

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
DR. SALVADOR ZUBIRAN

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN Y SERVICIO DE
ENDOCRINOLOGÍA
C.M.N. "20 DE NOVIEMBRE"
I.S.S.S.T.E.

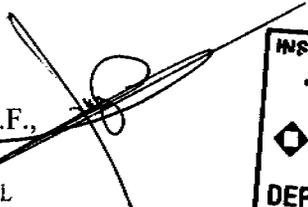
**DISOMIA UNIPARENTAL EN DEFICIENCIA TIPO
2 DE 5 α -REDUCTASA.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:
DRA. EVANGELINA VALDES GUERRERO

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIDAD DE ENDOCRINOLOGIA

ASESOR DE TESIS: DR. FELIPE DE JESÚS VILCHIS URIBE


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


INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICION
"SALVADOR SUBIRAN"
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION

DICIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DISOMIA UNIPARENTAL EN DEFICIENCIA TIPO 2 DE 5 α REDUCTASA
DRA. EVANGELINA VALDES G.

La deficiencia de 5 α reductasa 2 (5L-SR2D) es un trastorno autosómico recesivo raro que lleva a una forma específica de Pseudohermafroditismo masculino. Afecta a varones 46XY con genitales externos ambiguos. Ellos usualmente presentan hipospadias perinoescrotal con pseudovagina, microfalo, testículos criptorquídicos y próstata rudimentaria pero derivados Wolffianos normales. Estudios de genética molecular han mostrado que la 5 α -SR2D es causada por una simple mutación de base o delección de la 5 α reductasa tipo 2 (SRD5A2). (4-6)

La mayoría de pacientes con 5 α -SR2D tienen mutaciones homocigotas y el resto (cerca 40%) tienen componentes heterocigotas o presumen con componentes heterocigotas (7-8). Aquí nosotros reportamos estudios del gene SRD5A2 en dos pacientes con 5 α -SR2D en quienes los padres son heterocigotas, aunque con mutaciones idénticas. Los estudios moleculares de uno de estos pacientes reveló homocigotas, pero solamente para la mutación paterna. Porque el defecto en la mutación es llevada por el padre pero no esta en la madre, quien lleva otras mutaciones, la disomía uniparental (UPD) se sospechó.

El concepto de UPD, originalmente fue introducido en 1980 por Engel(9), ha llevado a la explicación de la herencia de dos copias de un locus genético de solamente un familiar. A la fecha el UPD, ha sido reconocido que ocurre en varias enfermedades hereditarias como el Síndrome de Prader-Willi, Fibrosis quística, Hemofilia A, Distrofia muscular de Duchenne, Picnodisostosis, y Síndrome de Angelman entre otros (10).

Los resultados de nuestro estudio demuestran la evidencia para documentar el primer caso de UPD paterna en 5 α -SR2D.

SUJETOS Y METODOS

SUJETOS:

Pacientes 1 (P1) es un individuo de 23 años de edad 46 XY. Se revisó a los 17 años con hipospadias penoescrotal con un falo de 3 cms. de longitud y 1.0 cms. de circunferencia.

Las gónadas se localizaron en el escroto, tenían un volumen de 22.5 y 27.0 cc. no había ginecomastia. Este paciente tenía 2 hermanas sanas, aparentemente normales.

Paciente 2 (P2) un individuo de 14 años con identidad femenina.

Este paciente fue referido a los 13 años por amenorrea primaria, crecimiento del clítoris, falta de desarrollo mamario, y voz gruesa.

El examen físico reveló una masa de 2.5 x 3.0 cm. en el labio mayor izquierdo, un falo de 3.0 cms.

Y un introito vestibular de 2-3-cms. de profundidad. El cariotipo fue 46 XY. Este paciente fue considerado como niña y la orquidectomía bilateral fue realizada antes de los estudios moleculares.

En estos pacientes el diagnóstico de 5 α -SR2D fue establecido con criterio clínico endocrinológico y cariotipo. No había conocimiento de consanguinidad o historia familiar de la enfermedad en cualquier de los familiares, los cuales eran de origen étnico mestizo mexicano. Este estudio fue llevado con el consentimiento informado de los padres y aprobado por el Comité de ética de nuestro Instituto.

ESTUDIOS DEL DNA.

El estudio genómico de DNA fue aislado de leucocitos por los métodos standar. Las anomalías en la secuencia codificada en el gen SRD5A2 fue investigada mediante PCR del exon específico después por el análisis de polimorfismo conformacional de banda simple (SSCP) y el análisis secuencial (8,11). SSCP fue realizado de acuerdo al método de Orita y Cols (12) usando [α -32P] y d CTP como se describe más tarde (13, 14). La mutación y el control de los productos de PCR fueron secuenciados usando la Termostabilidad ([α -33P] ddNTP) del ciclo terminal del estuche (Amersham Life Sciences Inc. Cleveland OH) como se describió previamente (8).

El rompimiento del DNA genómico así como el blotting con marcadores convencionales fueron realizados por técnicas standar (15) Cuatro variables se repiten para probar. [D1S7/MS1, D4S139/PH30, D5S110/LH1, y D17S79/VI (Life Technologies, Inc. Grand Island, NY)] para cromosomas 1, 4, 5, y 17, respectivamente, fueron usados para validar la paternidad. El marcador D1S80 (16) fue también medido. Los marcadores polimórficos D2S162, D2S117, D2S347, D2S305, D2S151, D2S126, D2S131, D2S396, y D2S142 del cromosoma 2 fueron con PCR amplificados usando oligonucleótidos descritos (17).

El PCR fue realizado en reacciones de 25 μ l y c/u contenía 500ng del DNA genómico, 10 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mmol/L de MgCl₂, 50mmol/L KCl, 1.25 μ mol/L de cada primer, 2.5 U Tag DNA polimerasa, 100 μ mol/l de cada uno dNTP, 5 μ Ci [α -32P] d CTP (S.A. 3000 Ci/mmol; NEN-Dupont, Boston, MA).

Análisis de Restricción. (restricción enzimática).

El exon 4 del SRD5A2 del gene fue amplificado por PCR en presencia de [α -³²P]d CTP y purificado como se describe, PCR marcado sus productos fueron incubados por 2 h a 37° C con 5 UEco RV (New England Biolabs Inc. Beverly,MA) en un volumen final de 20 μ l. Tres microlitros de cada muestra fueron marcados sobre geles de poliacrilamida al 8%. Después de la electroforesis a 500V por 2 hrs., los geles fueron secados y autoradiografiados por 1-2 hrs. a -70C.

RESULTADOS:

El análisis SSCP del gen 5RD5A2 de los pacientes y sus padres no revelaron variaciones en los exones 1,2,3 y 5 (no se muestran los datos). Como puede verse en la Fig. 1, el exon 4DNA de ambas familias alteró la movilidad de la electroforesis comparada con sujetos control... La secuencia directa de estos fragmentos mostró que P1 fue heterocigoto para GAG/GAT en el codon 197 y para CCA/CGA en el codon 212 (Fig 2).

Que el padre fue corrido para G→T transversión del nucleotido 591 (posición del nucleotido dado al primer codon ATG), el cual cambia el codon 197 de ácido glutámico a ácido aspártico (E197D), mientras la madre fue corrida para C→G transversión al nucleotido 635, el cual cambia el codon 212 de prolina a arginina (P212R). Este paciente fue considerado como compuesto heterocigoto por tener ambas mutaciones (Fig. 2)

Como se demuestra en la Fig.3, los padres de P2 fueron corridos para la misma mutación, ambos, el padre fue heterocigoto par la mutación E197D, y la madre fue heterocigoto por la mutación E197D, y la madre fue heterocigoto para la mutación P212R, sin embargo este paciente presentó (exclusivamente) homocigoto para la mutación paterna con ausencia de la mutación materna. El análisis secuencial (realizada en ambos bandas), usando 3 diferente preparaciones de DNA confirmaron que P2 fue, homocigoto (GAT/GAT) para la mutación paterna (Fig. 3. Adicionalmente nosotros notamos que la substitución del nucleotido en el codon 197 introduciendo un EcoRV en el sitio de restricción. Esto fue confirmado por el enclavamiento enzimático de fragmentos del exon 4 DNA (Fig.4). En P2 el producto marcado PCR (232bp) fue completamente digerido dentro 158-bp y fragmentos de 74-bp.

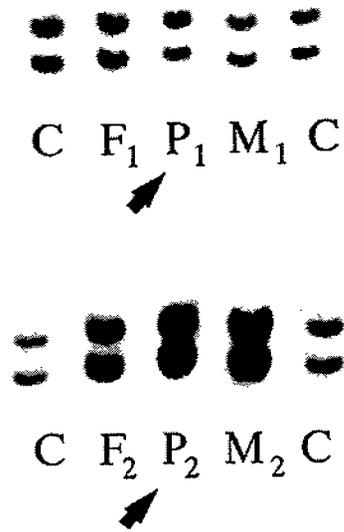


FIGURA 1. SSCP análisis de exon 4 de la SRD5A2 del gen del paciente 1 y 2 (flechas) arriba y su respectivos padres F, padre, M, madre. El DNAs de dos personas normales no familiares sirve como control (C).

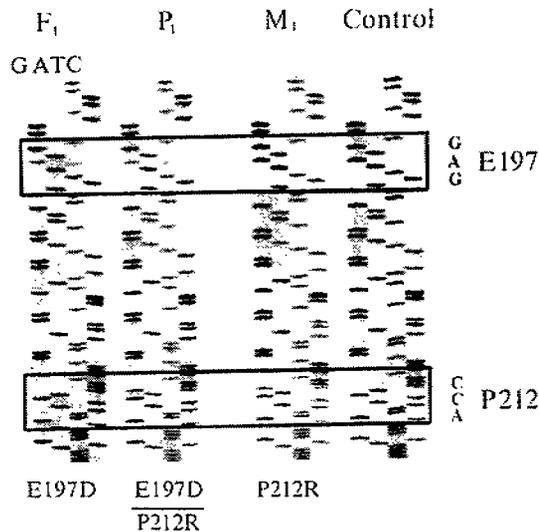


FIGURA 2. Secuencia parcial de nucleótidos del gen SRD5A2 de la familia.

1, mostrando dos diferentes mutaciones dentro del exon 4. Paciente 1 tiene un componente heterocigoto para Glu (GAG) a Asp (GAT) encontrando la mutación del codon 197 [llevado por su padre (F1)] y por un Pro (CCA) a Arg (CGA) encontrando mutación en el codon 212 [llevado por su madre (M1)]. Exon 4 DNA de una persona normal no familiar que sirvió como referencia (control).

De otra manera la digestión de 232-bp no digeridos del padre reveló 3 bandas, el 232-bp el fragmento no digerido y el 158- bp/74-bp de fragmentos digeridos. En contraste, el producto normal de PCR y el de la madre mostraron solamente el 232 - bp del fragmento no digerido (Fig. 4). Porque el modo de herencia en P2 no se encontró el patrón autosómico recesivo de la enfermedad, una prueba de la paternidad fue realizada. Los marcadores del DNA usados en este estudio fueron informados y el resultado sustentaron la paternidad. Porque los estudios cromosómicos revelaron un cariotipo diploide normal y no, un mosaico, todos los resultados fueron interpretados como lo demostró la presencia de UPD.

Para verificar esto, varios microsatélites (STR) de los brazos largos y cortos del cromosoma 2 fueron valorados. Como se demuestra en la Fig. 5 el análisis de P2, con diferentes marcadores, sugieren herencia de 2 alelos paternos en los últimos cinco (D2S162, D2S117, D2S305, D2S131 y D2S126) de los 9 marcadores examinados. Otros marcadores (D2S151, D2S142 y D2S396) mostraron un patrón de bandas muy similares entre todos los miembros de la familia y posteriormente, fueron considerados no informativos.

Finalmente, el análisis de D2S347 mostró la típica herencia mendeliana con ambos alelos paternos detectados en el propositus (Fig. 5)

DISCUSION:

Está bien establecido que la mutación del gen SRD5A2 en cariotipos masculinos resultó en un espectro de genitales externos con fenotipo que varió de completamente femenino a completamente masculino (1,14). En este estudio, nosotros realizamos análisis molecular del gen SRD5A2 de dos pacientes, sin padres consanguíneos los cuales fueron encontrados de dos distintas mutaciones y encontramos diferencias en el modo de transmisión de la enfermedad.

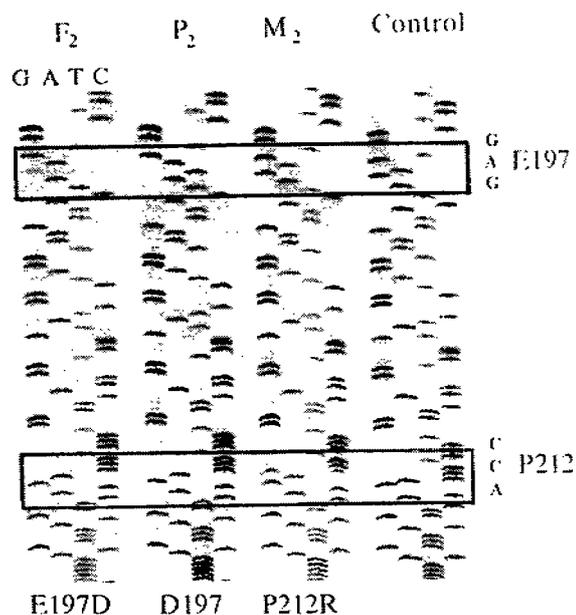


FIGURA 3. Secuencia parcial de nucleótidos del gen SRD5A2 de la familia 2, mostrando dos diferentes mutaciones dentro del exon 4.

El análisis de secuencia indica que el padre (F₂) lleva para Glu197- Asp la mutación y la madre (M₂) lleva para Pro 212- Arg la mutación.

El paciente (P₂) se encontró ser homocigoto, pero solamente para la mutación paterna (E197D). El exon 4 DNA de un sujeto normal no familiar sirvió como referencia (control).

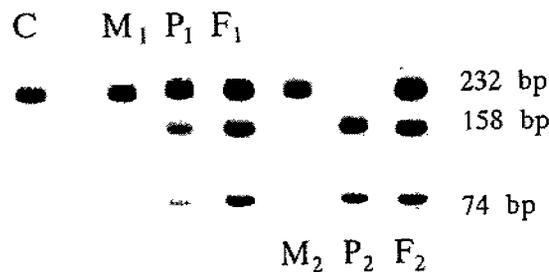


FIGURA 4. Autoradiografía de restricción análisis de enzimas de exon 4 del gen SRD5A2.

Exon 4 y la secuencia intrónica fue amplificando el PCR del DNA del paciente 1 (P1) Y 2 (P2) su respectivo pariente (M. madre; F, padre) y en individuos normales (C). El [P-32] marcando los productos de PCR fueron analizados por restricción con Eco RV y separados sobre un gel de poliacrilamida al 8%. El exon 4 del gen mutado SRD5A2 fue cortado dentro del 158 y 74bp, pero no fue en el gen (232 bp). Heterocigoto para esta mutación muestra las bandas mutantes.

El análisis secuencial mostró que en estas familias los padres eran heterocigotos llevaban una mutación de E197D y las madres eran heterocigoto para la mutación P212R. Ambos cambios se encontraron en el exon 4, muy cercano uno de otro.

En nuestra población, esta región del gen parece particularmente una mutación propensa, porque en 10 de 12 pedigres examinados la lesión molecular ha sido detectada en el exon 4 (11, 13). Como tal las mutaciones Glu197-Asp y Pro212- Arg han sido descritas; la forma estuvo presente en heterocigoto en un paciente ruso-americano (5), y en el segundo (P212R) fue previamente detectado en varios sujetos afectados, la mayoría de origen mexicano (8,13).



FIGURA 5. Análisis marcadores genéticos en paciente 2 y sus padres. Autoradiogramas de varios microsátélites marcadores de cromosomas 2 amplificados de DNA genómico del padre (F), de la madre (M), y el sujeto afectado (P). Los patrones de bandeado para D2S117, D2S162, D2S126, D2S305, y D2S131 fueron similares en el paciente y su padre. El marcador D2S151, D2S396, y D2S142 no fueron informativos pero el patrón de migración para D2S347 en el sujeto afectado sugiere herencia de los dos alelos paternos.

Los estudios moleculares de sitios directos de mutagenesis, en el cual la mutante del cDNAs son expresados en células de mamíferos que han mostrado ambas mutaciones (E197D y P212R) completamente inactivan la enzima, tal vez por afectar estos V_{max} ó la vida media de las proteínas (1, 18, 19). Aunque en estas dos familias los padres llevan mutaciones idénticas, los resultados sugieren dos patrones distintos de transmisión para esta deficiencia. Ambos, P1 quien fue designado como varón y presento más fenotipo masculino, fue identificado como un componente heterocigoto por vecindad con dos mutaciones parentales.

En contraste el análisis de la secuencia del DNA mostró que el P2 ser homocigoto para la mutación E197D, con una T en la posición del nucleótido 591 en ambos alelos.

El análisis de restricción-enzimática fue confirmado que la P2 fue homocigoto para esta mutación. La ausencia de mutación materna, junto con homocigoto para la mutación paterna se encontró en este paciente, indicando un patrón anormal de herencia. Por que la reducción de homocigoto para la mutación E197D no podría ser explicada.

Sobre la base de no paternidad o una anomalía cromosómica la presencia de UPD fue considerada. UPD parece ser un buen fenómeno de reconocimiento que puede dar un trastorno congénito, por otros mecanismos de genética clásica mendeliana (9,20, 21). Como en el caso de P2 UPD ha sido reconocido en otras enfermedades porque su patrón anómalo de transmisión de genes recesivos. Ambos deficiencia de 21-hidroxilasa (22), picnodisostosis, deficiencia de complementos (C4A+ C4B) fibrosis -

quística, hipoplasia de cartílago/cabello, Talasemia B mayor, y acidemia metilmalónica son algunos de los 18 trastornos recesivos en los cuales UPD han sido documentados (10).

Para nuestro conocimiento, P2 representa el primer caso de 5α SR2D resultado de UPD y también el primer caso de patrón paterno UPD involucrando el cromosoma 2, porque los tres casos de UPD para cromosoma 2 previamente descritos, fueron de origen materno (23-25). Nosotros creemos que P2 representa un caso particular de esta enfermedad, especialmente si fue considerado de baja frecuencia de UPD y la relativamente rara de 5α -SR2D en la población. En resumen, estos estudios han identificado el primer caso de UPD paterna que se ha detectado en pacientes con herencia de al menos dos regiones idénticas de patrón cromosómico 2 llevando SRD5A2 del gen mutante, resultando en 5α -SR2D. Estas observaciones alternan el mecanismo de 5α -SR2D puede derivar de un solo familiar.

RESUMEN:

La deficiencia tipo 2 de 5 α -reductasa es una forma recesiva autosómica de pseudohermafroditismo masculino causado por mutación del gen SRD5A2.

En este estudio nosotros realizamos el análisis del DNA en dos sujetos no familiares variando la deficiencia enzimática y encontrando diferencias en el modo de transmisión de la enfermedad. Los datos muestran que en ambas familias los padres fueron llevados para una mutación E197D, mientras que la madre fue llevada para una mutación P212R. El paciente 1 fue identificado como heterocigoto porque el tenía ambas alteraciones (E197D/P212R).

De lo contrario, el paciente 2 se encontró ser homocigoto pero solamente para la mutación paterna.

Porque estos hallazgos podrían no ser explicados sobre la base de no paternidad o una anomalía cromosómica, la presencia de disomía uniparental fue sugerida.

La reducción para homocigotos por la mutación del E197D fue confirmada por análisis de restricción, supuestamente vistos.

Los resultados de nuestro estudio dan evidencia del primer caso de deficiencia 5 α reductasa resultado de disomía uniparental y también un mecanismo alternativo de este trastorno enzimático que puede derivar de un solo padre.

REFERENCIAS

1. - **Wilson JD, Griffin JE, Russel DW.** 1993 Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev.* 14:577-593.
2. - **Walsh PC, Madden JD, Harrod MJ, Goldstein JL, MacDonald PC, Wilson JD.** 1974 Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2: decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *N Engl J. Med.* 291:944-949.
3. - **Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE.** 1974 Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science.* 186:1213-1215.
4. - **Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russel DW.** 1991 Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature.* 354:159-161.
- 5.- **Thigpen AE, Davies DL, Milatovich A, et al.** 1992 Molecular genetics of steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *J Clin Invest.* 90:799-809.
6. - **Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell DW.** 1992 Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 α -reductase. *J Clin Invest.* 89:239-300.
7. - **Forti G, Falchetti A, Santoro S, Davies DL, Wilson JD, Russell DW.** 1996 Steroid 5 α -reductase 2 deficiency: virilization in early infancy may be due to partial function of mutant enzyme. *Clin Endocrinol.* 44:477-482.
- 8.- **Vilchis F, Méndez JP, Canto P, Lieberman E, Chávez B,** 2000 Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Clin Endocrinol* 52:383-388.
9. - **Engel E.** 1980 A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect isodisomy. *Am J Med Genet.* 6:137-143.
10. - **Engel E.** 1998 Uniparental disomies in unselected populations. *Am J Hum Genet.* 63:962-966.
- 11.- **Vilchis F, Canto P, Chávez B, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP.** 1997 Molecular analysis of the 5 α -steroid reductase type 2 in a family with deficiency of the enzyme. *Am J Med Genet.* 69:69-72.
12. - **Orita M, Susuki Y, Sekiya T, Hayashi K.** 1989 Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 5:874-879.
13. - **Canto P, Vilchis F, Chávez B, et al.** 1997 Mutations of the 5 α -reductase type 2 gene in eight mexican patients from six different pedigrees with 5 α -reductase-2 deficiency. *Clin Endocrinol.* 46:155-160.
- 14.- **Vilchis F, Hernández D, Canto P, Méndez JP, Chávez B.** 1997 Codon 89 polymorphism of the human 5 α -steroid reductase type 2 gene. *Clin Genet.* 51:399-402.
15. - **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989 Molecular cloning:: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Laboratory Press.
16. - **Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, et al.** 1991 Analysis of the VNTR locus. D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet.* 48:137-144.
17. - **Gyapay G, Morissette J, Vignal A, et al.** 1994 The 1993-1994 génethon human genetic linkage map. *Nat Genet* 7:246-339.
18. - **Russell DW, Wilson JD.** 1994 Steroid 5 α -reductase two genes, two enzymes. *Annu Rev Biochem.* 63:25-61

- 19.- **Ortiz G, Ayala A, Cervera R, et al.** 1999 Male pseudohermaphroditism due to mutations in the 5 α -steroid reductase type 2 gene in a Mexican family: a molecular analysis. Presente at the 81st Annual Meeting of The Endocrine Society, San Diego, CA, Abstract P2-161.
- 20.- **Spence JE, Perciaccante RG, Greig GM, et al.** 1988 Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet* 42:217-226.
21. - **Ledbetter E, Engel.** 1995 Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Genet.* 4:1757-1764.
- 22.- **López- Gutiérrez AU, Riba L, Ordoñez-Sánchez ML, et al.** 1998 Uniparental disomy for chromosome 6 results in steroid 21-hydroxylase deficiency: evidence of different genetic mechanisms involved in the production of the disease. *J Med Genet.* 35:1014-1019.
23. - **Harrison K, Eisenger K, Anayane-Yebova , Brown S.** 1995 Maternal uniparental disomy of chromosome 2 in a baby with trisomy 2 mosaicism in amniotic fluid culture. *Am J. Med Genet.* 58:147-151.
24. - **Bernard LE, Kalousek Dk, Langlois S, et at.** 1995 Confined placental mosaicism for trisomy 2 with fetal maternal uniparental disomy of chromosome 2. *Am J Hum Genet Suppl.* 57:A51.
25. - **Bernasconi F, Karagùzel A, Celep, F et al.** 1996 Normal phenotype with maternal isodisomy in a female with two isochromosomes. i(2p) and i(2q). *Am J Hum Genet.* 59:1114-1118.