



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

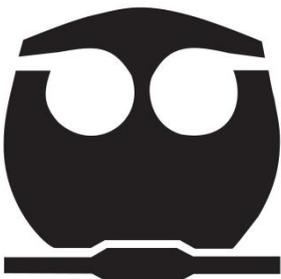
**“ALTERACIONES EN LA ACTIVIDAD DE
5 α -REDUCTASA TIPO 2 DEBIDO A
MUTACIONES GÉNICAS DE *SRD5A2*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA:

ERIKA BAEZA PONCE



Ciudad Universitaria, CDMX.

2017



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. MARINA GAVILANES RUIZ

VOCAL: DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SECRETARIO: DR. LUIS RAMOS TAVERA

PRIMER SUPLENTE: DRA. SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

SEGUNDO SUPLENTE: DRA. MARÍA DEL CONSUELO PLATA RAMOS

EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA HORMONAL, DEPTO. DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”.

ASESOR:

DR. LUIS RAMOS TAVERA

SUSTENTANTE:

ERIKA BAEZA PONCE

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN	6
<i>Diferenciación Sexual.....</i>	6
<i>Esteroidogénesis.....</i>	11
<i>Mecanismo de acción de los andrógenos</i>	15
<i>5α-Reductasa tipo 2.....</i>	18
<i>Deficiencia de 5α-Reductasa tipo 2.....</i>	21
ANTECEDENTES	27
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS.....	30
METODOLOGÍA	31
<i>Preparación de células para transfección</i>	31
<i>Transfección</i>	32
<i>Actividad de 5α-reductasa 2 en células HEK-293 transfectadas.....</i>	34
<i>Extracción del esteroide</i>	34
<i>Cromatografía en capa fina.....</i>	35
<i>Cuantificación de proteínas.....</i>	36
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	49
BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Cascada de eventos moleculares llevados a cabo en etapas tempranas del desarrollo embrionario humano, durante la diferenciación sexual.....	10
Fig. 2. Vía Δ^4 (letra azules) y Δ^5 (letras rojas) para la biosíntesis de T y DHT a partir de colesterol.....	13
Fig. 3. Mecanismo de acción de T y DHT.....	17
Fig. 4. Reacción enzimática efectuada por las 5 α -reductasas.....	18
Fig. 5. Mutaciones identificadas en el gen <i>SRD5A2</i> relacionadas con la deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2.....	23
Fig. 6. Diagrama esquemático de las variantes génicas de <i>SRD5A2</i> descritas en este estudio.....	28
Fig. 7. Representación esquemática del plásmido utilizado en la transfección.....	32
Fig. 8. Cromatografía en capa fina de la extracción de esteroides.....	37
Fig. 9. Actividad <i>in vitro</i> de las variantes génicas de <i>SRD5A2</i> evaluadas.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas esteroidogénicas que intervienen en la síntesis de testosterona.....	11
Tabla 2. Comparación de las isoenzimas esteroides humanas 5 α -reductasa 1 y 2.....	20
Tabla 3. Variantes génicas de <i>SRD5A2</i> analizadas.....	33
Tabla 4. Cuadro comparativo de las tres bases de datos utilizadas en el análisis <i>in silico</i> de las mutaciones en <i>SRD5A2</i>	40

RESUMEN

La 5 α -reductasa 2 (*SRD5A2*) desempeña un papel biológico importante en el desarrollo y crecimiento de la próstata, así como en la diferenciación sexual de los genitales externos masculinos. Esta enzima es responsable de la conversión de testosterona (T) a dihidrotestosterona (DHT) durante la embriogénesis. Mutaciones inactivantes en el gen *SRD5A2* provocan deficiencia de 5 α -reductasa 2, un desorden autosómico recesivo expresado únicamente en varones 46,XY. Hasta el momento han sido reportadas aproximadamente 100 mutaciones diferentes; no obstante, en la gran mayoría de estas alteraciones génicas, los estudios bioquímicos de este desorden son desconocidos y no dejan en claro la relación estructura-función ni las consecuencias clínicas de este defecto congénito. El objetivo del estudio es determinar el efecto que causan las variantes génicas de *SRD5A2* sobre las propiedades catalíticas de la 5 α -reductasa tipo 2; para ello los cDNAs mutados fueron expresados en células HEK-293 y se determinó su actividad enzimática a una concentración 4 μ M de T. El análisis de secuencia (c. 433C>T, c.686T>C, c.145G>A/c.265C>G y c.145G>A/c.265G>C) y los ensayos de actividad con estas variantes mostraron la presencia de aminoácidos estructuralmente funcionales. En este estudio se identificaron residuos de aminoácidos (p.R145W, p.F229S, p.A49T/p.L89V, p.A49T/p.V89L) de *SRD5A2* que son determinantes para la formación adecuada de DHT. También se determinó la existencia de sitios o regiones propensas a mutaciones inactivantes y con ganancia de función en *SRD5A2* mediante el análisis mutacional *in silico*. Los resultados remarcan la importancia de una actividad de 5 α -reducción óptima para T en la fisiología masculina.

INTRODUCCIÓN

Diferenciación Sexual

Durante la embriogénesis del humano, la diferenciación sexual se lleva a cabo mediante tres etapas consecutivas (Jost, 1970). La primera involucra el establecimiento del **sexo cromosómico**, el cual se realiza al momento de la fertilización del óvulo. En mamíferos el sexo homogamético (XX) corresponde al sexo femenino y el sexo heterogamético (XY) al masculino. En la segunda etapa, el sexo cromosómico induce la formación del **sexo gonadal**. En humanos, la integridad estructural de los genes presentes en los cromosomas sexuales y autosomas es de gran importancia biológica para la determinación y diferenciación sexual masculina o femenina de la gónada primitiva. Aún no se conoce bien el mecanismo por el cual la información genética transforma la gónada bipotencial en ovario; sin embargo, se ha reportado que la gónada indiferenciada se desarrolla como testículo, cuando es estimulada por el gen *SRY*. Finalmente, en la tercera etapa, el **sexo fenotípico o anatómico** se desarrolla a consecuencia del sexo gonadal. Para la formación del fenotipo, las características sexuales en ambos géneros son determinadas y los genitales externos e internos son diferenciados.

En las primeras etapas embrionarias (5^a semana), la expresión génica de *WT1*, *SF1* y *LIM1* es fundamental para la diferenciación de la gónada bipotencial (fig. 1). La expresión de los genes localizados en el cromosoma Y determinan la diferenciación sexual masculina; entre ellos está el factor determinante del testículo *SRY* (Sex-determining Region of the Y chromosome). Este gen es el

principal iniciador de la cascada de interacciones genéticas que determinan la formación de los testículos a partir de la gónada bipotencial. El gen *SRY* contiene un solo exón y codifica para una proteína con un motivo de unión al DNA, por lo que actúa como un factor de transcripción nuclear, el cual contiene un grupo de aminoácidos que se unen al DNA, conocido como caja HMG (por su semejanza con un grupo de proteínas conocidas como *High Mobility Group proteins*). Este factor de transcripción regula la expresión de otros genes como *SOX9*, *DMRT1/2* y *SF1* (Capel, 1998), desencadenando la formación de la gónada masculina. Se ha descrito que *SRY* también controla la expresión de enzimas esteroidogénicas (Haqq et al., 1994).

Además, *SRY* estimula la expresión del factor de transcripción *SOX9*, iniciando la diferenciación de células del estroma en células de Sertoli. En la ausencia de *SOX9*, las células germinales primordiales entran en meiosis, inhibiendo la formación de los testículos. En individuos 46,XX la ausencia de *SRY* junto con la activación de genes como *WNT4*, *DAX1*, *RSPO1* y *FOXL2* regulan la determinación sexual femenina (fig. 1), permitiendo así la diferenciación ovárica (Biaison-Lauber & Chaboissier, 2015).

El desarrollo genital en las primeras etapas del embarazo es indistinguible porque las gónadas están indiferenciadas. A partir de la séptima semana de gestación, el feto humano comienza a presentar tanto conductos de Müller (paramesonéfricos) como conductos de Wolff (mesonéfricos). Los primeros permiten el desarrollo de estructuras del aparato reproductor femenino, mientras que los conductos de Wolff

el desarrollo del aparato reproductor masculino. La diferenciación sexual femenina primaria no depende de la acción de las hormonas esteroideas y ocurre incluso en ausencia de ovarios (Moore et al., 2013), contrario a la diferenciación masculina, la cual requiere que se lleve a cabo el desarrollo testicular y la acción de tres hormonas importantes: la hormona antimülleriana (AMH) y los andrógenos, testosterona y dihidrotestosterona.

Las células de Sertoli, presentes en el testículo fetal, secretan AMH (Josso et al., 1993; Lee & Donahoe, 1993), una glucoproteína que provoca la regresión de los conductos de Müller (Baarends et al., 1994); estos permiten el desarrollo de las trompas de Falopio, útero, cérvix y el tercio superior de la vagina en individuos 46,XX (Behringer, 1994). El grado de regresión de los conductos müllerianos es directamente proporcional a los niveles de AMH, siendo ésta el primer marcador específico de células de Sertoli expresado en el desarrollo testicular. El gen que codifica para esta hormona es regulado por el factor transcripcional *SF1* (Shen et al., 1994).

Alrededor de la 8^a semana de gestación, las células de Leydig se diferencian y comienzan a secretar andrógenos. Se ha reportado que embriones femeninos y masculinos tienen el mismo receptor de andrógenos (AR), la única diferencia entre ellos son los niveles de andrógenos que reciben (Rey et al., 1996). Los andrógenos T y DHT interactúan con un mismo receptor nuclear, el AR, pero ejercen diferentes efectos fisiológicos en varones (fig. 1). La T, andrógeno secretado en mayor cantidad por los testículos, al unirse con su receptor estimula

la formación de los genitales internos (conductos deferentes, vesícula seminal y epidídimo) y la espermatogénesis; mientras que la unión DHT-AR se encarga de regular la virilización de genitales externos (uretra, escroto y pene) y próstata.

La acción de los andrógenos comienza una vez que la T ha sido transportada al órgano y tejidos blanco. Dentro de la célula, la T se reduce a DHT por acción de la enzima 5 α -reductasa 2 o se aromatiza a estradiol por P450arom (Wilson et al., 1993), como se describe más adelante. Diversos estudios realizados revelan que la alteración molecular y bioquímica de la 5 α -reductasa tipo 2 está ligada con desórdenes del desarrollo sexual 46,XY (DSD 46,XY) (Chávez et al., 2014).

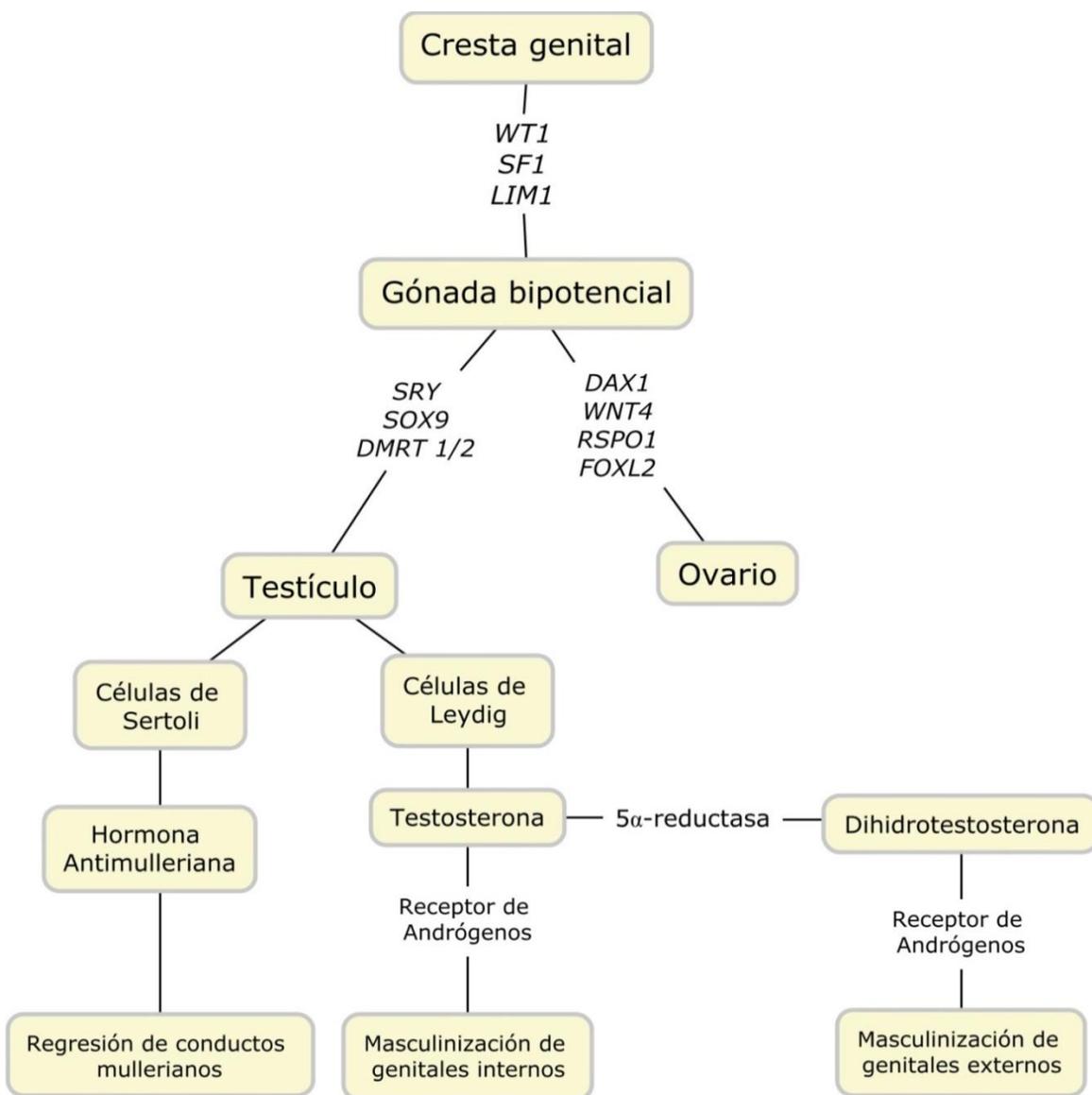


Fig. 1. Cascada de eventos moleculares llevados a cabo en etapas tempranas del desarrollo embrionario humano, durante la diferenciación sexual.

Esteroidogénesis

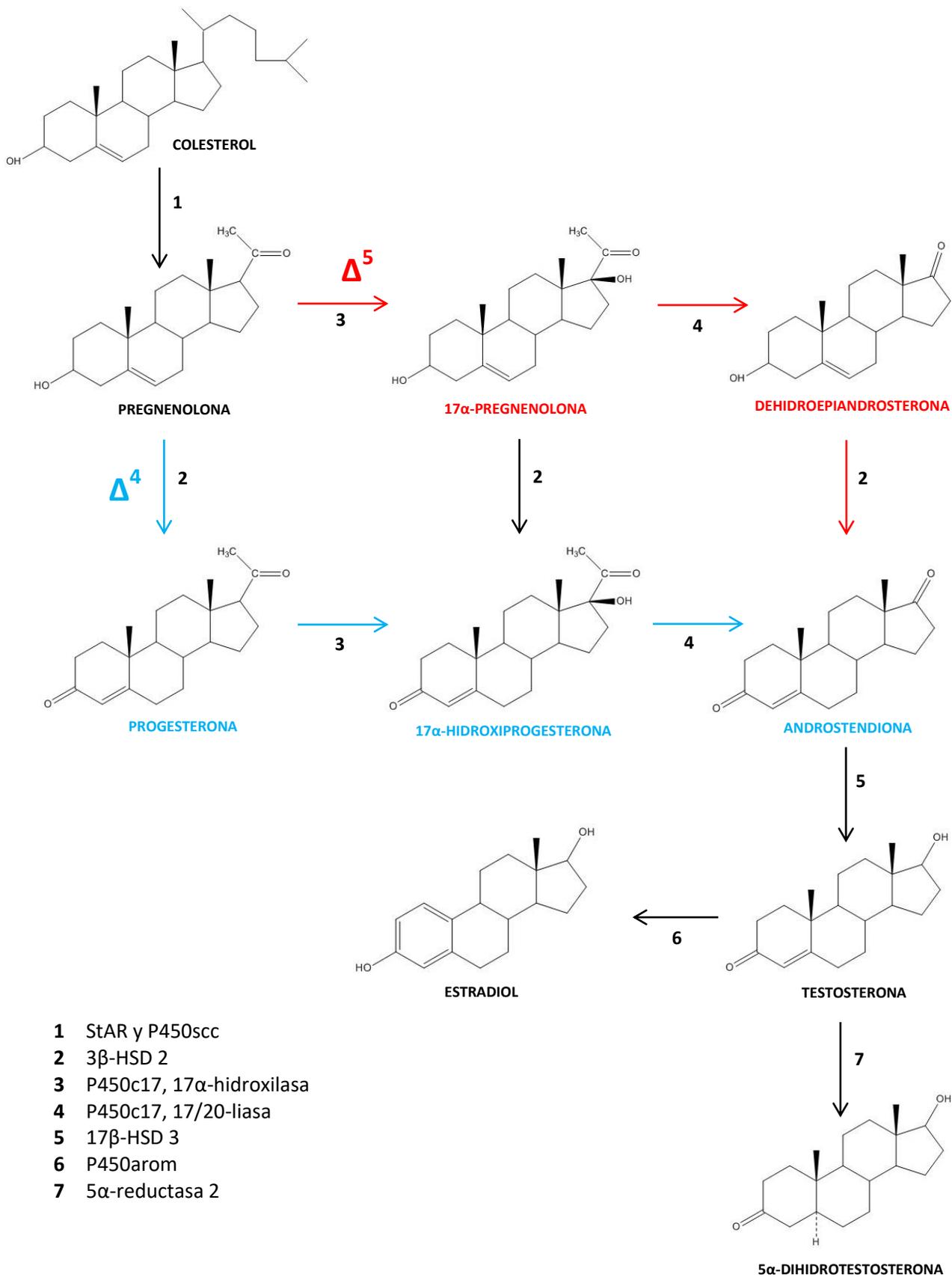
Las hormonas esteroides son clasificadas en glucocorticoides (cortisol), mineralocorticoides (aldosterona) y esteroides sexuales (progestágenos, andrógenos y estrógenos). En mamíferos, los órganos endócrinos especializados y primordiales en sintetizar estas hormonas son: las glándulas suprarrenales, los ovarios, los testículos, el sistema nervioso central en menor proporción y transitoriamente la placenta (Gómez-Chang et al., 2012; Hanukoglu, 1992). La T, como los demás esteroides, es sintetizada a partir de colesterol. Éste puede proceder de la ingesta dietética o puede ser sintetizado por el organismo a partir de acetil-Coenzima A (acetil-CoA). En el testículo, las células de Leydig son las responsables de la formación de andrógenos. Esta biosíntesis de esteroides o esteroidogénesis se lleva a cabo por medio de diversas enzimas (tabla 1) como diferentes tipos de citocromo P450, hidroxiesteroide deshidrogenasas y reductasas (Miller, 1988; Payne & Hales, 2004).

Tabla 1. Enzimas esteroidogénicas que intervienen en la síntesis de testosterona.

Enzima	Gen	Función
P450scc	<i>CYP11A1</i>	Rompe la cadena lateral del colesterol
3β-HSD	<i>HSD3B2</i>	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenación
P450c17	<i>CYP17</i>	17 α -hidroxilación / Escisión del enlace C ₁₇ -C ₂₀
17β-HSD	<i>HSD17B3</i>	17-cetoesteroide reducción
P450arom	<i>CYP19</i>	Aromatización de andrógenos a estrógenos
5α-reductasa 2	<i>SRD5A2</i>	5 α -reducción de compuestos Δ^4 ,3 ceto

En gónadas y corteza suprarrenal, la proteína StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) participa en el transporte de colesterol hacia el interior de la membrana mitocondrial, donde puede ser hidroxilado a pregnenolona por acción del citocromo P450_{scc} (*Cholesterol Side Chain Cleavage enzyme*) siendo éste un paso limitante en la biosíntesis de T (Auchus & Miller, 1999). Las primeras etapas en la síntesis de andrógenos son compartidos entre glucocorticoides, mineralocorticoides y esteroides sexuales. Por lo tanto, defectos dentro de estos primeros pasos puede afectar todos o al menos dos de los substratos finales dentro de los testículos y las glándulas adrenales (Miller, 1998).

La síntesis de T ocurre a través de dos vías conocidas como Δ^4 y Δ^5 (Hu et al., 2010; Sanderson, 2006; Wilson, 1975a); el nombre es asignado en función de la posición del enlace insaturado de los esteroides intermediarios que se forman durante los procesos de síntesis de la T (Pozzi, 2001). En el humano, la vía predominante para la síntesis de T es la vía Δ^5 (fig. 2).



- 1 StAR y P450scc
- 2 3 β -HSD 2
- 3 P450c17, 17 α -hidroxilasa
- 4 P450c17, 17/20-liasa
- 5 17 β -HSD 3
- 6 P450arom
- 7 5 α -reductasa 2

Fig. 2. Vía Δ^4 (letras azules) y Δ^5 (letras rojas) para biosíntesis de T y DHT a partir de colesterol.

La siguiente enzima que juega un rol importante en la biosíntesis de andrógenos es la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) tipo 2 debido a que biotransforma pregnenolona a progesterona (vía Δ^4) en el retículo endoplásmico de la corteza suprarrenal y dehidroepiandrosterona (DHEA) en androstendiona (vía Δ^5) (fig. 2). Algunas enzimas, como P450c17, catalizan más de un paso en la vía de síntesis de andrógenos. Esta enzima se encuentra en los ovarios y en los testículos y tiene actividad de 17 α -hidroxilasa y 17/20-liasa. La actividad 17 α -hidroxilasa cataliza la conversión de pregnenolona a 17 α -pregnenolona y la conversión de progesterona a 17 α -hidroxiprogesterona, mientras que la 17/20-liasa es necesaria para transformar 17 α -pregnenolona a DHEA y 17 α -hidroxiprogesterona a androstendiona (Sanderson, 2006; Sewer et al., 2008). La especificidad del tejido y del sustrato determina si la biosíntesis de andrógenos sigue a través de pregnenolona o progesterona (Samtani et al., 2011). Finalmente, la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) tipo 3 convierte androstendiona en T dentro de los testículos. La producción suprarrenal de T es insignificante (Zhu et al., 1998). La T viaja por torrente sanguíneo a tejidos periféricos hasta ser transportada a las células blanco, donde es convertida a DHT por la enzima 5 α -reductasa tipo 2 y también puede ser biotransformada a estradiol por acción de la aromatasa (P450arom) (Havelock et al., 2004).

Mecanismo de acción de los andrógenos

El mecanismo mediante el cual los andrógenos, T y DHT, ejercen su efecto fisiológico es representado gráficamente en la figura 3. La acción de los andrógenos está mediada por la asociación de complejos andrógeno-receptor de andrógenos (A-AR) (Russell & Wilson, 2014), este complejo depende de múltiples proteínas y/o factores transcripciones involucrados en su activación, transporte hacia el núcleo y su unión con el DNA (Jenster et al., 1993; Shaffer et al., 2004).

Los receptores de hormonas esteroideas son proteínas intracelulares que, al unirse con su ligando, activan la transcripción y la expresión de genes esteroide-dependientes (Wilson & Davies, 2007); entre ellos se encuentra el AR, el cual es un factor de transcripción nuclear que controla la expresión de genes andrógeno-dependientes (Hughes, 2001). Estructuralmente, el AR está constituido por tres dominios: el de activación de la transcripción (extremo N-terminal) y dos dominios altamente conservados que son el de unión al DNA (dos dedos de zinc) y el de unión a los andrógenos (región C-terminal) (Jenster et al., 1991; Simental et al., 1991).

Los andrógenos entran la célula blanco por difusión pasiva y se unen al AR, el cual sufre un cambio conformacional, una fosforilación de los residuos de serina (16, 81, 94, 256, 308, 424 y 650) y la disociación de las proteínas de choque térmico (HSP90, HSP70, HSP56/P59) las cuales mantienen inactivo al receptor en ausencia del ligando (Green et al., 2012). Todo esto incrementa la afinidad del AR

por componentes nucleares y penetra en el núcleo. T es el esteroide que predomina en la célula (Grino et al., 1990), pero DHT ocupa la mayoría de los receptores al tener mayor afinidad con el AR (Steers, 2001).

El complejo A-AR activado puede formar homodímeros a través de la interacción antiparalela entre el dominio amino y carboxilo terminal. La interacción del AR (mediante los denominados dedos de zinc) con los elementos de respuesta para andrógenos (ERA) permite la formación estable del complejo A-AR. Los ERA son secuencias consenso de nucleótidos y se encuentran ubicados río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

En conjunto, el complejo transcripcional modifica la estructura de la cromatina, interviene en el reclutamiento de la RNA polimerasa tipo II e induce los mecanismos de transcripción, induciendo así la biogénesis de proteínas andrógeno-reguladas, las cuales ejercen efectos sobre la diferenciación sexual (Deslypere et al., 1992; Steers, 2001).

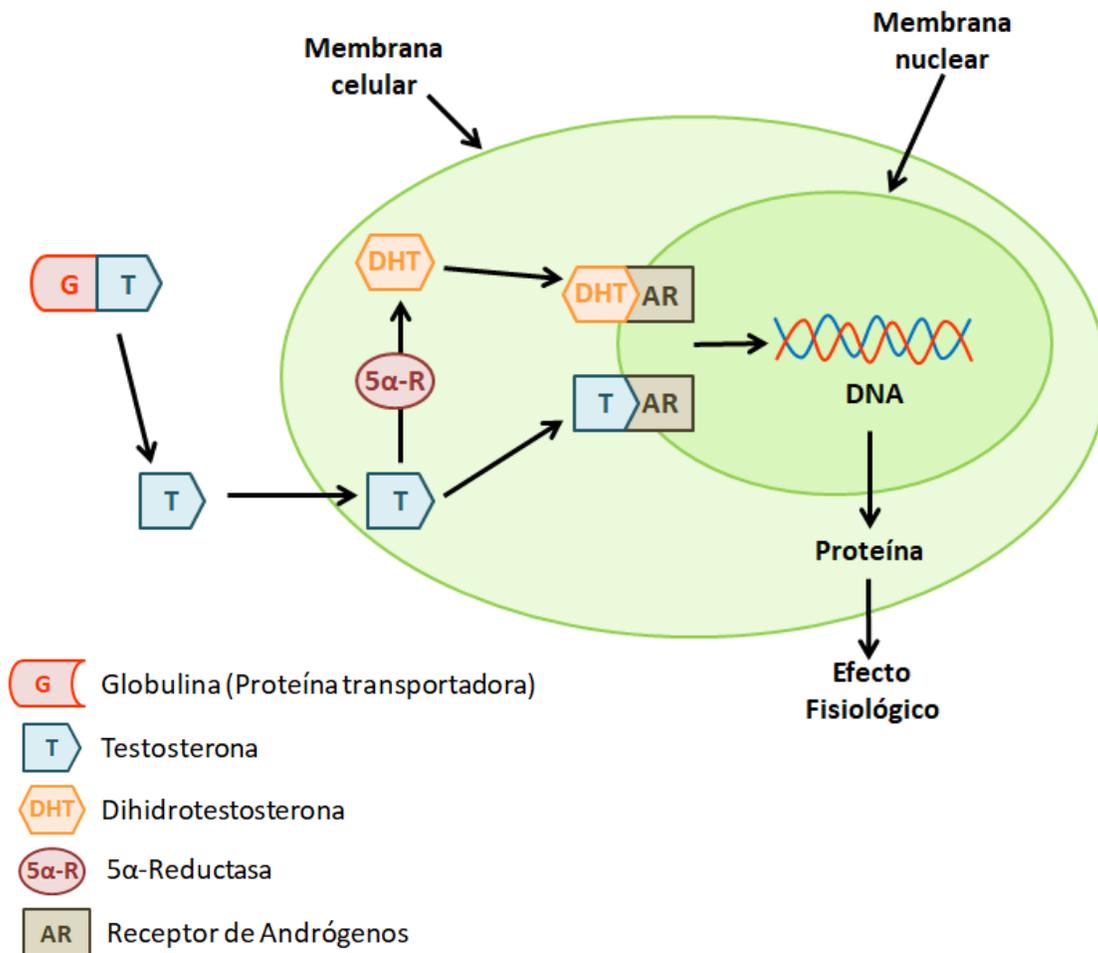


Fig. 3. Mecanismo de acción de T y DHT. La T circulante es transportada a tejidos periféricos unida a proteínas plasmáticas (globulina principalmente), hasta llegar a las células blanco donde, por su liposolubilidad, atraviesa fácilmente la membrana celular. Una vez en el citoplasma, T es convertida a DHT por la enzima 5 α -reductasa tipo 2.

5 α -Reductasa tipo 2

Se han caracterizado dos 5 α -reductasas humanas (tipo 1 y 2) con distintas propiedades bioquímicas y farmacológicas. Las 5 α -reductasas son dependientes exclusivamente del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). El NADPH proporciona el ión hidrógeno para el carbono 5, mientras que un protón, a partir de la molécula de H₂O, es transferido al carbono 4 (Björkhem, 1969; Björkhem & Holmberg, 1973) (fig. 4). Estas enzimas se localizan en los microsomas y catalizan la reducción de esteroides C₁₉ y C₂₁ que poseen un doble enlace C₄-C₅ y un grupo ceto en la posición C₃ como T, Δ^4 -androstendiona y progesterona (Zhu & Imperato-Mcginley, 2008). El papel fisiológico más conocido y mejor estudiado de estas enzimas (principalmente la 5 α -reductasa tipo 2) es la transformación de T a DHT, andrógeno responsable del desarrollo normal de los genitales externos masculinos, la próstata y de la virilización durante la pubertad (Wilson, 1975). La 5 α -reductasa tipo 2 es la isoforma predominante en tejido prostático normal (Audet-Walsh et al., 2017).

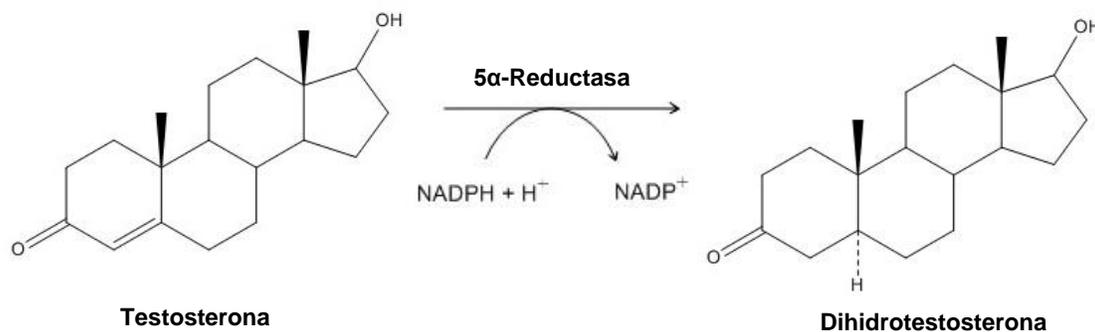


Fig. 4. Reacción enzimática efectuada por las 5 α -reductasas.

La enzima 5 α -reductasa 1 (EC 1.3.99.5) es una proteína de 259 aminoácidos, con un peso molecular de 29 kDa aproximadamente (Andersson & Russell, 1990). Su expresión ha sido detectada principalmente en piel, riñón y cuero cabelludo (Andersson & Russell, 1990; Jenkins et al., 1992); además de encontrarse en ovario y testículo (Russell & Wilson, 2014). El gen que codifica para esta enzima es denominado *SRD5A1*, se encuentra en el cromosoma 5 (banda p15) y contiene 5 exones y 4 intrones, abarcando 35 Kb de DNA genómico (Andersson & Russell, 1990; Jenkins et al., 1991).

El gen *SRD5A2* que codifica para la 5 α -reductasa tipo 2 humana (EC 1.3.1.22) se encuentra localizado en el cromosoma 2 (banda p23) y está constituido por 5 exones separados por 4 intrones que abarcan cerca de 40 Kb del DNA genómico (Vilchis & Chávez, 2002). La proteína tipo 2 contiene 254 aminoácidos y un peso molecular de 28 kDa, presentando un 60% de identidad con la isoenzima tipo 1 (Russell & Wilson, 2014). Se ha reportado que ambas isoenzimas están compuestas de un elevado número de aminoácidos hidrofóbicos, lo que permite una localización intrínseca en la membrana, y tienen una K_m aparente (3-10 μ M) muy similar para el cofactor NADPH. Por otra parte, el gen *SRD5A2* presenta 2 polimorfismos localizados en el codón 49 (A49T) y 89 (V89L) (Labrie et al., 1992; Vilchis et al., 1997).

La 5 α -reductasa 2 tiene una mayor afinidad por los sustratos esteroides que la tipo 1 y un pH óptimo ácido muy estrecho (4.5-5.5) (Normington & Russell, 1992; Silver et al., 1994; Vilchis & Chávez, 2002); se expresa principalmente en tejido

gonadal y prostático (tabla 2). Mutaciones en *SRD5A2* provocan deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2, un desorden congénito de diferenciación sexual caracterizado por presentar clínicamente hipospadias perineoescrotales, criptorquidia, micropene y pseudovagina (Andersson et al., 1991). Un mecanismo alternativo de deficiencia enzimática ha sido descrito para disomía uniparental (Chávez et al., 2000). Además, la actividad de la 5 α -reductasa 2 parece estar asociada con la etiología de varias alteraciones endocrinas tales como hiperplasia benigna prostática, alopecia androgénica, acné, hirsutismo femenino y muy probablemente cáncer de próstata (Giwercman et al., 2005).

Tabla 2. Comparación de las isoenzimas esteroides humanas 5 α -reductasa 1 y 2.

Características	5 α -reductasa 1	5 α -reductasa 2
Gen	<i>SRD5A1</i>	<i>SRD5A2</i>
Estructura del gen	5 exones y 4 intrones	5 exones y 4 intrones
Localización	5p15	2p23
Tamaño	259 aa	254 aa
Peso Molecular	29.4 kDa	28.3 kDa
pH óptimo	7.5	5.0
Distribución tisular	Riñón, piel, próstata, ovario y testículo	Tejido urogenital masculino y femenino
K_m para Testosterona	4 μ M	<1 μ M
Actividad en deficiencia de 5 α -reductasa	Normal	Mutada

Modificado de Russell & Wilson, 2014.

Deficiencia de 5 α -Reductasa tipo 2

La deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 (OMIM #264600) es un desorden del desarrollo sexual 46,XY relativamente raro (Hughes et al., 2006) que resulta en niveles bajos de DHT y diferenciación incompleta de los genitales externos. Los individuos afectados presentan un cariotipo 46,XY, parcial o totalmente incapaces de convertir T a DHT. Al nacimiento presentan genitales ambiguos, caracterizados comúnmente por ausencia de conductos de Müller pero presencia de conductos de Wolff (Imperato-Mcginley & Zhu, 2002; Wilson et al., 1993) estos conductos permiten el desarrollo de estructuras reproductivas internas masculinas (vasos deferentes, vesículas seminales y epidídimo) y estructuras externas femeninas (labios mayores y menores y una vagina corta que termina en fondo ciego), además de micropene e hipoplasia prostática. Los testículos se encuentran en el canal inguinal o en los pliegues labio-escrotales y si éstos llegan a descender, la espermatogénesis se presentan de forma habitual (Imperato-McGinley & Zhu, 2002). Debido a que no hay un fenotipo específico en individuos 46,XY afectados, el cuadro clínico es heterogéneo y también puede incluir un fenotipo masculino completo con hipospadias o únicamente micropene (Bahceci et al., 2005; Carpenter et al., 1990; Hackel et al., 2005; Hiort et al., 1996; Warne & Zajac, 1998).

Los DSD 46,XY a causa de una deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 son debido a una alteración autosómica recesiva. Dado que la 5 α -reductasa 2 no juega un rol esencial en la fisiología endocrina de las mujeres, alteraciones génicas en el

SRD5A2 no tienen repercusiones fenotípicas en ellas, de tal suerte que las homocigotas o heterocigotas tienen un fenotipo femenino normal (Imperato-McGinley & Zhu, 2002), se desarrollan con normalidad en la pubertad, tienen ciclos ovulatorios menstruales y son completamente fértiles (Chávez et al., 2000, 2014; Vilchis et al., 2008, 2010); sin embargo no presentan vello en piernas ni en brazos (Russell & Wilson, 1994; Vilchis et al., 1997).

Se han reportado diversas mutaciones esparcidas a lo largo de los 5 exones de SRD5A2 (fig. 5), desde mutaciones puntuales hasta deleciones del gen completo; siendo la mayoría mutaciones con sentido erróneo; aunque, codones de paro prematuros y pequeñas deleciones también han sido descritas (Imperato-Mcginley & Zhu, 2002; Thigpen et al., 1992; Wilson et al., 1993; Zhu et al., 1998). Estas mutaciones pueden ocasionar variaciones o pérdida en la actividad enzimática; la unión incorrecta del sustrato y/o el cofactor con la isoenzima; bloqueo en la síntesis de la isoenzima funcional (deleciones, mutaciones sin sentido, anormalidades en el corte y empalme); o una isoenzima inestable y alteraciones de la síntesis de la enzima por mutaciones (aún no caracterizadas) fuera de la secuencia codificante que perjudican la expresión de los productos génicos (Can et al., 1998; Russell & Wilson, 1994; Wigley et al., 1994). Aún con todo lo anterior, no se ha establecido una correlación entre la genética de la enfermedad con un defecto bioquímico en particular (Imperato-McGinley & Zhu, 2002).

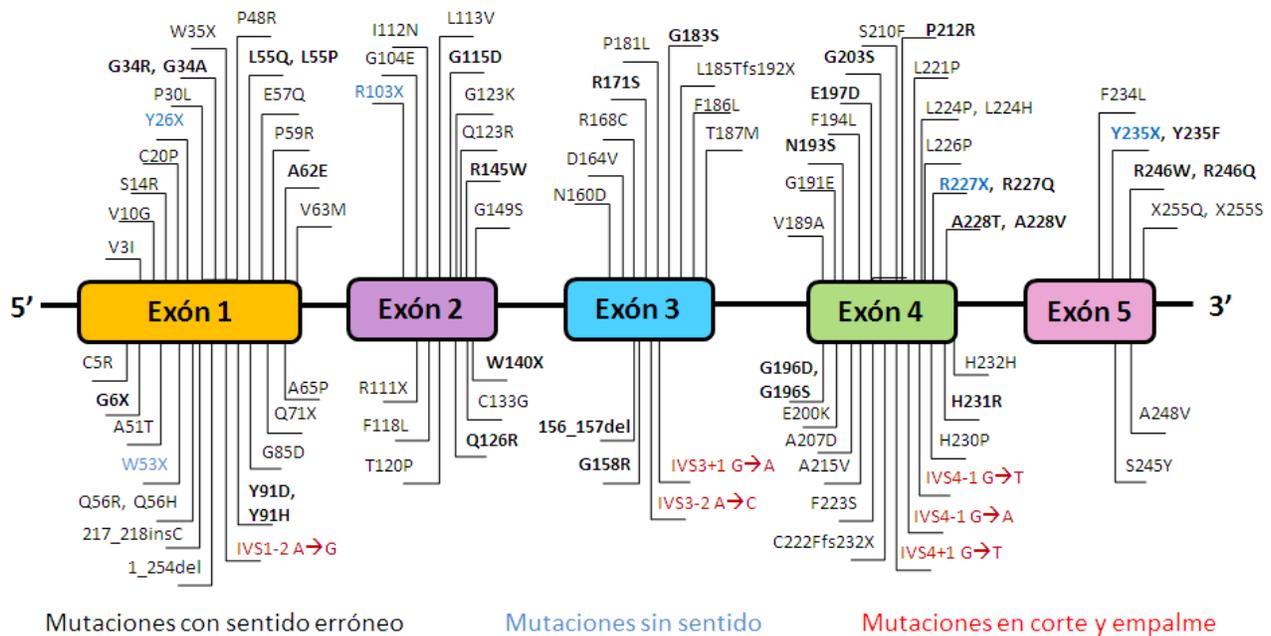


Fig. 5. Mutaciones identificadas en el gen *SRD5A2* relacionadas con la deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 reportadas a la fecha. Las mutaciones más frecuentes están en negritas. (Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Depto. de Biología de la Reproducción, INCMNSZ).

Las mutaciones de *SRD5A2* pueden clasificarse en dos grandes categorías (Bahceci et al., 2005) dependiendo de la frecuencia y la población donde se presenten: mutaciones recurrentes, porque han sido reportadas en diferentes poblaciones (Russell et al., 1994; Wilson et al., 1993) y mutaciones en grupos étnicos específicos (Hochberg et al., 1996; Mazen et al., 2003; Thigpen et al., 1992; Wilson et al., 1993). Se piensa que su alta incidencia se debe a un efecto fundador génico presente en aislamientos geográficos de personas con un alto índice de endogamia (Imperato-McGinley & Zhu, 2002). La consanguinidad está presente en aproximadamente un tercio de los pacientes reportados, y la historia familiar es positiva en el 40% de las familias analizadas (Wilson et al., 1993).

A la fecha se han reportado alrededor de 100 alteraciones génicas diferentes de *SRD5A2* en pacientes con deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 (Nordenskjöld & Ivarsson, 1998; Vilchis et al., 2000; Wilson et al., 1993; Zhu et al., 1998), incluyendo las tres grandes familias de pseudohermafroditas masculinos con deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 en el mundo: República Dominicana, Nueva Guinea y Turquía. Estas mutantes abarcan inserciones, deleciones, mutaciones erróneas, sin sentido y sinónimas, deleción completa del gen y al menos dos variantes polimórficas; de éstas, aproximadamente el 65% son sustituciones de una base que provocan cambio de un aminoácido. Los afectados en Nueva Guinea son los únicos en tener una deleción de toda la secuencia codificante del gen *SRD5A2* (Wilson et al., 1993). Con excepción de un caso único de disomía uniparental (Chávez et al., 2000), muchos pacientes con esta enfermedad son homocigotos (65%) o heterocigotos compuestos (35%) para mutaciones con pérdida de función (Maimoun et al., 2011; Vilchis et al., 2010).

Los individuos que padecen deficiencia de 5 α -reductasa presentan: 1) niveles normales o elevados de T en plasma; 2) bajos niveles de DHT en plasma; 3) incremento en la proporción de T con respecto a DHT en plasma; 4) disminución de la conversión de T a DHT *in vivo* al igual que de la producción de metabolitos androgénicos 5 α -reducidos y 5) disminución urinaria y sanguínea de 5 α -androstendiol y androstendiona (productos finales principales del metabolismo de DHT) (Imperato-Mcginley & Zhu, 2002; Wilson et al., 1993). Existe otra categoría de pacientes en la cual la actividad de 5 α -reductasa es medible pero presenta un comportamiento cinéticamente anormal. La 5 α -reductasa de estos pacientes tiene

una K_m aparente normal para T, pero la afinidad de la enzima para reducir NADPH se encuentra disminuida y como consecuencia la enzima es inestable (Wilson et al., 1993).

El diagnóstico de la deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 requiere una combinación de estudios clínicos, endocrinológicos y de función enzimática, como: análisis del árbol genealógico, análisis genético-moleculares y análisis de la actividad de 5 α -reductasa 2 en fibroblastos de piel cultivados (Can et al., 1998; Imperato-McGinley et al., 1985, 1987). En el recién nacido, las características de un DSD 46,XY debido a la deficiencia de 5 α -reductasa 2 se pueden confundir con las de otros DSD como el síndrome de insensibilidad a los andrógenos (parcial) o defectos asociados a la biosíntesis de T (Wilson et al., 1993).

Bajo condiciones normales, los adolescentes y adultos jóvenes masculinos, presentan niveles normales de T en suero (300-1000 ng/dL), niveles bajos de DHT y niveles normales o elevados en la relación T-DHT en evaluaciones hormonales basales. La medición de DHT suele ser complicada, ya que la cantidad de T en suero es 10 veces más alta que la de DHT (Mendonca et al., 2016), así que para obtener una medición precisa se deben utilizar pruebas inmunológicas específicas, como estuches de radioinmunoensayos (Costa et al., 2012).

Otra manera de diagnosticar la deficiencia de 5 α -reductasa es midiendo los esteroides urinarios por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para determinar la relación entre esteroides 5 α y 5 β -reducidos en

orina (Wilson et al., 1993). Niveles extremadamente bajos de la relación de estos metabolitos esteroides en orina es patognomónico para la deficiencia de 5 α -reductasa 2 (Chan et al., 2013). Esta determinación es especialmente útil cuando los testículos fueron previamente removidos, al igual que la determinación de T y DHT en plasma después de la administración intravenosa de esteroides de T (Wilson et al., 1993). De cualquier forma, el diagnóstico definitivo requiere la confirmación por secuenciación de DNA para identificar la mutación en el gen de la 5 α -reductasa 2 y con ello facilitar la decisión al momento de asignar el sexo.

ANTECEDENTES

La enzima 5 α -reductasa tipo 2, codificada por el gen *SRD5A2*, es fundamental para la transformación de T a DHT durante la embriogénesis humana. Estudios de genética molecular revelan que alteraciones en este gen resultan en deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2, enfermedad en la cual individuos 46,XY presentan genitales ambiguos al nacimiento (Wilson et al., 1993).

A través de los 5 exones que conforman el gen *SRD5A2* se han identificado cuatro polimorfismos y más de 100 mutaciones, pero se conocen las consecuencias bioquímicas de muy pocas de ellas. Asimismo, observaciones recientes sugieren que no todas las alteraciones génicas en *SRD5A2* abaten la actividad catalítica de la enzima. En apoyo a este planteamiento, se analizaron mutaciones (p.R145W, p.P212R, p.F229S) y variantes polimórficas (p.A49T y p.V89L) previamente identificadas en pacientes diagnosticados clínicamente con deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2, en las cuales se desconoce (exceptuando el codón 212) su actividad enzimática.

El polimorfismo más estudiado del gen *SRD5A2* es V89L, el cual, por sí solo, no juegan ningún rol en la deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 (Vilchis et al., 1997). Por el contrario, la variante polimórfica A49T presenta una V_{max} más alta que la enzima de tipo silvestre (Makridakis et al., 1999; Ross et al., 1998), por lo que incrementa la actividad de la enzima 5 α -reductasa 2. Estudios previos demuestran que la

mutante p.P212R abate totalmente la actividad catalítica (Vilchis et al., 2000), razón por la cual se consideró, en este estudio, como control negativo.

La estructura génica y la distribución de cada variante analizada en este estudio son representadas esquemáticamente en la figura 6. La imagen muestra la localización cromosómica, la estructura génica y las mutaciones evaluadas. Las variantes de *SRD5A2* que están relacionadas con la deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 fueron localizadas en el exón 1, 2 y 4, principalmente.

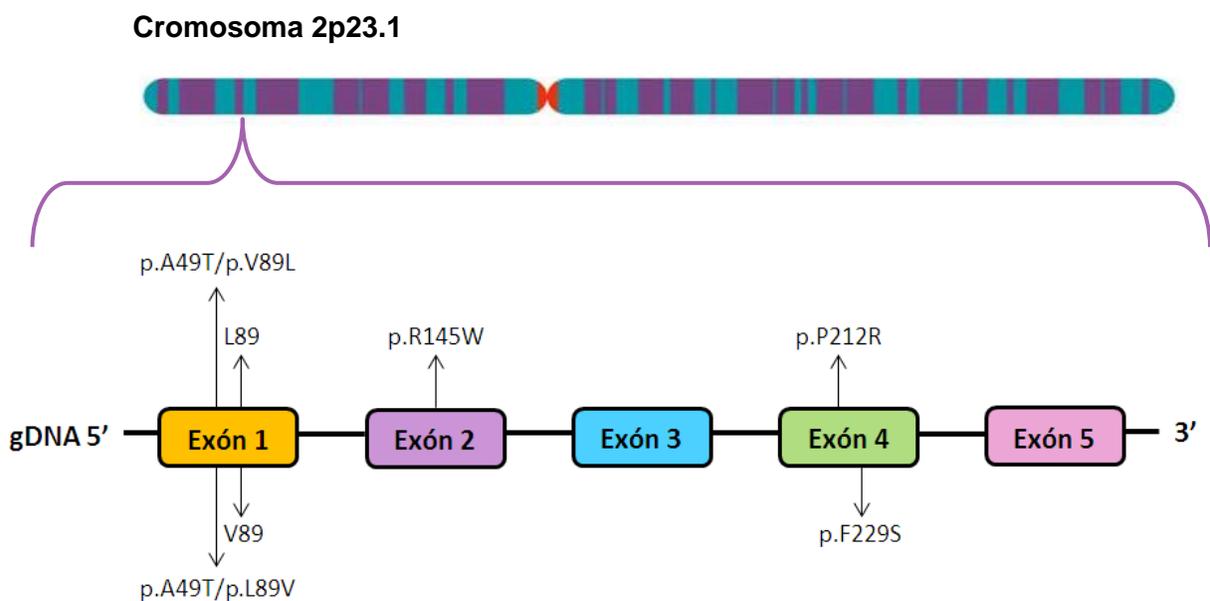


Fig. 6. Diagrama esquemático de las variantes génicas de *SRD5A2* descritas en este estudio.

HIPÓTESIS

“Cambios puntuales en regiones específicas del gen *SRD5A2* que codifica para la enzima 5 α -reductasa humana tipo 2 pueden generar alteraciones en su capacidad catalítica, dando origen a variantes con pérdida o ganancia de función”.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto que causan las variantes génicas de *SRD5A2* sobre la actividad enzimática de la 5 α -reductasa tipo 2.

Particulares

- ✓ Expresar cada una de las alteraciones génicas seleccionadas (p.R145W, p.P212R y p.F229S) y las dobles variantes (p.A49T/p.L89V y p.A49T/p.V89L) del cDNA de *SRD5A2* en células HEK-293 para cuantificar su actividad enzimática usando Testosterona-[³H] como sustrato.
- ✓ Determinar el efecto que tienen las variantes génicas de *SRD5A2* sobre la capacidad activante o inactivante de la enzima, analizando la actividad a una concentración 4 μ M de T en ensayos enzimáticos funcionales *in vitro*.
- ✓ Conocer la estructura funcional de la 5 α -reductasa humana tipo 2 implementando el uso de programas bioinformáticos para simular los cambios estructurales producidos por mutaciones específicas en replicas virtuales de la proteína.

METODOLOGÍA

Preparación de células para transfección

Para este procedimiento se utilizó como modelo de estudio la línea celular HEK-293 (células embrionarias de riñón humano). Las células fueron descongeladas y colocadas en un tubo Falcon de 15 mL con 4 mL de medio DMEM completo [(Dulbecco's Modified Eagle Medium), SFT (Suero Fetal Bovino) al 10% y como antibióticos Penicilina-Estreptomicina al 1%]; lo anterior fue centrifugado por 5 min a 1000 xg. El precipitado celular fue resuspendido en 1 mL de medio DMEM completo y colocado en una caja de cultivo celular de 25 mL. Las células se observaron al microscopio para verificar su viabilidad y ser almacenadas a 37°C y 5% de CO₂ hasta obtener un 80% de confluencia.

Una vez que se verificó la adherencia de las células a la caja de cultivo celular, se prosiguió a subcultivarlas; para ello se decantó el medio que contenían y se añadieron 4 mL de PBS (solución amortiguadora de fosfato salino, Sigma-Aldrich), se mezcló y decantó suavemente éste último y se agregó 1 mL de tripsina para desprender las células (por un periodo máximo de 2 min) y finalmente se colocó medio DMEM completo (5 mL).

Las células fueron transferidas a una caja de cultivo de 75 mL (que previamente contenía 10 mL de medio DMEM completo) e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ hasta lograr una confluencia del 80%. Para preparar las células para la transfección se retiró el medio que contenían, se lavaron con 3 mL de PBS y se

despegaron con 2 mL de tripsina; esta última fue inactivada con 6 mL de medio DMEM-SFT sin antibióticos. Las células se contabilizaron en una cámara Neubauer con el fin de tener 600,000 células por pozo. Finalmente, fueron adicionados 2 mL de medio DMEM-SFT a cada pozo.

Transfección

El plásmido *pCMV6-XL4* (fig. 7) de OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA) que contenía el cDNA que codifica para *SRD5A2*, fue transfectado en células HEK-293 y usado como cadena templado para la construcción de las variantes descritas en la tabla 3. El cDNA de las dobles mutantes fue expresado en un mismo plásmido. La secuencia nucleotídica de los constructos finales fueron confirmadas por secuenciación.

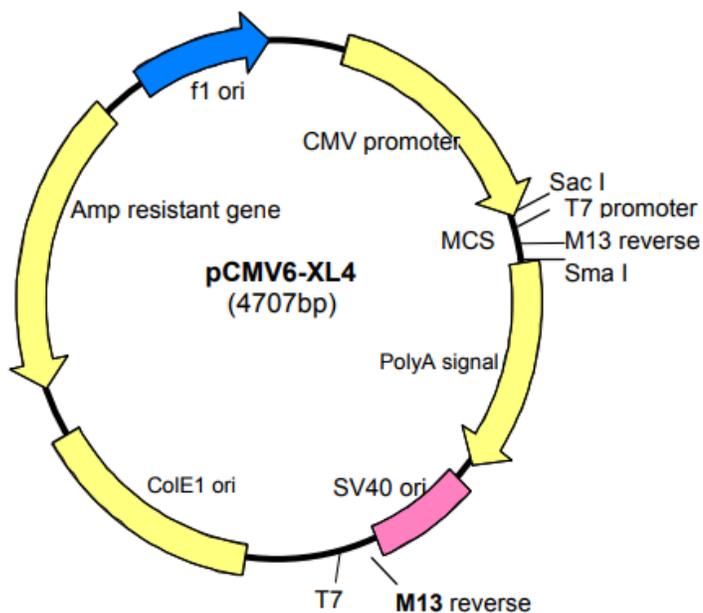


Fig. 7. Representación esquemática del plásmido utilizado en la transfección. Se muestran los sitios que son importantes para que éste funcione adecuadamente. CMV= promotor de citomegalovirus, Amp= gen de resistencia a ampicilina, PolyA signal= señal de poliadenilación, f1 ori= origen de replicación, SV40 ori= origen de replicación, MCS= sitio de clonación múltiple.

La transfección transitoria fue llevada a cabo 24 h después de cultivar las células utilizando el reactivo FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche®) y de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para el análisis de cada variante y del wild-type, se agregó 1 μ g de cDNA (1 μ g/ μ L), 100 μ L de DMEM (sin antibióticos ni SFT) y 6 μ L de FuGENE®. Lo anterior se homogeneizó e incubó a temperatura ambiente durante 15 min para después adicionar 107 μ L de esta mezcla FuGENE-DNA a cada pozo, homogeneizando e incubando a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h. La concentración y pureza del cDNA transfectado fue determinado espectrofotométricamente (260/280 nm). Para confirmar que la transfección se realizó exitosamente, se llevaron a cabo experimentos simultáneos utilizando células HEK-293 sin plásmido, células con cDNA silvestre y células con las variantes génicas seleccionadas.

Tabla 3. Variantes génicas de SRD5A2 analizadas.

Localización	Cambio de base	Variante
-	-	S/P
Exón 1	265C	L89
Exón 1	265G	V89
Exón 1	c.145G>A/ c.265C>G	p.A49T/p.L89V
Exón 1	c.145G>A/ c.265G>C	p.A49T/p.V89L
Exón 2	c.433C>T	p.R145W
Exón 4	c.635C>G	p.P212R
Exón 4	c.686T>C	p.F229S

Actividad de 5 α -reductasa 2 en células HEK-293 transfectadas

En tubos cónicos de 12 x 75 mm se añadió testosterona (4 μ M) y testosterona marcada radiactivamente (T-[3 H]) (70 Ci/mmol equivalente a 400,000 dpm) dejándose reposar durante 24 h para evaporar el etanol en el que estaba inmersa la T (por triplicado). Terminando la incubación se retiró el medio contenido en cada pozo, se añadió 1 mL de PBS y cuidadosamente, las células se despegaron y colocaron en un tubo Falcon de 15 mL (lo anterior se repitió para asegurar que todas las células fueran recolectadas). Los tubos fueron centrifugados a 1000 xg por 5 min. El precipitado celular fue resuspendido con 1 mL de PBS y puesto en hielo para más tarde lisar las células con ayuda de un sonicador Ultrasonic Processor a 36% de amplitud, durante 5 s (por triplicado). En el tubo de ensayo que contenía T-[3 H] y T (4 μ M) fueron colocados 100 μ L de solución TC (TRIS-Citrato, pH=8.0), 0.5 mM de NADPH (cofactor) y 90 μ L del lisado celular. La mezcla anterior se incubó a 37°C durante 15 min. Los ensayos se hicieron por triplicado. También se determinaron proteínas totales, tal como se describe más adelante.

Extracción del esteroide

Transcurrida la incubación de 15 min, a cada tubo se le agregó 1 mL de acetato de etilo saturado y se mezcló en vortex durante 1 min, para después centrifugar a 1000 xg por 5 minutos. De cada tubo se tomó 1 mL de la fase orgánica y se colocó en un tubo cónico (se repitió el procedimiento con cada uno de los tubos por triplicado). Se evaporó el acetato de etilo y se resuspendió el esteroide con 500 μ L

de metanol. Posteriormente se colocaron 10 μ L en un vial que contenía 5 mL de líquido de centelleo. Esta mezcla se homogeneizó en el vortex y se introdujo en un contador de líquido de centelleo (PACKARD). Al obtenerse las lecturas, se hicieron los cálculos necesarios para obtener 100,000 dpm de las 400,000 iniciales. Con el fin de identificar al sustrato y al producto, se añadió 2 μ g/mL de los estándares internos 3 α y 3 β -Androstendiol, T, DHT, Δ^4 -Androstendiona y 5 α -Androstendiona a una serie de tubos, seguido de 100,000 dpm de T-[3 H]. Cuando se evaporó totalmente el etanol se agregaron 6 gotas de metanol-cloroformo (1:1) y con ayuda de un capilar el contenido se transfirió a una placa cromatográfica.

Cromatografía en capa fina

Para confirmar la presencia de DHT se realizó una cromatografía en capa fina (fase normal), empleando cromatofolios de gel de sílice (Merck KGaA) como fase estacionaria. Se utilizaron dos cámaras de elución con las fases móviles siguientes: el sistema A contenía 5 mL de metanol y 196 mL de cloroformo; el sistema B contenía 20 mL de éter etílico y 180 mL de cloroformo. Se introdujeron los cromatofolios en el sistema A y se retiraron hasta que el eluyente los cubriera completamente dejándolos secar para repetir el procedimiento, pero ahora utilizando la cámara B.

Se roció suficiente cantidad de solución reveladora (0.5 ml de p-anisaldehído, 50 mL de ácido acético y 1 mL de ácido sulfúrico) en las cromatoplasmas y fueron ligeramente calentadas, revelando una pequeña mancha de color, correspondiente

a cada uno de los andrógenos colocados inicialmente. Cada una de estas marcas fue recortada del cromatograma y colocada en viales perfectamente etiquetados. A cada vial se le agregó 1 mL de etanol y se mezcló; en seguida se agregaron 5 mL de líquido de centelleo y se mezcló de nuevamente, para más tarde analizarse en un contador de líquido de centelleo. Al obtener las dpm totales, se realizaron los cálculos correspondientes para conocer el contenido de DHT obtenido en cada uno de los viales.

Cuantificación de proteínas

Para determinar los niveles de proteína total, se disolvieron 100 mg de azul de Comassie en 50 mL de etanol al 95%. A esto se le adicionaron 100 mL de ácido fosfórico al 85% y se aforó a 1000 mL con H₂O bidestilada-desionizada.

Para la preparación de la curva patrón se realizó una solución Stock, disolviendo 10 mg de BSA (Albúmina de Suero Bovino) en 10 mL de SSI (Solución Salina Isotónica). Soluciones de 5 diferentes concentraciones fueron un punto en la curva patrón: 0 μ g, 25 μ g, 50 μ g, 75 μ g y 100 μ g. Se adicionaron 5 mL del reactivo de Comassie a cada tubo que contenía las proteínas, se mezcló en vortex y se dejó reposar durante 2 min para más tarde leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm ($\lambda = 595$ nm).

RESULTADOS

La determinación de la actividad de 5 α -reductasa tipo 2 en células HEK-293 transfectadas con el cDNA de tipo silvestre (wild type) y con el de las mutantes construidas, inició con la separación de los esteroides formados mediante cromatografía en capa fina. Después de ser eluida por ambas fases (A y B), la cromatoplaque fue revelada con el reactivo p-anisaldehído sulfúrico, previamente mencionado y calentada hasta observar la aparición de la coloración azul-violeta. Los resultados mostraron el aislamiento de la DHT formada a partir de T-[³H] (fig. 8). La identificación de DHT se realizó mediante la comparación con una mezcla de andrógenos (estándares internos).

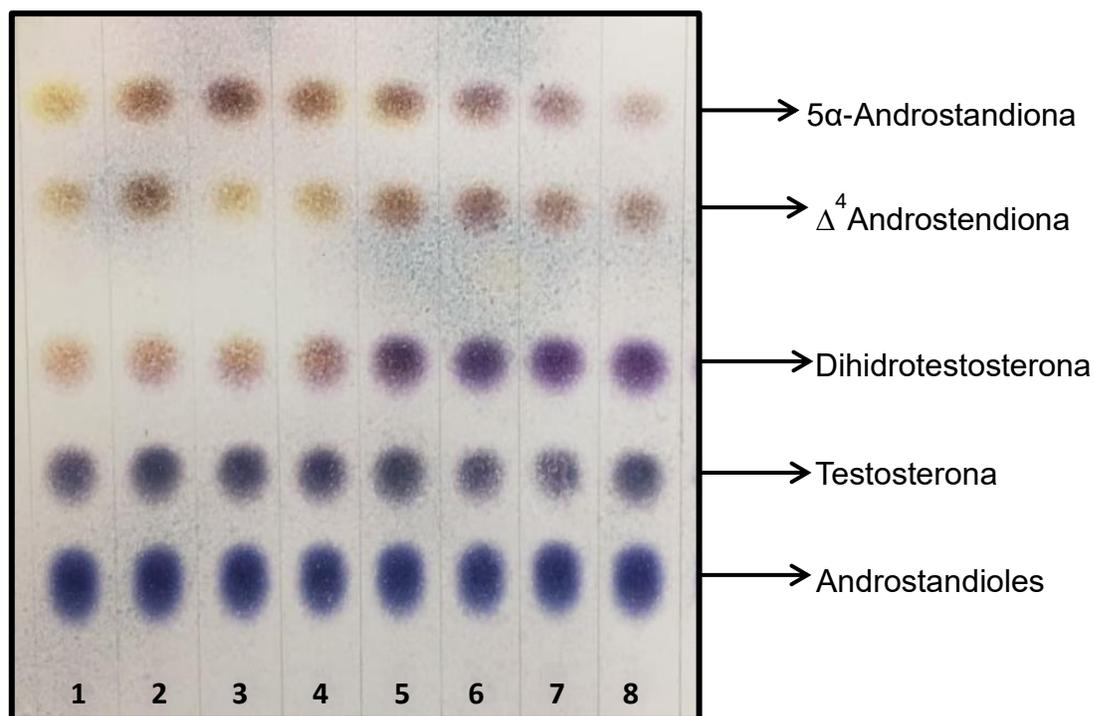


Fig. 8. Cromatografía en capa fina de la extracción de esteroides. Al ser una prueba cualitativa, las manchas coloridas indican la presencia de cada uno de los esteroides aislados. Los números indican los controles y mutantes para la 5 α -reductasa 2. 1= S/P (sin plásmido), 2= L89, 3= V89, 4= p.A49T/p.L89V, 5= p.A49T/p.V89L, 6= p.R145W, 7= p.P212R, 8= p.F229S. n=3.

Con la finalidad de conocer las consecuencias bioquímicas de las mutaciones erróneas (p.R145W y p.F229S), mutaciones heterocigotas compuestas (p.A49T/p.L89V y p.A49T/p.V89L) y otras previamente descritas (p.P212R), identificadas a partir de pacientes con deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2, se llevó a cabo un análisis *in vitro* transfectando, en cultivos celulares eucariontes, los vectores de expresión que contenían el cDNA silvestre y el cDNA mutado con cada una de las sustituciones correspondientes y se determinó cuantitativamente la conversión de T-[³H] a DHT-[³H]. Para ello se analizó un control interno, que consistía en células ausentes de plásmido (S/P); seguido de un control negativo (p.P212R), elegido porque ya está caracterizado (Vilchis et al., 2010) que una arginina localizada en la posición 212 en lugar de una prolina afecta considerablemente la actividad enzimática. El control positivo en este experimento fue L89 (WT). Los resultados obtenidos se muestran en función de la cantidad de DHT formada (pmol DHT) por hora (h⁻¹) por miligramo de proteína (mg P⁻¹) (fig. 9).

Se ha reportado en la población mexicana la existencia de un polimorfismo en el codón 89 del gen de la 5 α -reductasa 2 (Vilchis et al., 1997), en el cual se presenta una leucina en lugar de una valina; sin embargo, este cambio de aminoácido no tiene repercusiones en el desarrollo fenotípico masculino. En los resultados obtenidos, L89 presenta un 30% más de actividad comparada con V89, lo que conlleva a una menor producción de DHT. Al analizar la actividad enzimática de estas variantes polimórficas en conjunto con A49T, se observa que la doble variante p.A49T/p.L89V incrementa la producción de DHT al doble, con respecto al wild-type (L89) y un incremento casi triplicado comparado con V89. Por el

contrario, la doble variante p.A49T/p.V89L abate la actividad enzimática casi en su totalidad (fig. 9).

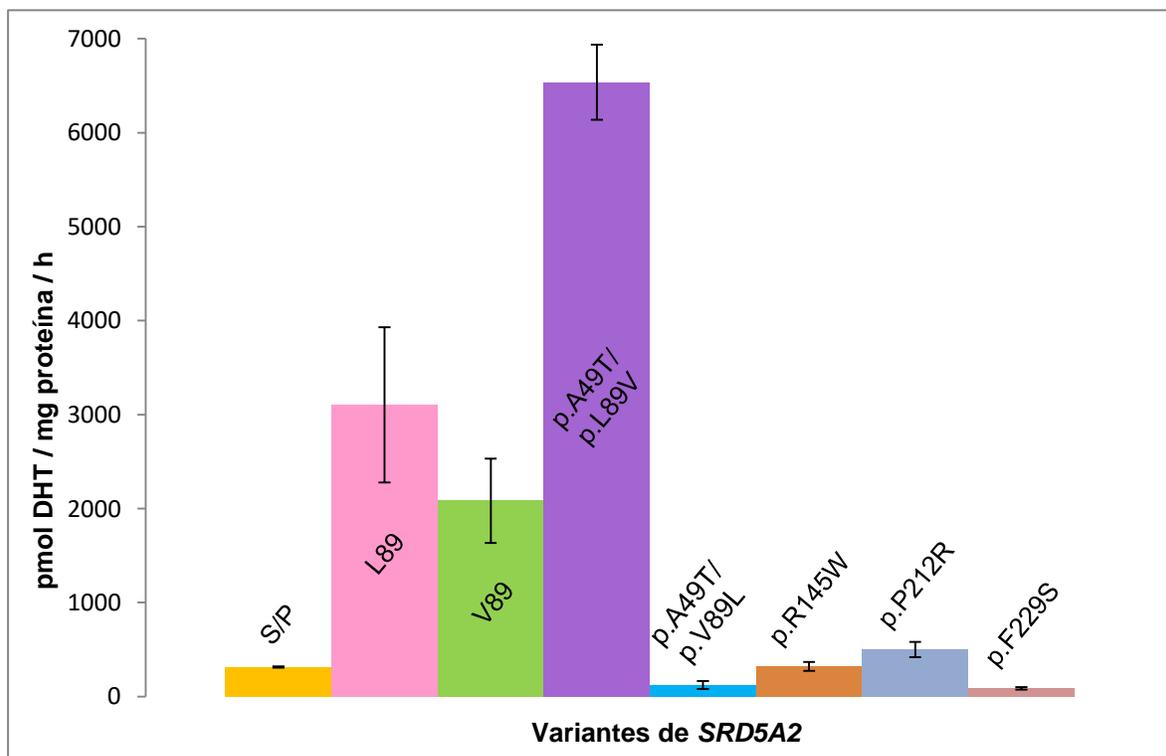


Fig. 9. Actividad *in vitro* de las variantes génicas de *SRD5A2* evaluadas. Para los experimentos se utilizaron células HEK-293 transfectadas con el cDNA silvestre y el mutado; las células fueron incubadas a 37°C durante 15 min, pH= 5.5 y en presencia de 500 μ M de NADPH (cofactor). n= 3.

La mutación p.R145W situada en el exón 2 es originada por una transición C \rightarrow T, en la posición 433, provocando que la secuencia codifique para el aminoácido triptófano en lugar de arginina (Arg \rightarrow Trp). Del mismo modo, en el exón 4 se localizan dos mutantes, la primera es una transversión C \rightarrow G en el codón 212. Esta mutación puntual es responsable de la sustitución del aminoácido prolina por arginina (Pro \rightarrow Arg). La segunda mutante presenta un cambio de base (T \rightarrow C) en

la posición 686, lo que conduce a la sustitución de fenilalanina por serina (Phe→Ser) en el codón 229.

Los experimentos de actividad de 5 α -reductasa tipo 2 realizados *in vitro* muestran que las últimas tres mutaciones disminuyen la conversión de T-[³H] a DHT hasta un 10%, 16% y 3%, respectivamente, comparándolo con el WT (fig. 9); confirmando así que p.R145W, p.P212R y p.F229S afectan severamente la habilidad de la enzima para sintetizar DHT.

Adicional a lo anterior, el efecto patogénico de las mutaciones fue examinado mediante tres diferentes programas bioinformáticos de predicción de mutaciones: PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submitt2.html) y PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer, <http://provean.jcvi.org/index.php>). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Cuadro comparativo de las tres bases de datos utilizadas en el análisis *in silico* de las mutaciones en SRD5A2. Las dobles sustituciones fueron analizadas por separado.

Variantes	PolyPhen-2	SIFT	PROVEAN
p.A49T	Probablemente dañina	Función proteica afectada	Perjudicial
p.L89V	Benigna	Tolerada	Neutral
p.R145W	Probablemente dañina	Función proteica afectada	Perjudicial
p.P212R	Probablemente dañina	Función proteica afectada	Perjudicial
p.F229S	Posiblemente dañina	Tolerada	Neutral

DISCUSIÓN

La enzima 5 α -reductasa tipo 2 desempeña un papel fundamental durante el desarrollo embrionario, ya que esta isoenzima es clave para la transformación de T a DHT e inducir un programa de diferenciación sexual que conlleva al desarrollo de los genitales externos masculinos y la próstata. Además, la expresión del gen *SRD5A2*, parece estar asociada con la etiología de varias alteraciones endócrinas tales como hiperplasia benigna prostática, alopecia androgénica, acné, hirsutismo femenino y muy posiblemente cáncer de próstata (Giwerzman et al., 2005). Los estudios de genética molecular han demostrado que la formación insuficiente de DHT causada por alteraciones en el gen *SRD5A2*, resultan en deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2, una forma específica de DSD 46,XY. Los afectados son individuos 46,XY quienes al nacimiento presentan genitales ambiguos, caracterizados comúnmente por presentar internamente estructuras reproductivas masculinas, pero estructuras femeninas al exterior. Por el aspecto fenotípico femenino que presentan estos pacientes, se les asigna un rol social femenino (Wilson et al., 1993).

Actualmente, más de 100 mutaciones han sido identificadas a través de los 5 exones que constituyen el gen *SRD5A2*, de las cuales el 60% son mutaciones con sentido erróneo (Boudon et al., 1995; Can et al., 1998; Canto et al., 1997; Vilchis et al., 1997; Wigley et al., 1994; Wilson et al., 1993). Estas alteraciones, al igual que las mutaciones sin sentido, dan como resultado una proteína no funcional o semifuncional que provoca defectos, a diferentes grados, en la virilización de

individuos con un cariotipo 46,XY normal (Wigley et al., 1994). De igual manera, mutaciones idénticas dentro del mismo grupo étnico han sido reportadas, sugiriendo que la existencia de éstas procede de un ancestro común y que un efecto fundador génico es responsable del esparcimiento de anomalías genéticas (Vilchis et al., 2000).

De las 100 mutaciones encontradas se conocen las consecuencias bioquímicas de al menos 22 de ellas (Wigley et al., 1994). Observaciones recientes sugieren que no todas las alteraciones génicas en *SRD5A2*, asociadas a la deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2, abaten la actividad catalítica de la enzima. Mutaciones en solo una base como p.S31F, p.I161L o p.G183S, al ser expresadas en células HEK-293, exhiben una K_m y una V_{max} más alta que el tipo silvestre (Vilchis et al., 2008), lo cual ha sugerido que existen variantes con fenotipo dominante que resultan en mutaciones activantes o con ganancia de función. Como consecuencia, las mutaciones erróneas han sido clasificadas de la siguiente manera: 1) aquellas que incrementan la actividad enzimática, 2) aquellas que muestran casi la misma actividad del WT y 3) aquellas donde la actividad enzimática es escasa o bien, no se puede detectar (Makridakis et al., 2004; Wigley et al., 1994). Sin embargo, la mayoría de las variantes génicas de *SRD5A2* son mutaciones que tienen un efecto de pérdida de función (Fernández-Cancio et al., 2011; Maimoun et al., 2011; Vilchis et al., 2010).

Por otra parte, cuatro polimorfismos han sido identificados en el gen *SRD5A2*. El primero involucra muchas repeticiones del dinucleótido AT ubicado en la región 3'

UTR del gen (Davis & Russel, 1993). El segundo y tercero están presentes en el codón 49 y 89 del exón 1 (A49T y V89L, respectivamente) (Giwerzman et al., 2005; Vilchis et al., 1997) y el último implica la variación C/T dentro de los primeros nucleótidos del intrón 1 (Russell & Wilson, 1994; Vilchis et al., 1997).

El polimorfismo más estudiado del gen *SRD5A2* (rs523349; V89L) es causado por una transversión de G por C. Diversos estudios muestran que la versión que contiene leucina es 30% menos eficiente que la variante que contiene valina, disminuyendo los niveles de DHT (Adamovic et al., 2013; Thai et al., 2005). Sin embargo, ninguno de estos estudios fue realizado en pacientes mexicanos, por lo que pueden tener discrepancias al evaluar a esta población. Independientemente de lo anterior, esta variación no altera el desarrollo de los genitales externos, por lo que no juegan ningún rol en la deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 (Vilchis et al., 1997). La sustitución alanina por treonina en el codón 49 (A49T) representa otro polimorfismo encontrado en el gen, el cual tiene un mayor impacto en la actividad de la enzima 5 α -reductasa, al tener una V_{max} más alta que la enzima de tipo silvestre, incrementando así 5 veces la producción de DHT (Makridakis et al., 1999; Ross et al., 1998). Por la elevada actividad que muestra la enzima 5 α -reductasa cuando presenta el polimorfismo A49T, éste ha sido asociado con cáncer de próstata (Giwerzman et al., 2005).

La mutante p.P212R ha sido encontrada en 19 alelos de 27 pacientes con deficiencia de 5 α -reductasa 2 de diversas locaciones geográficas en México (Canto et al., 1997; Chávez et al., 2000; Vilchis et al., 2008, 2010). Esta

recurrencia ha sido caracterizada como un sitio de alta incidencia mutacional y con nula actividad enzimática (Vilchis et al., 2000). Por lo tanto, en este estudio fue considerada como un control negativo, al ser una mutación previamente caracterizada y estar presente en la población mexicana. A pesar que no se tiene una correlación genotipo-fenotipo, homocigotos con la mutación p.P212R siempre han presentado hipospadias perineoescrotales, micropene y criptorquidia. Por el contrario, pacientes heterocigotos o heterocigotos compuestos para esta mutación, muestran un vasto espectro fenotípico (Russell & Wilson, 1994; Wang et al., 2004; Wilson et al., 1993). Estas observaciones en conjunto proveen evidencia de que el exón 4 de *SRD5A2* puede ser un sitio propenso para la presencia de mutaciones inactivantes en éste gen (Vilchis et al., 2008).

En este estudio, se caracterizó una alteración activante en el gen *SRD5A2*. La doble variante p.A49T/p.L89V exhibe una ganancia de función, sugiriendo que el efecto activante de p.A49T se hace presente sin interferir con la acción de p.L89V, ya que esta combinación de alelos confiere nuevas propiedades a la enzima, lo cual podría tener como consecuencia un aumento en la expresión del gen. Previamente se describió que una treonina, ubicada en la posición 49, incrementa la actividad enzimática; sin embargo, al evaluar esta mutación en conjunto con p.V89L se observa una pérdida de función. Por si sola, cada variante provoca un cambio en la enzima, no obstante, la combinación de dobles mutantes puede conducir a que se supriman mutuamente; ya sea que p.A49T sea suprimida porque p.V89L contrarresta el efecto original, o bien, que p.V89L reprima el efecto de p.A49T, pero no restaure el original: la producción adecuada de DHT. Se ha

reportado que en pacientes que presentan hipospadias, el alelo más frecuente es leucina (Thai et al., 2005; Maimoun et al., 2010), por lo que se puede suponer que L89 en conjunto con T49 pueden cambiar la estructura de la enzima de tal forma que pierda totalmente su actividad. Los resultados obtenidos sugirieron que p.A49T/p.L89V puede generar el fenotipo característico de la enfermedad, mientras que p.A49T/p.V89L podría estar asociada a otras alteraciones endócrinas o inclusive a cáncer de próstata. Posiblemente, en la variante con ganancia de función, una desregulación en la síntesis de DHT durante el período fetal podría generar defectos en la masculinización de los individuos con DSD 46,XY.

Debido a que se desconoce la estructura tridimensional de la enzima, es difícil predecir los posibles dominios funcionales dentro de varias regiones de la proteína. Análisis de expresión previos de tres mutaciones (p.G34R, p.196S y p.R246W) han indicado que el N-terminal del polipéptido podría estar implicado en la unión con el sustrato mientras que el C-terminal, particularmente la región entre los codones 196 y 246, probablemente esté involucrada en la unión al cofactor (Russell et al., 1994).

Los análisis funcionales *in vitro* obtenidos en este estudio revelan que las mutaciones p.R145W y p.F229S decrementan la actividad de la 5 α -reductasa 2 hasta un 10% y 3%, respectivamente, comparando con el WT. La presencia de triptófano (aminoácido aromático) en lugar de arginina (aminoácido polar) en la posición 145 o el cambio de fenilalanina (aminoácido aromático) por serina (aminoácido polar) puede provocar un cambio en el plegamiento de la proteína,

resultando en una proteína inestable, o bien, la modificación de estos residuos puede conducir a un cambio conformacional, impidiendo la unión del sustrato o del cofactor, lo que finalmente conlleva a una disminución de la actividad enzimática. Aunado a lo anterior, en las posiciones 145 y 229 se encuentran codones altamente conservados (Wilson et al., 1993) y al estar en sitios críticos en cuanto a homología, pueden modificar el dominio funcional de la enzima, limitando la unión del cofactor y en consecuencia cambiar el pH óptimo de la reacción enzimática. Además, hay evidencia de que casi todas las mutaciones ubicadas entre los codones 197 y 230 del exón 4 hacen que la enzima sea totalmente inactiva (Vilchis et al., 2008; Wilson et al., 1993).

De las mutaciones inactivantes analizadas en programas bioinformáticos para predecir patogenicidad, los cambios p.R145W y p.P212R fueron mutaciones que perjudican gravemente a la enzima. Para p.F229S, PolyPhen-2 predice que puede ser nociva pero SIFT y PROVEAN pronostican poco daño para la misma mutación. Sin embargo, los ensayos de actividad enzimática, realizados en células HEK-293, muestran características cinéticas anormales para las tres mutaciones, lo cual concuerda con la atípica actividad enzimática.

Los análisis *in silico* realizados mediante programas bioinformáticos brindan información de la naturaleza de las variantes génicas y ayudan a priorizar las mutaciones nuevas, para su caracterización funcional *in vitro*, ya que proveen información adicional para sustentar la evidencia de efectos funcionales, con el fin de predecir la gravedad de un cambio de aminoácido bajo condiciones

establecidas. A pesar de ello, estos programas de predicción de mutaciones no son específicos para un gen, por esta razón, utilizarlos para todos los genes puede ser inapropiado. Únicamente verificando el desempeño de estos programas en genes individuales o en un grupo de genes en específico, podrían considerarse como un método de evaluación complementario antes de recurrir a las pruebas genéticas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos programas no reemplazan los análisis funcionales *in vitro*, por lo que el personal clínico y los pacientes deben estar informados sobre las limitaciones de las pruebas genéticas, particularmente cuando una mutación nueva es encontrada.

CONCLUSIONES

Las mutaciones previamente determinadas p.R145W y p.F229S en el gen *SRD5A2* abaten la actividad de la 5 α -reductasa 2, provocando así desordenes en el desarrollo sexual debido a la deficiencia de 5 α -reductasa 2.

La presencia de la doble variante p.A49T/p.L89V con lleva a un aumento importante en la actividad de la enzima, provocando una ganancia de función.

Las mutaciones reportadas en este trabajo sugieren la importancia de una actividad catalítica óptima por parte de la 5 α -reductasa 2 para sintetizar de manera adecuada DHT durante la diferenciación sexual embriogénica y en la pubertad, así como su asociación a patologías endocrinas como hiperplasia benigna prostática. Aunque existen reportes de múltiples mutaciones identificadas en el gen *SRD5A2*, aún no se ha logrado establecer una correlación fenotipo-genotipo y los estudios han proporcionado poca información sobre el sitio activo de la isoenzima tipo 2.

PERSPECTIVAS

Los estudios experimentales a futuro sugieren la posibilidad de estudiar las constantes cinéticas de Michaelis-Menten, K_m y V_{max} , realizando curvas de saturación de las enzimas de diferentes mutantes y demostrar la presencia de dominios funcionales de unión a T, NADPH o sitios activos de la enzima.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamovic, T., Thai, H. T. T., Liedén, A., & Nordenskjöld, A. (2013). Association of a tagging single nucleotide polymorphism in the androgen receptor gene region with susceptibility to severe hypospadias in a Caucasian population. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 7(4), 173–179. <https://doi.org/10.1159/000348882>
- Andersson, S., Berman, D. M., Jenkins, E. P., & Russell, D. W. (1991). Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*, 354(6349), 159–161. <https://doi.org/10.1038/354159a0>
- Andersson, S., & Russell, D. W. (1990). Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 87(10), 3640–3644. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.10.3640>
- Auchus, R. J., & Miller, W. L. (1999). Molecular modeling of human P450c17 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase): Insights into reaction mechanisms and effects of mutations. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(7), 1169–1182. <https://doi.org/10.1210/mend.13.7.0326>
- Audet-Walsh, É., Yee, T., Tam, I. S., & Giguère, V. (2017). Inverse regulation of DHT synthesis enzymes 5 α -reductase types 1 and 2 by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocrinology*, 158(4), 1015–1021. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1926>
- Baarends, W. M., van Helmond, M. J., Post, M., van der Schoot, P. J. C. M., Hoogerbrugge, J. W., de Winter, J. P., ... Meijers, J. H. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development (Cambridge, England)*, 120(1), 189–197.
- Bahceci, M., Ersay, A. R., Tuzcu, A., Hiort, O., Richter-Unruh, A., & Gokalp, D. (2005). A novel missense mutation of 5 α -reductase type 2 gene (*SRD5A2*) leads to severe male pseudohermaphroditism in a Turkish family. *Urology*, 66(2), 407–410. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2005.02.021>
- Behringer, R. R. (1994). The *in vivo* roles of müllerian-inhibiting substance. *Current*

Topics in Developmental Biology, 29, 171–187.

Biason-Lauber, A., & Chaboissier, M. C. (2015). Ovarian development and disease: The known and the unexpected. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 45, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.021>

Björkhem, I. (1969). Mechanism and Stereochemistry of the Enzymatic Conversion of a Δ 4-3-Oxosteroid into a 3-Oxo-5 α -Steroid. *European Journal of Biochemistry*, 8(3), 345–351.

Björkhem, I., & Holmberg, I. (1973). Mechanism of enzymatic reduction of steroid double bonds. *European Journal of Biochemistry*, 33(2), 364–367.

Boudon, C., Lobaccaro, J. M., Lumbroso, S., Ogur, G., Ocal, G., Belon, C., & Sultan, C. (1995). A new deletion of the 5 α -reductase type 2 gene in a Turkish family with 5 α -reductase deficiency. *Clinical Endocrinology*, 43(2), 183–188.

Can, S., Zhu, Y. S., Cai, L. Q., Ling, Q., Katz, M. D., Akgun, S., ... Imperato-Mcginley, J. (1998). The identification of 5 α -reductase-2 and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-3 gene defects in male pseudohermaphrodites from a Turkish kindred. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(2), 560–569. <https://doi.org/10.1210/jc.83.2.560>

Canto, P., Vilchis, F., Chávez, B., Mutchinick, O., Imperato-McGinley, J., Perez-Palacios, G., ... Mendez, J. P. (1997). Mutations of the 5 α -reductase type 2 gene in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5 α -reductase-2 deficiency. *Clinical Endocrinology*, 46(2), 155–160.

Capel, B. (1998). Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annual Review of Physiology*, 60, 497–523. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.497>

Carpenter, T. O., Imperato-Mcginley, J., Boulware, S. D., Weiss, R. M., Shackleton, C., Griffin, J. E., & Wilson, J. D. (1990). Variable expression of 5 α -reductase deficiency: presentation with male phenotype in a child of Greek origin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 71(2), 318–322. <https://doi.org/10.1210/jcem-71-2-318>

Chávez, B., Ramos, L., Gómez, R., & Vilchis, F. (2014). 46,XY disorder of sexual development resulting from a novel monoallelic mutation (p.Ser31Phe) in the

- steroid 5 α -reductase type-2 (*SRD5A2*) gene. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2(4), 292–296. <https://doi.org/10.1002/mgg3.76>
- Chávez, B., Valdez, E., & Vilchis, F. (2000). Uniparental disomy in steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(9), 3147–3150.
- Davis, D. L., & Russel, D. W. (1993). Unusual length polymorphism in human steroid 5 α -reductase type 2 gene (*SRD5A2*). *Human Molecular Genetics*, 2(6), 820.
- Deslypere, J. P., Young, M., Wilson, J. D., & McPhaul, M. J. (1992). Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 88(1–3), 15–22.
- Fernández-Cancio, M., Audí, L., Andaluz, P., Torán, N., Piró, C., Albisu, M., ... Carrascosa, A. (2011). *SRD5A2* gene mutations and polymorphisms in Spanish 46,XY patients with a disorder of sex differentiation. *International Journal of Andrology*, 34(6 Pt 2), e526-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01136.x>
- Giwerzman, Y. L., Abrahamsson, P. A., Giwerzman, A., Gadaleanu, V., & Ahlgren, G. (2005). The 5 α -reductase type II A49T and V89L high-activity allelic variants are more common in men with prostate cancer compared with the general population. *European Urology*, 48(4), 679–685. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.06.011>
- Gómez-Chang, E ; Larrea, F; Martínez-Montes, F. (2012). Vías De Señalización Asociadas a La Esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1), 24–36.
- Grino, P. B., Griffin, J. E., & Wilson, J. D. (1990). Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 126(2), 1165–1172. <https://doi.org/10.1210/endo-126-2-1165>
- Hackel, C., Oliveira, L. E. C., Ferraz, L. F. C., Tonini, M. M. O., Silva, D. N., Toralles, M. B., ... Guerra-Junior, G. (2005). New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5 α -reductase deficiency type 2. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 83(7), 569–576.

<https://doi.org/10.1007/s00109-005-0651-7>

- Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8), 779–804. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90307-5](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90307-5)
- Haqq, C. M., King, C. Y., Ukiyama, E., Falsafi, S., Haqq, T. N., Donahoe, P. K., & Weiss, M. A. (1994). Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science (New York, N. Y.)*, 266(5190), 1494–1500.
- Havelock, J. C., Rainey, W. E., & Carr, B. R. (2004). Ovarian granulosa cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 228(1–2), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.04.018>
- Hiort, O., Sinnecker, G. H., Willenbring, H., Lehners, A., Zollner, A., & Struve, D. (1996). Nonisotopic single strand conformation analysis of the 5 α -reductase type 2 gene for the diagnosis of 5 α -reductase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(9), 3415–3418. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.9.8784107>
- Hochberg, Z., Chayen, R., Reiss, N., Falik, Z., Makler, A., Munichor, M., ... Hiort, O. (1996). Clinical, biochemical, and genetic findings in a large pedigree of male and female patients with 5 α -reductase 2 deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(8), 2821–2827. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.8.8768837>
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.-J., & Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism*, 7, 47. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-47>
- Hughes, I. A. (2001). Minireview: sex differentiation. *Endocrinology*, 142(8), 3281–3287. <https://doi.org/10.1210/endo.142.8.8406>
- Hughes, I. A., Houk, C., Ahmed, S. F., & Lee, P. A. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *Journal of Pediatric Urology*, 2(3), 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2006.03.004>
- Imperato-Mcginley, J., Akgun, S., Ertel, N. H., Sayli, B., & Shackleton, C. (1987).

The coexistence of male pseudohermaphrodites with 17-ketosteroid reductase deficiency and 5 α -reductase deficiency within a Turkish kindred. *Clinical Endocrinology*, 27(1), 135–143.

Imperato-McGinley, J., Peterson, R. E., Gautier, T., Arthur, A., & Shackleton, C. (1985). Decreased urinary C19 and C21 steroid 5 α -metabolites in parents of male pseudohermaphrodites with 5 α -reductase deficiency: Detection of carriers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 60(3), 553–558. <https://doi.org/10.1210/jcem-60-3-553>

Imperato-Mcginley, J., & Zhu, Y. S. (2002). Androgens and male physiology the syndrome of 5 α -reductase-2 deficiency. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198(1–2), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00368-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00368-4)

Jenkins, E. P., Andersson, S., Imperato-Mcginley, J., Wilson, J. D., & Russell, D. W. (1992). Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 α -reductase. *Journal of Clinical Investigation*.

Jenkins, E. P., Hsieh, C. L., Milatovich, A., Normington, K., Berman, D. M., Francke, U., & Russell, D. W. (1991). Characterization and chromosomal mapping of a human steroid 5 α -reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue. *Genomics*, 11(4), 1102–1112.

Jenster, G., Trapman, J., & Brinkmann, A. O. (1993). Nuclear import of the human androgen receptor. *The Biochemical Journal*, 293 (Pt 3), 761–768.

Josso, N., Cate, R. L., Picard, J. Y., Vigier, B., di Clemente, N., Wilson, C., ... Boussin, L. (1993). Anti-müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Progress in Hormone Research*, 48, 1–59.

Jost, A. (1970). Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 259(828), 119–130.

Labrie, F., Sugimoto, Y., Luu-The, V., Simard, J., Lachance, Y., Bachvarov, D., ... Paquet, N. (1992). Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology*, 131(3), 1571–1573. <https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1505484>

Lee, M. M., & Donahoe, P. K. (1993). Mullerian inhibiting substance: A gonadal

- hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews*, 14(2), 152–164. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-152>
- Maimoun, L., Philibert, P., Cammas, B., Audran, F., Bouchard, P., Fenichel, P., ... Sultan, C. (2011). Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5 α -reductase deficiency: An extensive international experience of 55 patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(2), 296–307. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1024>
- Makridakis, N. M., Akalu, A., & Reichardt, J. K. V. (2004). Identification and characterization of somatic steroid 5 α -reductase (*SRD5A2*) mutations in human prostate cancer tissue. *Oncogene*, 23(44), 7399–7405. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207922>
- Makridakis, N. M., Ross, R. K., Pike, M. C., Crocitto, L. E., Kolonel, L. N., Pearce, C. L., ... Reichardt, J. K. (1999). Association of mis-sense substitution in *SRD5A2* gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet (London, England)*, 354(9183), 975–978. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)11282-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)11282-5)
- Mazen, I., Gad, Y. Z., Hafez, M., Sultan, C., & Lumbroso, S. (2003). Molecular analysis of 5 α -reductase type 2 gene in eight unrelated egyptian children with suspected 5 α -reductase deficiency: Prevalence of the G34R mutation. *Clinical Endocrinology*, 58(5), 627–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12699446>
- Miller, W. L. (1988). Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocrine Reviews*, 9(3), 295–318. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1210/edrv-9-3-295>
- Miller, W. L. (1998). Early steps in androgen biosynthesis: From cholesterol to DHEA. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12(1), 67–81.
- Mononen, N., Ikonen, T., Syrjakoski, K., Matikainen, M., Schleutker, J., Tammela, T. L., ... Kallioniemi, O. P. (2001). A missense substitution A49T in the steroid 5-alpha-reductase gene (*SRD5A2*) is not associated with prostate cancer in Finland. *Br J Cancer*, 84(0007–0920), 1344–1347. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1789>
- Moore, L. K., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2013). *Embriología Clínica*. (Elsevier, Ed.). España.

- Nordenskjöld, A., & Ivarsson, S. A. (1998). Molecular characterization of 5 α -reductase type 2 deficiency and fertility in a Swedish family. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(9), 3236–3238. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.9.5125>
- Normington, K., & Russell, D. W. (1992). Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 α -reductase isozymes: Evidence for distinct physiological functions. *Journal of Biological Chemistry*, 267(27), 19548–19554.
- Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25(6), 947–970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>
- Pozzi, A. (2001). Regulación de la actividad de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa en el testículo de *Bufo arenarum*: Relación con la espermiación inducida por hCG. Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Rey, R., Al-Attar, L., Louis, F., Jaubert, F., Barbet, P., Nihoul-Fekete, C., ... Josso, N. (1996). Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-müllerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *The American Journal of Pathology*, 148(5), 1689–1698.
- Ross, R. K., Pike, M. C., Coetzee, G. A., Reichardt, J. K., Yu, M. C., Feigelson, H., ... Henderson, B. E. (1998). Androgen metabolism and prostate cancer: Establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Research*, 58(20), 4497–4504.
- Russell, D. W., Berman, D. M., Bryant, J. T., Cala, K. M., Davis, D. L., Landrum, C. P., ... Wigley, W. C. (1994). The molecular genetics of steroid 5 α -reductases. *Recent Progress in Hormone Research*, 49, 275–284. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8146427
- Russell, D. W., & Wilson, J. D. (1994). Steroid 5 α -Reductase: Two Genes/Two Enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 63(1), 25–61. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.000325>
- Russell, D. W., & Wilson, J. D. (2014). Steroid 5 α -Reductase 2 Deficiency. In M. I. New, O. Lekarev, A. Parsa, T. T. Yuen, B. W. O'Malley, & G. D. Hammer

- (Eds.), *Genetic Steroid Disorders* (1st ed., pp. 199–214). San Diego: Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416006-4.00014-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416006-4.00014-4)
- Samtani, R., Bajpai, M., Vashisht, K., Ghosh, P. K., & Saraswathy, K. N. (2011). Hypospadias risk and polymorphism in *SRD5A2* and *CYP17* genes: Case-control study among Indian children. *Journal of Urology*, *185*(6), 2334–2339. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.02.043>
- Sanderson, J. T. (2006). The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, *94*(1), 3–21. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl051>
- Sewer, M. B., Li, D., Dammer, E. B., Jagarlapudi, S., & Lucki, N. (2008). Multiple signaling pathways coordinate *CYP17* gene expression in the human adrenal cortex. *Acta Chimica Slovenica*.
- Shaffer, P. L., Jivan, A., Dollins, D. E., Claessens, F., & Gewirth, D. T. (2004). Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(14), 4758–4763. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401123101>
- Shen, W. H., Moore, C. C., Ikeda, Y., Parker, K. L., & Ingraham, H. A. (1994). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: A link to the sex determination cascade. *Cell*, *77*(5), 651–661.
- Silver, R. I., Wiley, E. L., Thigpen, A. E., Guileyardo, J. M., McConnell, J. D., & Russell, D. W. (1994). Cell type specific expression of steroid 5 α -reductase 2. *The Journal of Urology*, *152*(2 Pt 1), 438–442.
- Steers, W. D. (2001). 5 α -Reductase Activity in the Prostate. *Urology*, *58* (6 SUPPL. 1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(01\)01299-7](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(01)01299-7)
- Thai, H. T. T., Kalbasi, M., Lagerstedt, K., Frisen, L., Kockum, I., & Nordenskjöld, A. (2005). The valine allele of the V89L polymorphism in the 5- α -reductase gene confers a reduced risk for hypospadias. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *90*(12), 6695–6698. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0446>

- Thigpen, A. E., Davis, D. L., Milatovich, A., Mendonca, B. B., Imperato-Mcginley, J., Griffin, J. E., ... Russell, D. W. (1992). Molecular Genetics of Steroid 5 α -Reductase 2 Deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(3), 799–809. <https://doi.org/10.1172/JCI115954>
- Vilchis, F., Canto, P., Chávez, B., Ulloa-Aguirre, A., & Mendez, J. P. (1997). Molecular analysis of the 5 α -steroid reductase type 2 gene in a family with deficiency of the enzyme. *American Journal of Medical Genetics*, 69(1), 69–72.
- Vilchis, F., & Chávez, B. (2002). Steroid Reductases. In *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* (pp. 3008–3011). John Wiley & Sons, Inc.
- Vilchis, F., Hernandez, D., Canto, P., Mendez, J. P., & Chávez, B. (1997). Codon 89 polymorphism of the human 5 α -steroid reductase type 2 gene. *Clinical Genetics*, 51(6), 399–402.
- Vilchis, F., Méndez, J. P., Canto, P., Liebermen, E., & Chávez, B. (2000). Identification of missense mutations in the *SRD5A2* gene from patients with steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Clinical Endocrinology*, 52(2), 383–387.
- Vilchis, F., Ramos, L., Méndez, J. P., Benavides, S., Canto, P., & Chávez, B. (2010). Molecular analysis of the *SRD5A2* in 46,XY subjects with incomplete virilization: The P212R substitution of the steroid 5 α -reductase 2 may constitute an ancestral founder mutation in Mexican patients. *Journal Of Andrology*, 31(4), 358–364. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.009407>
- Vilchis, F., Valdez, E., Ramos, L., García, R., Gómez, R., & Chávez, B. (2008). Novel compound heterozygous mutations in the *SRD5A2* gene from 46,XY infants with ambiguous external genitalia. *Journal of Human Genetics*, 53(5), 401–406. <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0274-2>
- Wang, Y., Li, Q., Xu, J., Liu, Q., Wang, W., Lin, Y., ... Shen, Y. (2004). Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 12(9), 706–712. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201232>
- Warne, G. L., & Zajac, J. D. (1998). Disorders of sexual differentiation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 27(4), 945–67, x.

- Wigley, W. C., Pihoda, J. S., Mowszowicz, I., Mendonca, B. B., New, M. I., Wilson, J. D., & Russell, D. W. (1994). Natural mutagenesis study of the human steroid 5 α -reductase 2 isozyme. *Biochemistry*, 33(5), 1265–1270.
- Wilson, C. A., & Davies, D. C. (2007). The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction (Cambridge, England)*, 133(2), 331–359. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0078>
- Wilson, J. D. (1975a). Dihydrotestosterone formation in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from normal subjects and patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism, Type 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(9), 3498–3504.
- Wilson, J. D. (1975b). Metabolism of testicular androgens. *American Physiological Society*, 5, 491–508. Retrieved from <http://www.ponline.org/node/505653>
- Wilson, J. D., Griffin, J. E., & Russell, D. W. (1993). Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocrine Reviews*, 14(5), 577–593. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-5-577>
- Zhu, Y. S., & Imperato-Mcginley, J. (2008). Male Sexual Differentiation Disorder and 5 α -reductase-2 Deficiency. <https://doi.org/10.3843/GLOWM.10350>
- Zhu, Y. S., Katz, M. D., & Imperato-Mcginley, J. (1998). Natural potent androgens: Lessons from human genetic models. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12(1), 83–113.