT; sin embargo, el reto se presenta durante la infancia en pacientes con ambigüedad de genitales, particularmente en pacientes correspondientes al fenotipo tipo 2 en donde con frecuencia no se piensa en este síndrome. Por estos motivos el diagnóstico temprano permitirá decisiones adecuadas que ayuden a establecer un pronóstico en cuanto a la función testicular, la sensibilidad de los órganos blanco a los andrógenos y por lo tanto la posible respuesta durante la pubertad que en conjunto contribuirán a asignar el sexo masculino a los individuos afectados.

Llama la atención en nuestra población lo tardío del diagnóstico, así como la búsqueda de atención médica varios años después de la pubertad. Esta situación podría explicarse por la falta de información sobre la enfermedad, lo alejado de las poblaciones de los servicios de salud de tercer nivel y sobre todo por los factores socioculturales que circundan a la sexualidad en nuestra población.

Nuestra población corresponde a la descrita en otras en cuanto a las características clínicas y endocrinológicas. Se reporta como relevante el hecho de que a pesar de que se documentó consanguinidad solo en 6/13 casos, las mutaciones reportadas resultaron homocigotos en 9 de los casos, lo cual nos hace pensar que existe endogamia en las poblaciones de origen de estos pacientes. En este estudio, el fenotipo más frecuente correspondió al tipo 3 el cual está caracterizado por hipospadias perineoescrotal con pseudovagina, características primarias descritas previamente en este síndrome, lo cual explica de manera satisfactoria que la mayoría de los sujetos (12/13) hallan sido al nacer, asignados al sexo femenino. En el caso con asignación del sexo masculino correspondió a un paciente con fenotipo tipo 2 (micropene con hipospadias peneano) lo que seguramente condicionó el sexo de asignación al nacimiento.

En el área psicosexual, es de relevancia el hecho de que a pesar de la influencia del medio ambiente y del sexo de asignación los individuos, incluso sin orientación médica, presentaron identidad masculina al llegar a la pubertad, así como cambio al sexo masculino dentro de la sociedad en 9 casos. Solo 2 casos permanecieron con identidad de género femenino, sin embargo la identificación corporal se presentaba pobremente diferenciada y en ellos la intervención psicológica fue mínima debido al bajo nivel sociocultural de la familia y a la presión de la misma sobre los individuos afectados. Estas observaciones concuerdan con la hipótesis planteada por Sobel y cols.²³ acerca de la importancia de los andrógenos en la morfología y función del cerebro ya demostrada en animales de experimentación y que podría explicar el hecho de que estos pacientes a pesar de ser criados dentro del sexo femenino opten por el cambio de género durante la pubertad, cuando la secreción de andrógenos (T) aumenta. Sin embargo, hasta el momento en el humano no ha sido posible separar el comportamiento sexual de la influencia de otros factores ambientales y de origen social, por lo que será necesario en un futuro realizar estudios *in vitro* o *in vivo* de la acción directa de la T y DHT sobre el desarrollo del cerebro humano. Otro dato a favor de estas teorías es el hecho de que los pacientes con deficiencia de 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa no presentan esta crisis de identidad de género durante la pubertad y decidan continuar con el sexo femenino asignado al nacimiento, aparentemente debido a que la falta de T desde la vida intrauterina no permite la virilización adecuada en la esfera psicosexual del cerebro.⁴¹

En el abordaje diagnóstico de nuestra población el hecho de presentar un cariotipo 46, XY nos permitió orientar el diagnóstico a las causas de pseudohermafroditismo masculino mas frecuentes. Los valores de T dentro de rangos normales excluyeron cualquier problema enzimático involucrado en la síntesis de la misma, tales como deficiencia de 3 beta y 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa. Las cuantificaciones de T, DHT y la relación de las mismas de manera basal o postestimulación con hGC, permitió una orientación clara al diagnóstico ya que los 13 casos presentaron una relación T/DHT basal entre 13 y 67. En cuanto al diagnóstico diferencial con la insensibilidad parcial a la acción de los andrógenos, la falta de ginecomastia, las concentraciones en suero normales de gonadotropinas y por último las concentraciones normales de T y bajas de DHT permitieron hacer el diagnóstico diferencial. Desafortunadamente en nuestra población solo se incluyeron 2 casos prepuberales, lo cual no nos permite hacer conclusiones respecto al diagnóstico

oportuno al nacimiento o durante la infancia temprana; sin embargo, consideramos que todo aquel paciente que se presente al nacimiento con ambigüedad de genitales y cariotipo 46, XY deberá someterse a estudios que descarten esta patología. En estudios previos incluso se ha informado de la presencia de mutaciones en al menos uno de los dos alelos del gen de la 5 alfa reductasa tipo 2 en el 8.6% de los pacientes estudiados con hipospadias simple.⁴²

En los 10 pacientes en los cuales fue posible conocer el tipo de mutación estructural, en todos excepto en uno la mutación fue homocigota. Cuatro pacientes presentaron la mutación P212R del exón 4 que previamente había sido descrita en población mestiza, lo cual apoya la alta prevalencia de esta mutación en nuestro grupo étnico, y otros cuatro pacientes presentaron la mutación A207D que solo había sido descrita en Australia.¹⁵ En nuestros pacientes no fue posible establecer una relación entre el genotipo y el fenotipo ya que la variedad en el fenotipo no fue importante y solo tenemos sujetos del fenotipo tipo 2 y 3; sin embargo, es importante resaltar que el único individuo reportado con un genotipo heterocigoto compuesto (mutación en exón 1 y 4) presentó el fenotipo menos afectado caracterizado por micropene con hipospadias peneana. La limitante en nuestro estudio para tratar de demostrar esta relación genotipo fenotipo consistió en la falta de datos en cuanto a la actividad enzimática de 5 alfa reductasa tipo 2 en fibroblastos de área genital, sin embargo, en estudios en donde se contaba con esta información no ha sido posible demostrar que la localización de la mutación guarde relación con el porcentaje de actividad enzimática.³

CONCLUSIONES

La presente descripción clínica, endocrinológica y genética de la deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2 en sujetos que asisten a la clínica de Biología de la Reproducción del INCMNSZ nos permitió caracterizar a nuestra población y compararla con otras poblaciones afectadas. En nuestra población, lo tardío en el establecimiento del diagnóstico nos obliga a conocer e investigar las causas responsables de esto, así como las consecuencias derivadas de esta situación en los individuos afectados. Por estas razones consideramos que el presente trabajo pueda orientar a médicos involucrados en la atención de recién nacidos y niños con alteraciones en la diferenciación sexual, con la finalidad de considerar esta posibilidad diagnóstica y proporcionar las intervenciones oportunas y la prevención de afecciones en las esferas psicosexual y reproductiva de los individuos. El diagnóstico puede ser establecido con la clínica, determinaciones basales o posteriores a la estimulación con hGC de T y DHT en suero así como de las gonadotropinas y de estudios a nivel molecular para la identificación de las mutaciones y el establecimiento definitivo del diagnóstico.

- ¹ Sultan C, et al. Disorders of androgen action. *Semin Reprod Med* 2002; 10:217-28.
- ² Brinkmann A, et al. Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179:105-9.
- ³ Wilson J, et al. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocrine Reviews* 1993;14:577-91.
- ⁴ Sarafoglou K, et al. Clinical review 111: familial sex reversal. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ;85 :483-90.
- ⁵ Imperato-McGinley J, et al. Comparison of the effects of 5 α -reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation. *Endocrinology* 1992;131:1149-56.
- ⁶ Imperato-McGinley J, et al. Steroid 5 α reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974; 186:1213-15.
- ⁷ Jenkins, et al. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 α -reductase. *J Clin Invest* 1992;89:293-300.
- ⁸ Nowakowski H, et al. Genetic aspects in male hypogonadism. *Recent Prog Horm Res* 1961;17:53-95.
- ⁹ Andersson S, et al. Structural and Biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3640-44.
- ¹⁰ Andersson S, et al. Deletion of steroid 5 α reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 1991;354:159-61.
- ¹¹ Forti G, et al. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency: virilization in early infancy may be due to partial function of mutant enzyme. *Clinical Endocrinology* 1996; 44: 477-82.
- ¹² Wigley W, et al. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 alpha-reductase 2 isoenzyme. *Biochemistry* 1994; 33: 1265-70.
- ¹³ Thigpen A, et al. Four amino acid segment in steroid 5 α -reductase 1 confers sensitivity to finasteride, a competitive inhibitor. *J Biol Chem* 1992; 267:8577-83.
- ¹⁴ Chavez B, et al. Uniparental disomy in steroid 5 α - reductase 2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3147-50.
- ¹⁵ Thigpen A, et al. The molecular basis of steroid 5 α -reductase deficiency in a large Dominican kindred. *N Engl J Med* 1992; 327:1216-19.
- ¹⁶ Carpenter T, et al. Variable expression of 5 alpha-reductase deficiency: presentation with male phenotype in a child of Greek origin. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:318-22.
- ¹⁷ Imperato-McGinley J, et al. A cluster male pseudohermaphrodites with 5[alpha]-reductase deficiency in Papua New Guinea. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 1991; 34: 293-98.
- ¹⁸ Fratianni C, et al. The syndrome of 5 α -reductase deficiency. *Endocrinologist* 1994;4:302- 14.
- ¹⁹ Imperato-McGinley J, et al. Androgens and male physiology the syndrome of 5 α -reductase-2 deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198:51-9.
- ²⁰ Sinnecker G, et al. Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha reductase 2 deficiency. *Am J Med Genetics* 1996;63:223-30.
- ²¹ Costa E, et al. Normal Bone Density in male pseudohermaphroditism due to 5 α - reductase 2 deficiency. *Rev. Hosp. Clin.Fac.Med. S. Paulo* 2001; 56:139-142
- ²² Sobel V, et al. Gender identity in XY intersexuality. *Child Adolesc Psychiatric Clin N Am* 2004;13: 609-22.
- ²³ Mendez 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- 13.
- ²⁴ Price P, 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; 74:1496-508.
- ²⁵ Hochberg Z, et al. Clinical, biochemical, and genetic findings in a large pedigree of male and female patients with 5 α -reductase 2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2821- 7.
- ²⁶ Imperato-McGinley J, et al. The impact of androgens on the evolution of male gender identity. *N Engl J Med* 1970; 300: 1233-37.
- ²⁷ Pérez-Palacios G, et al. The syndromes of androgen resistance revisited. *Steroid Biochem* 1987;27:1101-5.
- ²⁸ Moore R, et al. Diminished 5 alfa reductase activity in extracts of fibroblasts cultured from patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. *J Biol Chem* 1975;250:7168-73.
- ²⁹ Sultan C, et al. Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Hum Reprod Update* 2001;7(3):314-22-

-
- ³⁰ Nimkarn S, et al. Ambiguous genitalia: an overview of 22 years experience and the diagnostic approach in the pediatric department, Siriraj Hospital. *J Med Assoc Thai* 2002;85:496-505.
- ³¹ Keenan B, et al. Dihydrotestosterone heptanoate: synthesis, pharmacokinetics, and effects on hypothalamic-pituitary-testicular function. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:557-62.
- ³² Griffin J, et al. Disorders of sexual differentiation. *Urology* 1992; ed 6: 1509-42.
- ³³ Sufi S, et al. World Health Organization Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. *Method Manual* 1978; ed.10. WHO. Geneva.
- ³⁴ Abraham G, et al. Radioimmunoassay of steroids. *Handbook of Radioimmunoassay* 1977 Marcel Dekker Inc: 591.
- ³⁵ Rosenwald A, et al. Psychological examination In: Ariete S. *American Handbook of psychiatry*. Basic Books Inc, 1974:1184-98.
- ³⁶ Diamond M. *Human Sexual Development: biological foundations for sexual development*. Human sexuality in four perspectives. Johns Hopkins University press 1975:29.
- ³⁷ John S, et al. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research* 1991; 19: 408-12.
- ³⁸ Labrie F, et al. Structure of human type II 5[alpha]-reductase gene. *Endocrinology* 1992; 131: 1571-1573.
- ³⁹ Orita M, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA-polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-879.
- ⁴⁰ Wigley W, et al. Natural mutagenesis study of the human steroid 5 alpha reductase 2 isoenzyme. *Biochemistry* 1994;33:1265-70
- ⁴¹ Rosler A, et al. Male pseudohermaphroditism due to 17b-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: studies on the natural history of the defect and effect of androgens on gender role. *J Steroid Biochem* 1983; 9: 663-74.
- ⁴² Silver R, et al. 5 alpha reductase type 2 mutations are present in some boys with isolated hipospadias. *J Urol* 1999;162:1142-5.