



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Impacto mutacional del locus *SRD5A2* sobre las
propiedades catalíticas de la enzima en pacientes
con Desorden del Desarrollo Sexual 46,XY ”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

FERNANDA PAOLA LÓPEZ MIRANDA



Ciudad Universitaria, CDMX.

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. MARINA GAVILANES RUIZ

VOCAL: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

SECRETARIO: DR. LUIS RAMOS TAVERA

PRIMER SUPLENTE: DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

SEGUNDO SUPLENTE: DR. JAVIER AXOSCO MARÍN

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:

FERNANDA PAOLA LÓPEZ MIRANDA

RECONOCIMIENTO



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

El trabajo experimental del presente estudio se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Biología de la Reproducción, Laboratorio de Bioquímica Hormonal.

DEDICATORIA

A mi mamá, Lourdes Miranda, por ser la persona más importante en mi vida. Gracias por tu inmenso esfuerzo, por tus desmañadas desde que era pequeña y porque sin ti, simplemente yo no hubiera llegado a ser la mujer que soy ni hasta donde estoy.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá. Gracias por enseñarme con tu ejemplo a esforzarme en la vida, a siempre salir adelante en las adversidades, a ser una mujer independiente que siempre lleva la cabeza en alto y a que la educación es lo más importante, cosa que sin tu arduo trabajo y dedicación yo nunca hubiera logrado. A pesar de todo, nunca me faltó nada y por eso te estaré agradecida por el resto de mi vida. Gracias por forjar mi camino, por tu apoyo incondicional y por siempre sacarnos adelante. Este trabajo es la culminación de todos esos años de tu gran esfuerzo, disfrútalo mucho porque este logro es tuyo. Te amo.

A mi todo y mejor amigo Moisés Roldán. Como cuando te conocí, jamás creí que todo esto iba a pasar y que iba a llegar este día. No tengo palabras más que agradecerte por tu enorme apoyo, amor, cariño, consejos, paciencia y motivación a lo largo de este camino y a lo largo de todos estos años que hemos compartido. Gracias por hacer de mí una mejor persona, pero sobre todo gracias por hacerme reír más que nadie en el mundo, definitivamente no pude encontrar mejor persona en esta vida que tú. Estoy segura de que esta, es una de las muchas cosas que nos faltan por compartir. Gracias por estar siempre a mi lado en los momentos más importantes. Siempre nuestro.

A mi Lupita. Desde el momento en el que me conoció siempre me hizo sentir querida y bienvenida, gracias por eso y por agrandar mi pequeña familia, no pude conocer a mejores personas que ustedes y agradezco a la vida por eso. Gracias por las palabras de cariño y amor de siempre y sobre todo gracias por todos los recuerdos construidos, la quiero mucho.

A mi Ani y a mi hermosa Paulina. Gracias por ser las increíbles personas que son conmigo. Definitivamente ustedes hacen mi vida más amena. No saben lo que significa para mí tenerlas. Pau, sigue siendo la hermosa personita que eres por que se que un día vas a llegar muy lejos.

A Ale, Aurora, mi Max y a mi pequeña Alex. Por su enorme cariño, empatía y apoyo. Gracias por todos los ratos que pasamos juntos y gracias por abrirme las puertas de su casa. Max, sé que con esfuerzo y dedicación vas a llegar a tener todo lo que te propongas, nunca te rindas. Alex, algún día leerás esto y solo quiero decir, gracias por llegar a nuestras vidas.

A mi director de tesis y amigo, el Dr. Luis Ramos Tavera. Por su inmensa dedicación y paciencia a lo largo de la realización de este proyecto. Gracias por todo el conocimiento que me transmitió, el enorme apoyo incondicional sin el cual yo no hubiera llegado hasta aquí, el profesionalismo con el que me guió y sobre todo por los consejos, no sabe como los valoro y atesoro. Gracias por creer en mí y en la oportunidad de haberme recibido en su laboratorio que definitivamente fue el mejor inicio de carrera profesional que pude tener.

A mis sinodales: la Dra. Marina Gavilanes y el Dr. José Chaverri. Por el tiempo dedicado a este trabajo pero sobre todo a los comentarios realizados al mismo sin los cuales esto nunca hubiera sido posible.

A mis compañeros de laboratorio: Mariela, Meli, Liz, Jordan, Arturo, Fer, Octavio, Claudia, Sharon y Andrea. Les agradezco infinitamente todos los momentos que hemos pasado juntos, las risas sin parar y el apoyo incondicional. Siempre he dicho que las cosas pasan por algo y definitivamente conocerlos a ustedes me confirma que así es. Gracias por todos los recuerdos tanto dentro como fuera del instituto, por los fines de año que pasamos juntos, las fiestas, cumpleaños y por los intercambios en donde las risas nunca faltaron.

A la M. en C. Lizette Mares. Por ser la mejor mentora que pude tener, por la paciencia y por todas las dudas resueltas por mínimas que estas pudieran llegar a ser. Gracias por todo el apoyo que siempre me diste y sobre todo por la amistad que me brindaste desde el primer día en que llegué al laboratorio de Bioquímica Hormonal.

A mi amigo y compañero de carrera, Erick Pérez Almazán. Aunque debí haberte encontrado mucho antes en esta etapa, agradezco infinitamente la amistad y los momentos divertidos que me has brindado desde el primer día. Gracias por ser mi confidente, por los consejos, todos los trabajos juntos, la motivación para nunca tirar la toalla y las desveladas en las que nos acompañamos. Definitivamente todo valió la pena.

A mi mejor amiga y hermana, Lolita Sánchez Lara. Gracias por estos años de amistad incondicional, por tu inmenso apoyo, cariño, risas, consejos y por todo, todo, todo lo vivido juntas. Aunque no siempre esté físicamente sabes que siempre estas presente en mi vida. A tus papás, el Sr. Germán y la Sra. Alicia por siempre abrirme las puertas de su casa, lo valoro infinitamente. Gracias por hacerte parte de mis logros. Te quiero mucho.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 12 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.1 <i>Determinación sexual</i> | 13 |
| 1.2 <i>Diferenciación sexual</i> | 15 |
| 1.3 <i>Enzimas esteroideogénicas</i> | 18 |
| 1.4 <i>5α-esteroide reductasa tipo 2</i> | 23 |
| 1.5 <i>Control génico de los andrógenos</i> | 31 |
| 1.6 <i>Desórdenes del desarrollo sexual</i> | 36 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 40 |
| 3. HIPÓTESIS | 41 |
| 4. OBJETIVOS | 42 |
| 4.1 <i>Objetivo general</i> | 42 |
| 4.2 <i>Objetivos específicos</i> | 42 |
| 5. METODOLOGÍA | 43 |
| 5.1 <i>Preparación de células para transfección</i> | 43 |
| 5.2 <i>Transfección células-plásmido</i> | 45 |
| 5.3 <i>Actividad de la 5α-esteroide reductasa tipo 2</i> | 46 |
| 5.4 <i>Extracción del esteroide</i> | 47 |
| 5.5 <i>Cromatografía en capa fina</i> | 48 |
| 5.6 <i>Cuantificación de proteínas</i> | 49 |
| 6. RESULTADOS | 51 |
| 7. DISCUSIÓN | 59 |
| 8. CONCLUSIONES | 68 |
| 9. PERSPECTIVAS | 69 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | 70 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Fig. 1. Cascada de eventos moleculares llevados a cabo durante la determinación y diferenciación sexual etapas del desarrollo embrionario..... | 17 |
| Fig. 2. Vías Δ^4 y Δ^5 para la síntesis de andrógenos a partir del colesterol como precursor esencial..... | 22 |
| Fig. 3. Reacción enzimática catalizada por la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2..... | 24 |
| Fig. 4. Diferentes tipos de mutaciones identificadas en el gen <i>SRD5A2</i> relacionadas con la deficiencia de la enzima 5 α -reductasa tipo 2..... | 29 |
| Fig. 5. Descripción estructural del gen <i>AR</i> o <i>NR3C4</i> de humano..... | 33 |
| Fig. 6. Eventos moleculares que describen el mecanismo por el cual actúan los andrógenos y ejercen su efecto fisiológico..... | 34 |
| Fig. 7. Representación esquemática del vector de clonación utilizado para el proceso de transfección..... | 45 |
| Fig. 8. Imagen representativa del medio de cultivo celular HEK293 utilizado para transfectar el vector de clonación pCMV6-XL4-WT y pCMV6-XL4-mutado..... | 51 |
| Fig. 9. Cromatografía en capa fina de la extracción de esteroides..... | 53 |
| Fig. 10. Actividad <i>in vitro</i> de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 para la variante génica (<i>L89</i>)..... | 54 |
| Fig. 11. Actividad <i>in vitro</i> de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 para la variante génica <i>p.S14R</i> | 55 |
| Fig. 12. Actividad <i>in vitro</i> de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 para la variante génica <i>p.R145L</i> | 55 |
| Fig. 13. Actividad <i>in vitro</i> de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 para la variante génica <i>p.F118L</i> | 56 |
| Fig. 14. Actividad de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 en células HEK293 a concentraciones crecientes de (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 μ M) de T marcada radiactivamente..... | 57 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Enzimas P450 e hidroxisteroide deshidrogenasas involucradas en la síntesis de hormonas esteroides..... | 20 |
| Tabla 2. Acción de los andrógenos en la pubertad..... | 24 |
| Tabla 3. Características típicas de deficiencia de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 en sujetos 46,XY..... | 30 |
| Tabla 4. Factores generales de transcripción en célula de humano..... | 35 |
| Tabla 5. Clasificación de los diferentes DSD's (Hughes, 2008)..... | 37 |
| Tabla 6. cDNA de las variantes génicas de <i>SRD5A2</i> utilizado para la transfección células-plásmido..... | 46 |
| Tabla 7. Propiedades cinéticas de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2..... | 58 |
| Tabla 8. Clasificación de la patogenicidad de las diferentes mutantes descritas a lo largo de este estudio encontradas en el gen <i>SRD5A2</i> | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| SRD5A2 | Enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 |
| T | Testosterona |
| DHT | Dihidrotestosterona |
| cDNA | DNA complementario |
| K_m | Constante de afinidad |
| K_{cat} | Constante catalítica o número de recambio |
| WT1 | Proteína tumoral de Wilms |
| SF1 | Factor de empalme 1 |
| LIM1 | Factor transcripcional LIM1 |
| GATA4 | Proteína de unión GATA |
| FOG2 | Cofactor transcripcional de la familia FOG |
| RSPO1 | Proteína R-spondin-1 |
| WNT4 | Familia de sitios de integración MMTV de tipo sin alas |
| SOX9 | Factor de transcripción SOX9 |
| SRY | Región determinante del sexo Y |
| FOXL2 | Forkhead box protein L2 |
| E₂ | Estradiol |
| HAM | Hormona antimülleriana |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante β |
| hCG | Gonadotropina coriónica humana |
| LH | Hormona luteinizante |
| HSD | Hidroxiesteroide deshidrogenasa |
| CYP450_{scc} | Escisión de la cadena lateral del colesterol Citocromo P450 |
| AMPc-PKA | Complejo adenosin monofosfato cíclico-proteína cinasa A |
| StAR | Steroidogenic Acute Regulatory protein |
| OMM | Membrana mitocondrial externa |
| IMM | Membrana mitocondrial interna |
| Δ^4 | Ruta esteroidogénica denominada delta 4 |
| Δ^5 | Ruta esteroidogénica denominada delta 5 |

| | |
|--------------|--|
| DHEA | Dehidroepiandrosterona |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| kDa | Kilo Dalton |
| AR | Receptor de andrógenos |
| BPH | Hiperplasia prostática benigna |
| LHRH | Hormona liberadora de hormona luteinizante |
| SHBG | Globulina transportadora de hormonas sexuales |
| NTD | Dominio NH ₂ -terminal |
| DBD | Dominio central de unión al DNA |
| LBD | Dominio de unión al ligando |
| HSP | Proteínas de choque térmico |
| IGF-1 | Factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1 |
| IL6 | Interleucina 6 |
| CoA | Coenzima A |
| ARE | Elementos de respuesta a andrógenos |
| mRNA | RNA mitocondrial |
| DSD | Desorden del desarrollo sexual |
| SIA | Síndrome de insensibilidad a andrógenos |
| WT | Wild type o silvestre |
| DPM | Desintegraciones por minuto |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| SSCP | Polimorfismo de conformación de cadena sencilla |

RESUMEN

La 5 α -esteroide reductasa tipo 2 codificada por el gen *SRD5A2*, biotransforma testosterona (T) en dihidrotestosterona (DHT), por ello, es una enzima responsable del desarrollo gonadal embrionario y desarrollo de los caracteres sexuales secundarios durante la pubertad. Se han descrito alrededor de 100 mutaciones en el gen *SRD5A2* que causan deficiencia en la cantidad de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2, constituyendo esta deficiencia un desorden autosómico recesivo-46,XY, caracterizado por la diferenciación incompleta de genitales externos. No obstante esto, la actividad de la enzima ha sido poco estudiada. En este estudio se analizaron funcionalmente las mutaciones, p.F118L, p.R145L y p.S14R de 3 diferentes pacientes diagnosticados previamente con deficiencia de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2. Los cDNAs mutados se insertaron en el plásmido pCMV6-XL4 y se transfectaron en células HEK293. Mediante cromatografía en capa fina se determinó la actividad de 5 α -esteroide reductasa tipo 2 a diferentes concentraciones de T, complementándola con predictores de los efectos patogénicos. El análisis *in vitro* realizado reveló la pérdida parcial de actividad enzimática para la variante p.F118L mientras que para las variantes p.R145L y p.S14R la actividad resultó casi nula en comparación con la de la enzima silvestre. Los valores de K_m resultaron incrementados (10.16, 8.69 y 7.03 μ M, respectivamente) en comparación a los de la enzima silvestre (0.73 μ M), explicando la baja afinidad de la enzima por T mientras que los valores de K_{cat} disminuidos comprueban la baja conversión de T en DHT. Los programas bioinformáticos predijeron las tres alteraciones como perjudiciales para la enzima. Estas alteraciones en la actividad de *SRD5A2* podrían explicarse debido a una afectación estructural de la enzima que afecta su estabilidad como proteína o sus propiedades catalíticas. Esta investigación destaca la importancia del correcto funcionamiento de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 para que individuos con cariotipo 46,XY tengan una correcta diferenciación sexual.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Determinación sexual

En mamíferos, las diferencias biológicas entre machos y hembras son determinadas genéticamente durante el desarrollo embrionario (Bashamboo & McElreavey, 2015). El desarrollo sexual se puede dividir en dos etapas: 1) "**determinación sexual**" que es el establecimiento que seguirá la gónada indiferenciada para desarrollarse como testículo u ovario y 2) "**diferenciación sexual**" el cual ocurre una vez que las gónadas se han desarrollado y es inducida por los productos de la gónada para establecer el sexo fenotípico.

Al inicio de la gestación (primera y segunda semana en humanos), los embriones de ambos sexos difieren solo en sus cromosomas sexuales. En humanos, el sexo femenino está definido por la presencia de dos cromosomas XX mientras que el sexo masculino se define por los cromosomas XY. En las primeras etapas de gestación (cuarta semana), el borde urogenital es diferenciado a una gónada bipotencial (Ono & Harley, 2013); el mecanismo molecular de diferenciación es controlado mediante los genes *WT1*, *SF1*, *LIM1*, *GATA4* y *FOG2* (Hughes, 2001; McClelland et al., 2012; Ono & Harley, 2013). Tanto el desarrollo testicular como el ovárico involucran vías sexuales específicas que parecen actuar de manera antagonista entre sí.

Durante la sexta semana del desarrollo embrionario, las células germinales precursoras de espermatozoides u ovocitos migran a las gónadas siendo rodeadas

por las células mesodérmicas, mientras que en la séptima semana se lleva a cabo la determinación del sexo gonadal, siendo hasta aquí ambos cariotipos (XX, XY) anatómicamente iguales (MacLaughlin & Donahoe, 2004).

La determinación del sexo gonadal en embriones con cromosomas XX depende de los genes *FOXL2*, *RSPO1* y *WNT4*. El papel fundamental de *RSPO1* es actuar sinérgicamente con *WNT4* para producir β -catenina (Wilhelm et al., 2007; Maatouk & Capel, 2008; Jameson et al., 2012,). Este factor transcripcional presenta 3 funciones principales; 1) potenciar la acción conjunta de *RSPO1* y *WNT4*, 2) activar los genes involucrados en la diferenciación de las células de la granulosa para dar inicio al desarrollo ovárico y 3) prevenir la producción de *SOX9* (Maatouk & Capel, 2008).

En embriones con cariotipo XY, la determinación del sexo gonadal depende de múltiples factores transcripcionales como *SRY* y *SOX9*. El papel primordial del gen *SRY* (en gónadas XY) es determinar la formación del testículo (Sinclair et al., 1990). Otra función importante del gen *SRY* es unirse a la región promotora del gen *CYP19A1* (P450arom) para reprimir la transcripción de la aromatasa e impedir la conversión de T a estradiol (E_2). La proteína codificada por *SRY* regula la expresión del factor de transcripción *SOX9* que induce la diferenciación de las células de Sertoli. La activación y el mantenimiento de la expresión de *SOX9* desencadenan otros genes (por ejemplo, *SOX8*) necesarios para la diferenciación testicular y la diferenciación masculina. Asimismo, se ha determinado que *SOX9* suprime

activamente la expresión de genes implicados en el desarrollo ovárico (Morais et al., 1996) como *FOXL2* y *WNT4*.

1.2 Diferenciación sexual

Durante la octava semana del desarrollo embrionario, las células mesodérmicas de individuos con cariotipo XY inician su diferenciación hacia células de Sertoli, mismas que durante esta etapa son encargadas de secretar la hormona antimülleriana (HAM), una glicoproteína perteneciente a la familia TGF- β (Lee & Donahoe, 1993) que inhibe la formación del conducto Mülleriano que originará en individuos XX la formación de útero y oviductos (conductos característicos del sexo femenino) (Hiort & Holterhus, 2000).

Las células mesodérmicas de igual manera se diferencian en células de Leydig, encargadas de secretar testosterona (T) cuya síntesis es controlada en el crecimiento fetal por la gonadotropina coriónica humana (hCG) y tiempo después por la hormona luteinizante (LH) (Misrahi et al., 1998). La T causa la diferenciación del conducto Wolffiano en genitales internos masculinos (epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales), mientras que la dihidrotestosterona (DHT) formada por la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 lleva a cabo la diferenciación de los genitales externos (falo, escroto y uretra) y regula el crecimiento prostático.

Cuando el ovario se encuentra formado, en ausencia de T el conducto Wolffiano se degenera y el conducto Mülleriano se mantiene intacto diferenciándose así en

oviductos, útero, cérvix y tercio superior de la vagina. En el desarrollo ovárico cada célula germinal se convierte en óvulo y las células epiteliales corticales se diferencian en células de la granulosa. Las células del mesénquima del ovario en desarrollo se diferencian en células de la teca y estos dos tipos de células en conjunto forman folículos que sintetizan estrógenos (Fig. 1).

1. 3 Enzimas esteroideogénicas

La esteroideogénesis es definida como el conjunto de reacciones metabólicas que se llevan a cabo en células y tejidos específicos cuyo principal efecto está relacionado a la homeostasis corporal y regulación de funciones reproductivas, como el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios (Gómez-Chang et al., 2012; Stocco et al., 2017). Durante este proceso contribuyen diferentes tipos de citocromos P450 e hidroxisteroide deshidrogenasas (HSD) para la síntesis de hormonas esteroides gonadales o suprarrenales (Payne & Hales, 2004). Las hormonas esteroides se clasifican en andrógenos (T y DHT); estrógenos (estradiol); progestágenos (progesterona), glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (aldosterona). Los esteroides son sintetizados principalmente en gónadas (testículos y ovarios), glándulas suprarrenales, en menor proporción en el sistema nervioso central y en la placenta; esta última llevándose a cabo de manera transitoria durante el embarazo (Miller, 2013).

En células de Leydig del testículo fetal, la biosíntesis *de novo* de la T a partir de acetato utiliza al colesterol como un intermediario obligatorio. La síntesis de hormonas esteroides inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona por acción de la enzima citocromo P450_{scc}/CYP11A1 (Cholesterol side chain cleavage, EC 1.14.15.6) (Sanderson, 2006). Esta reacción involucra tres monooxigenaciones. En gónadas y glándulas suprarrenales esto implica una regulación aguda mediada por la vía AMPc-PKA que involucra la fosforilación de enzimas como la hidrolasa de ésteres del colesterol o de la proteína Steroidogenic

Acute Regulatory (StAR), la cual lleva a cabo el transporte del colesterol hacia la mitocondria para después ser translocado de la membrana mitocondrial externa (OMM) hacia la interna (IMM) (Gómez-Chang et al., 2012; Papadopoulos et al., 2015).

Sintetizada la pregnenolona esta puede ser biotransformada mediante dos vías metabólicas para la obtención de andrógenos, denominadas vía Δ^4 y Δ^5 , siendo esta última la que predomina en el humano (Fig. 2). En la vía Δ^5 la pregnenolona es biotransformada a 17α -hidroxipregnenolona por la enzima P450c17 (CYP17A1, EC 1.14.99.9), la cual presenta actividad de 17α -hidroxilasa y $17,20$ -liasa. Mediante la actividad de 17α -hidroxilasa forma hidroxipregnenolona para después con actividad de $17,20$ -liasa catalizar la formación de dehidroepiandrosterona (DHEA). Cada reacción requiere una molécula de NADPH y una molécula de O_2 molecular (Hanukoglu, 1992; Miller & Auchus, 2011).

Sucesivamente, la DHEA es convertida a Δ^4 -androstendiona reacción catalizada por la enzima 3β -HSD tipo 2 (HSD3B2, EC1.1.1.145). Esta enzima bifuncional cataliza la oxidación e isomerización de los precursores de Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide en Δ^4 -cetoesteroides, lo que conduce a la formación de todas las clases de hormonas esteroides. La primera reacción es la deshidrogenación del hidroxiesteroide 3β -ecuatorial que requiere la coenzima NAD^+ produciendo un intermedio Δ^5 -3-ceto y NADH reducido. La coenzima reducida, NADH, activa la isomerización del Δ^5 -3-cetosteroide para producir el Δ^4 -3-cetosteroide. En diversos estudios realizados en ratones se ha demostrado que esta enzima se expresa

específicamente en la mitocondria de las células de Leydig (Pelletier et al., 2001; Rheume et al., 1991; Simard et al., 1996).

La etapa final en la biosíntesis de andrógenos requiere de la 17 β -HSD tipo 5 (*AKR1C3*) (Tabla 1.). La enzima androgénica 17 β -HSD tipo 5 (*HSD17B5*, EC 1.1.1.64) con actividad principalmente reductiva cataliza la reacción reversible para la síntesis de andrógenos realizando la conversión preferencial de Δ^4 -androstendiona a T. La enzima microsomal requiere NADPH como cofactor. La expresión de 17 β -HSD tipo 5 es exclusiva de la gónada masculina y se encuentra restringida a células de Leydig en etapa adulta (O'Shaughnessy et al., 2000).

Tabla 1. Enzimas P450 e hidroxisteroide deshidrogenasas involucradas en la síntesis de hormonas esteroideas.

| Gen | Sitio cromosomal | Peso molecular | Sinónimos | Tejido sitio-específico |
|----------------|------------------|----------------|--|---|
| <i>CYP11A1</i> | 15q23-q24 | 56 kDa | P450 _{scc} , Cholesterol Side Chain Cleavage | Corteza suprarenal, testículos |
| <i>CYP17A1</i> | 10q24.3 | 57 kDa | 17 α -hidroxilasa, 17,20 liasa | Células Leydig, corteza adrenal |
| <i>HSD3B2</i> | 1p13.1 | 42 kDa | 3 β - hidroxisteroide deshidrogenasa, Δ^5 - Δ^4 isomerasa, 3 β -HSD tipo 2 | Células Leydig, corteza adrenal (microsomal y mitocondria) |
| <i>HSD17B5</i> | 10p15.1 | 34.5 kDa | 17 β -HSD tipo 5, 17 β -HSD testicular | Testículos (microsomal) |

La T y DHT son dos hormonas muy importantes para el desarrollo del fenotipo masculino, de los caracteres sexuales secundarios y la espermatogénesis (Gómez-Chang et al., 2012). En el humano, la vía Δ^5 (Fig.2) es regulada de forma aguda principalmente por el efecto de la LH la cual se une y activa a receptores acoplados a proteínas G (Hu et al., 2010; Tremblay, 2015). Una vez sintetizada T, viaja a través del torrente sanguíneo hacia órganos blanco como próstata, piel e hígado en donde es convertida en dihidrotestosterona por acción de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 (Bain, 2007; Swerdlof et al., 2017), conversión considerada como irreversible (Horton, 1992).

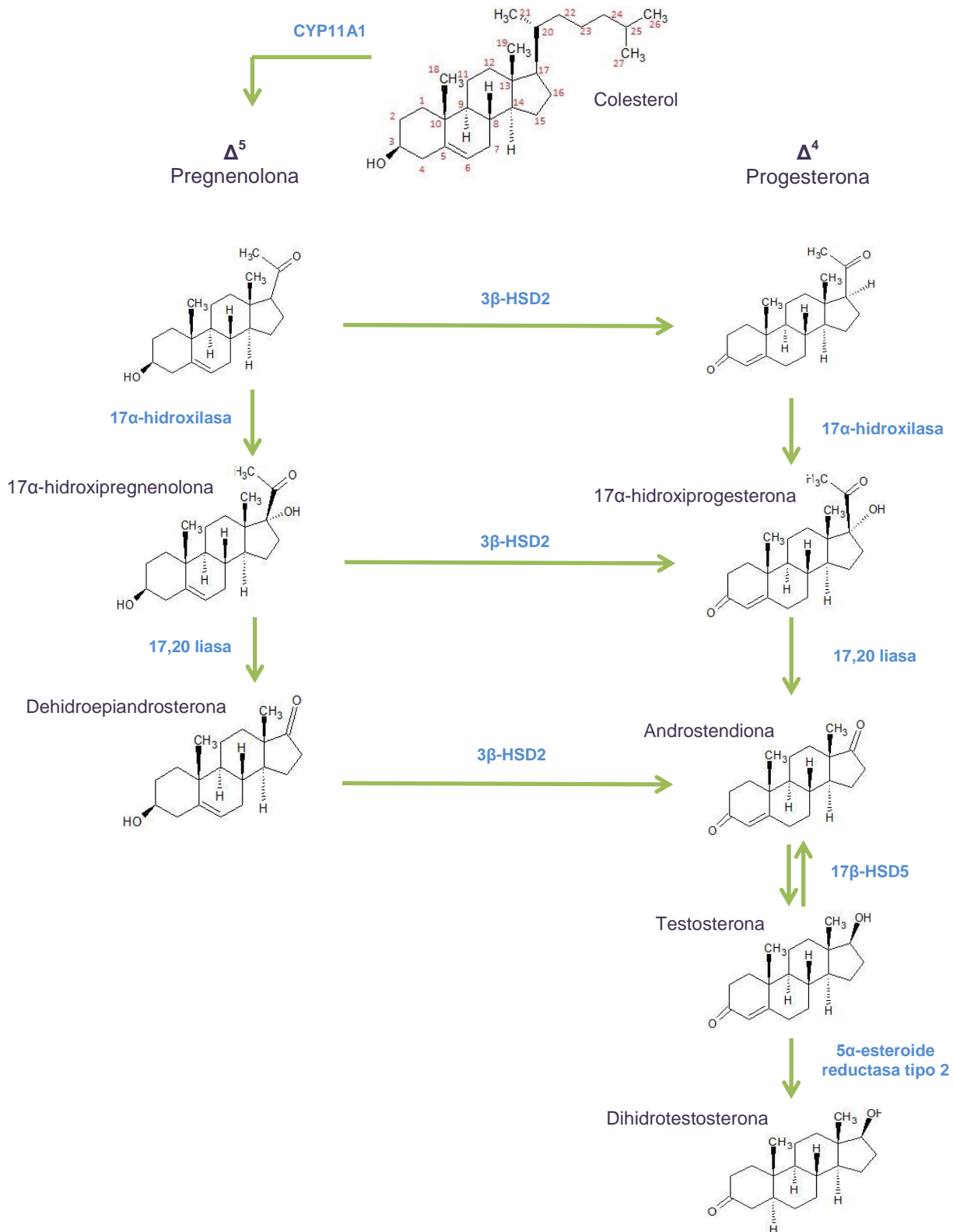


Fig. 2. Vías Δ^4 y Δ^5 para la síntesis de andrógenos a partir del colesterol como precursor esencial. Se especifican los citocromos e hidroxiesteroide deshidrogenasas que catalizan cada paso de la síntesis.

1.4 5 α -esteroide reductasa tipo 2

La completa diferenciación de los caracteres sexuales masculinos en el feto durante la etapa de gestación y virilización durante la pubertad (Tabla 2.) se lleva a cabo mediante la conversión de T a DHT (Wilson, 1978) y la reacción es catalizada por la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 (*SRD5A2*, EC 1.3.99.5) (Fig. 3), (Steers, 2001). Aunque la T y DHT presentan diferente actividad biológica, ambas interaccionan con el mismo receptor de andrógenos (*AR* o *NR3C4*), el cual es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de esteroides/hormonas tiroideas que regula la expresión de un gen blanco (Beato, 1989; Wilson, 1978; Ramos et al., 2018). En humanos, la isoenzima microsomal predomina en la próstata, es codificada por el gen *SRD5A2* y se localiza en el cromosoma 2 del brazo corto en p23.1 (Andersson et al., 1989; Thigpen et al., 1992; Yuan et al., 2017). El gen está conformado estructuralmente por 5 exones separados por 4 intrones (Jenkins et al., 1991; Labrie et al., 1992) y abarca 40 kb del DNA genómico (Vilchis & Chávez, 2002).

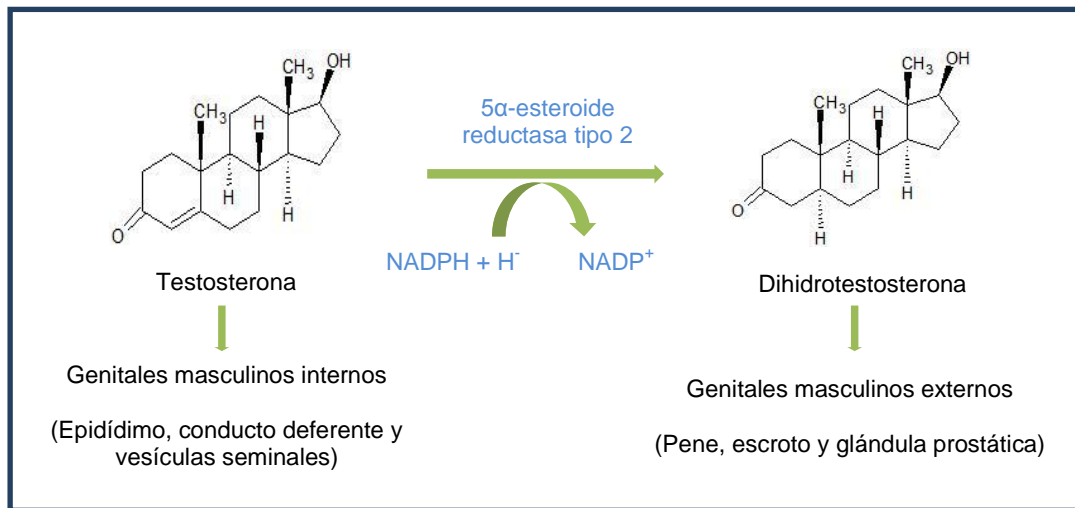


Fig. 3. Reacción enzimática catalizada por la 5α-esteroide reductasa tipo 2. La reacción catalizada requiere NADPH como cofactor. Esta enzima elimina el doble enlace de la posición cuatro y cinco de esteroides C19 y C21. Asimismo, el carbono 5 recibe un anión hidruro (H⁻) mientras el carbono 4 adquiere un protón (H⁺).

Tabla 2. Acción de los andrógenos en la pubertad.

| Testosterona | DHT |
|--|---------------------------------------|
| Acciones anabólicas Incremento de masa muscular Alargamiento del falo Alargamiento escrotal Engrosamiento de cuerdas vocales | Incremento de vello facial y corporal |
| Espermatogénesis | Recesión del cuero cabelludo |
| Impulso sexual masculino/ rendimiento | Crecimiento de próstata |

En diversos estudios se ha demostrado diferentes polimorfismos del gen *SRD5A2* (Russell & Wilson, 1994). En la región 3' no traducida del exón 5 existe un número variable de repeticiones AT (Davis & Russell, 1993). El alelo más frecuente no posee repeticiones AT, mientras que los dos alelos variantes contienen 9 y 18 copias del dinucleótido. Dentro de un tamizaje de 172 cromosomas, la frecuencia

con la que se encuentran estos alelos variantes es muy baja (< 0.02), asimismo se ha observado que el número de repeticiones del dinucleótido influye en la actividad enzimática de *SRD5A2* (Vilchis et al. 1997).

El segundo polimorfismo fue encontrado mediante tamizaje del locus *SRD5A2* e implica una sustitución C/T dentro de los primeros nucleótidos del intrón 1 del gen (Russell & Wilson, 1994). El tercer polimorfismo (V89/L89) modifica la región codificante de la proteína en el codón 89, la cual puede ser GTA (valina) o CTA (leucina). Las consecuencias bioquímicas de este cambio no se han determinado completamente. El cuarto polimorfismo (p.A49/p.T49) consiste en un cambio de GCA que codifica para alanina en el codón 49 por ACA que codifica para treonina. Interesantemente, la caracterización de estos polimorfismos en el gen *SRD5A2* se ha asociado a diferentes alteraciones hereditarias (Russell & Wilson, 1994).

El gen *SRD5A2* codifica para una proteína denominada 5α -esteroide reductasa tipo 2 o *SRD5A2*. La isoenzima es una proteína hidrofóbica con un peso molecular de aproximadamente 28.4 kDa (Andersson et al., 1991; Imperato-McGinley & Zhu, 2002; Russell & Wilson, 2014;), consta de 254 aminoácidos con un dominio N-terminal de unión al sustrato T y un dominio C-terminal de unión a NADPH (Cheng et al., 2015). La reductasa tipo 2 posee una K_m aparente para T de 0.6-0.9 μM y una K_m aparente para el cofactor NADPH de 3-10 μM (Imperato-McGinley & Zhu, 2002).

Los estudios mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* han revelado que esta enzima es expresada en células del estroma y del epitelio basal de la próstata (Rittmaster, 1997), mientras que los estudios de inmunocitoquímica fluorescente indirecta han indicado que reside en el retículo endoplásmico (microsomas) integrada en la bicapa lipídica de este organelo, lo que explica la necesidad de detergentes para solubilizar a la misma (Thigpen et al., 1993; Imperato-McGinley & Zhu, 2002). Su localización subcelular (endosomal o lisosomal), difiere dependiendo de la fuente de tejido de la misma y de su pH ácido óptimo a 5.5 (Andersson et al., 1991; Normington & Russell, 1992). Esta localización puede facilitar la posterior unión del producto DHT por los receptores nucleares de andrógenos.

La actividad errónea de SRD5A2 parece ser la causa de diferentes alteraciones endócrinas como lo son el acné, alopecia androgénica, hirsutismo, cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna (BPH), entre otros (Russell & Wilson, 1994). Esta última alteración se debe a los niveles de T en sangre que comienzan a disminuir por el aumento en los niveles de DHT. Posteriormente esta se combina con el AR de la glándula prostática formando así un complejo DHT-AR que estimula la proliferación de células prostáticas y por lo tanto, un aumento en el tamaño de la próstata (Ryl et al., 2017).

La SRD5A2 se encuentra expresada en tejidos como hígado, próstata, en piel de tejido reproductivo como la uretra, vesícula seminal, epidídimo, folículos pilosos, transitoriamente en la piel y cuero cabelludo de recién nacidos y en tejidos que

incluyen BPH y adenocarcinoma prostático (Thigpen et al., 1993; Eicheler et al., 1994; 1995; Ryl et al., 2017).

Debido a que la actividad principal de la SRD5A2 es regular el crecimiento de la próstata se han desarrollado diversos fármacos cuya acción es inhibir esta enzima para ser utilizados como agentes terapéuticos (Vermeulen et al., 1989; Steers, 2001). Medicamentos entre los cuales se encuentran derivados de 4 azaesteroides como la 17β -(N-*t*-butil)carbamoil-4-aza-5 α -androst-1-en-3-ona (MK-906 Finasteride) y la 17β -(N,N-dietil)carbamoil-4-metil-4-aza-5 α -androstan-3-ona (4-MA) (Andersson & Russell, 1990) cuya función es inhibir competitivamente la actividad de 5 α -esteroide reductasa tipo 2 (Liang et al., 1985; Boudon¹ et al., 1995).

Existen mutaciones que afectan el sitio de unión al NADPH aunque no se han identificado secuencias de aminoácidos específicas y existen mutaciones las cuales parecen estar localizadas en ambos extremos de la proteína y afectan la unión del sustrato T. Los aminoácidos determinantes de unión al sustrato o al cofactor se ubican principalmente en la región del amino terminal de la proteína, por lo que se sugiere que estas mutaciones afectan la unión del sustrato o del cofactor pero no ambos (Thigpen & Russell, 1992).

Las mutaciones en el gen *SRD5A2* desencadenan un raro desorden del desarrollo sexual (DSD) denominado deficiencia de 5 α -esteroide reductasa tipo 2 (5 α -RD2) (OMIM No.264600). Está considerado un desorden autosómico recesivo que se presenta al momento del nacimiento generalmente en individuos 46,XY con una

prevalencia mayor en homocigotos en comparación con heterocigotos (Mendonca et al., 2017). En un estudio realizado en 27 individuos mexicanos se demostró que en 23 de ellos (aproximadamente 85%) existen mutaciones homocigotas o heterocigotas en el exón 4, 2 de ellos componen la mutación del heterocigoto (Vilchis et al., 2010). En algunos casos, los individuos afectados presentan solamente un alelo mutado (Hackel et al., 2005; Nicoletti et al., 2005). Dichos individuos manifiestan características típicas, expresando grados variables de virilización (Tabla 3.).

A la fecha han sido identificadas alrededor de 102 mutaciones a lo largo del gen *SRD5A2*. Entre las cuales se encuentran mutaciones sin sentido y mutaciones con sentido erróneo (nonsense/ missense) (n= 72), deleciones pequeñas del gen (n=14), mutaciones en los sitios de corte y empalme (Splice mutations) (n=7), inserciones pequeñas (n=2), inserciones/deleciones pequeñas (n=3), deleciones completas del gen (n=3) y mutaciones en la región reguladora del gen (n=1) (Imperato-McGinley & Zhu, 2002; Mendonca et al., 2017) (Fig. 4). Las mutaciones que predominan entre los exones 1 a 4 varían desde un único punto defectuoso hasta una deleción del gen completo. Estas mutaciones dan como resultado varias disfunciones enzimáticas que van desde una pérdida completa de la actividad enzimática, una alteración en la unión de un sustrato o cofactor a la enzima, una formación bloqueada de una isozima funcional (deleción, mutación sin sentido, alteraciones de la unión de empalme) o una enzima inestable.

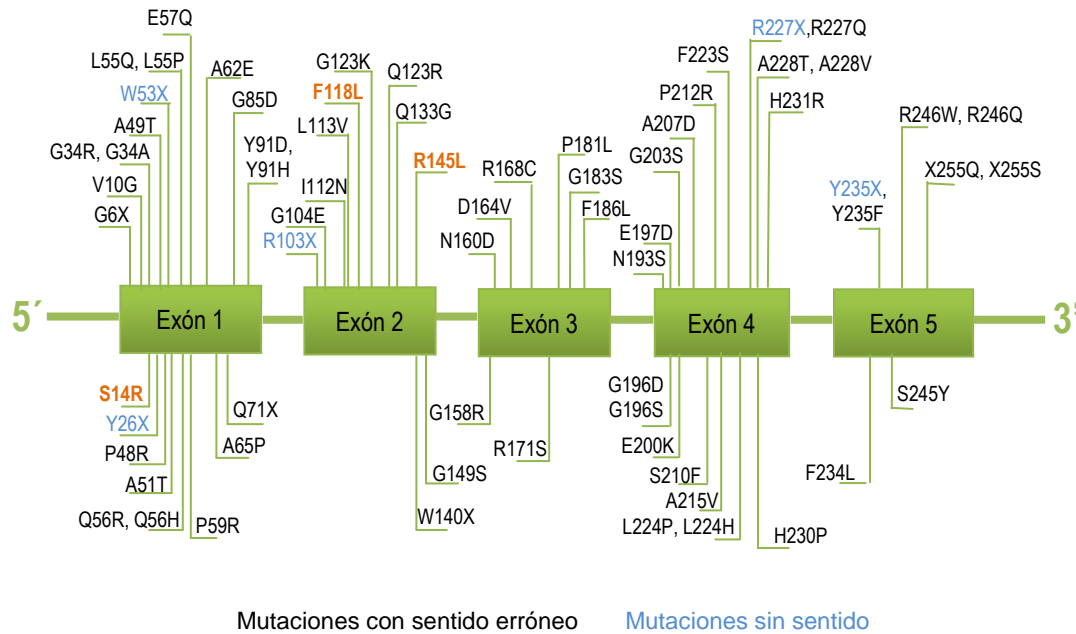


Fig. 4. Diferentes tipos de mutaciones identificadas en el gen *SRD5A2* relacionadas con la deficiencia de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2. Las mutaciones examinadas durante este proyecto se encuentran resaltadas en color naranja.

Se han descrito tres grandes grupos de pacientes con deficiencia de 5 α -esteroide reductasa tipo 2 en todo el mundo, la familia de República Dominicana, los grupos turcos y la tribu Sambia en Nueva Guinea. El primer defecto genético identificado de 5 α -esteroide reductasa tipo 2 se llevó a cabo en pseudohermafroditas machos de las tribus de Nueva Guinea (Boudon² et al., 1995). Múltiples estudios mediante análisis de Southern Blot a estos individuos han demostrado una delección de más de 20 kb en el gen *SRD5A2* (Andersson et al., 1991). En las tribus dominicanas, se encontró una mutación sin sentido en el exón 5 del gen, el cual sustituye timina por citosina y da como resultado la sustitución del aminoácido no polar triptófano por el aminoácido básico arginina en la posición 246 (R246W) de la isoenzima (Thigpen & Russell, 1992; Cai et al., 1996). Como resultado de esta mutación se reduce la

unión al cofactor, se altera el pH óptimo y existe una pérdida considerable de la actividad enzimática. Los estudios genéticos moleculares en tribus turcas revelan una única deleción básica en el exón 5 del gen, por lo consiguiente, un cambio en la posición del aminoácido 251 con la adición de 23 aminoácidos en la región del carboxilo terminal de esta enzima (Wilson et al., 1993; Zhu et al., 1998; Vilchis et al., 2010).

Tabla 3. Características típicas de deficiencia de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 en sujetos 46,XY.

| Características | |
|----------------------------|--|
| Fenotipo | Individuos con fenotipo femenino a varones con microfalo, hipospadias a genitales masculinos normales con azoospermia. |
| Tracto urogenital | Testículos, epidídimo, vesículas seminales, conductos eyaculadores que desembocan en vagina o que persisten como conductos de Gartner en la pared lateral de la vagina. No se encuentran derivados Müllerianos. |
| Características endócrinas | Niveles masculinos normales y tasas de producción de T y estrógenos. Niveles de DHT y tasas de producción bajos. Hormona luteinizante y niveles de hormona estimulante del folículo elevados (en algunos casos). |

1.5 Control génico de los andrógenos

Los andrógenos, T y DHT, son considerados los principales esteroides sexuales en individuos XY y son los responsables del desarrollo fenotípico masculino durante la embriogénesis y la maduración sexual en la pubertad (Hiipakka & Liao, 1998). La síntesis de andrógenos es regulada a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, en donde la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), sintetizada por el hipotálamo, estimula la secreción de LH en la adenohipófisis, la cual posteriormente, estimula a las células de Leydig para inducir la síntesis de T.

Una vez liberada la T, pasa a circulación sanguínea en donde además de amplificar su actividad y su concentración puede ser encontrada en su forma libre o bien unida a proteínas acarreadoras como albúmina o a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG). En la célula, la T se disocia de la SHBG y puede ser o no 5α -reducida a DHT. Ambos esteroides pueden unirse específicamente a la proteína nuclear, el receptor de andrógenos (AR) (Fang et al., 1969).

El gen del *AR* está localizado en el cromosoma X y abarca 75-90 kb del DNA genómico. Su región codificante presenta un marco de lectura abierto de aproximadamente 2757 pares de bases que comprende 8 exones (Gobinet et al., 2002). Este gen codifica para un receptor nuclear con un peso molecular de 110-114 kDa y corresponde a 919 residuos de aminoácidos (Quarmby et al., 1990; Jenster et al., 1991). El AR es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares dependientes del ligando (Lu et al., 2006). La proteína conformada

estructuralmente por cuatro dominios funcionales: 1) un *dominio NH₂-terminal* (NTD) codificado por el exón 1 que comprende más de la mitad de la proteína, encargado de la activación transcripcional y considerada la región más variable entre los receptores nucleares tanto en longitud como en secuencia; 2) un *dominio central de unión al DNA* (DBD), el cual reconoce secuencias específicas de DNA y determina la especificidad de la interacción DNA-receptor. El DBD está conformado por ocho residuos de cisteína, los cuales están involucrados en la formación de dos complejos denominados dedos de zinc, cada uno compuesto por cuatro cisteínas unidas a un ión de Zn²⁺; 3) una *región bisagra* encargada de unir a los dominios DBD y LBD, regular la unión al DNA, controlar la transferencia de AR del citoplasma hasta su sitio de acción en el núcleo (translocación nuclear) y la transactivación del AR; 4) un *dominio de unión al ligando C-terminal*, encargado de la unión al esteroide, dimerización y activación de la transcripción. Este dominio regula la interacción entre el AR y las proteínas de choque térmico (HSP) e interactúa con el dominio NTD del receptor para estabilizar la unión específica y de alta afinidad del andrógeno además de ser considerado como el sitio de unión para proteínas inhibitoras. Diversos factores como el de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1 (IGF-I) y la interleucina 6 (IL6) participan aumentando la actividad del AR a través de la fosforilación del mismo receptor o de sus correguladores como CoA mediando de esta manera su estabilidad (Davey & Grossmann, 2016) (Fig. 5).

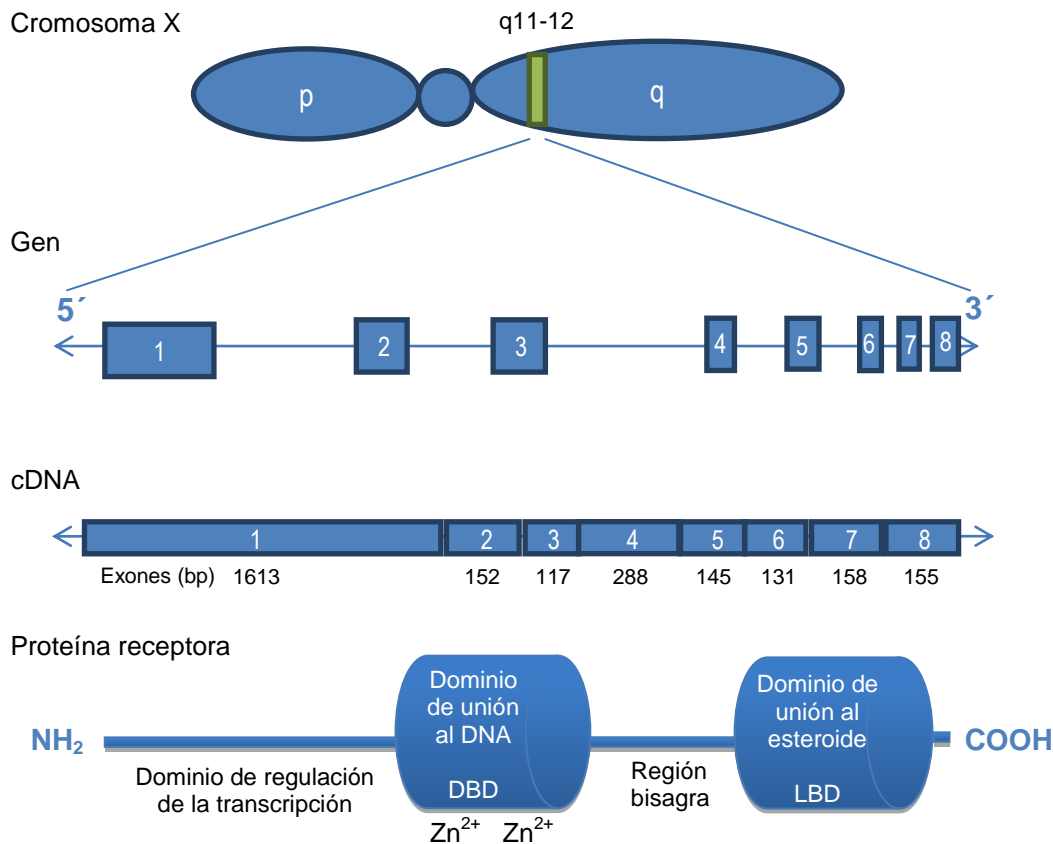


Fig. 5. Descripción estructural del gen *AR* o *NR3C4* de humano. El locus del gen *AR* se encuentra en el brazo largo (q) del cromosoma X. La estructura de la proteína de izq. a der. consta de un amino terminal, un dominio de regulación de la transcripción codificado por los exones 1 y 2, un dominio de unión al DNA codificado por el exón 3 con propiedades básicas que confieren la estabilidad de la interacción del receptor de DNA por contacto con el fosfato del mismo además de mediar la dimerización del receptor, la región bisagra codificada por el extremo 5' del exón 4 y el dominio de unión al esteroide codificado por el extremo 3' del exón 4 y los exones 5-8.

En el citoplasma, los dímeros del AR se encuentran inactivos debido a que están unidos a proteínas llamadas chaperonas, como las HSP90, HSP70, HSP56, HSP23, entre otras. Estas chaperonas impiden que se lleve a cabo la actividad transcripcional e inducen una conformación de alta afinidad para el esteroide T o DHT (Pratt et al., 2004; Rojas-Durán et al., 2011).

Cuando T o DHT se unen al AR este sufre un cambio conformacional, las chaperonas se disocian, el AR es fosforilado y translocado al núcleo. Una vez en el núcleo, el AR se une a secuencias específicas del DNA conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ARE) para llevar a cabo la transcripción (Fig. 6).

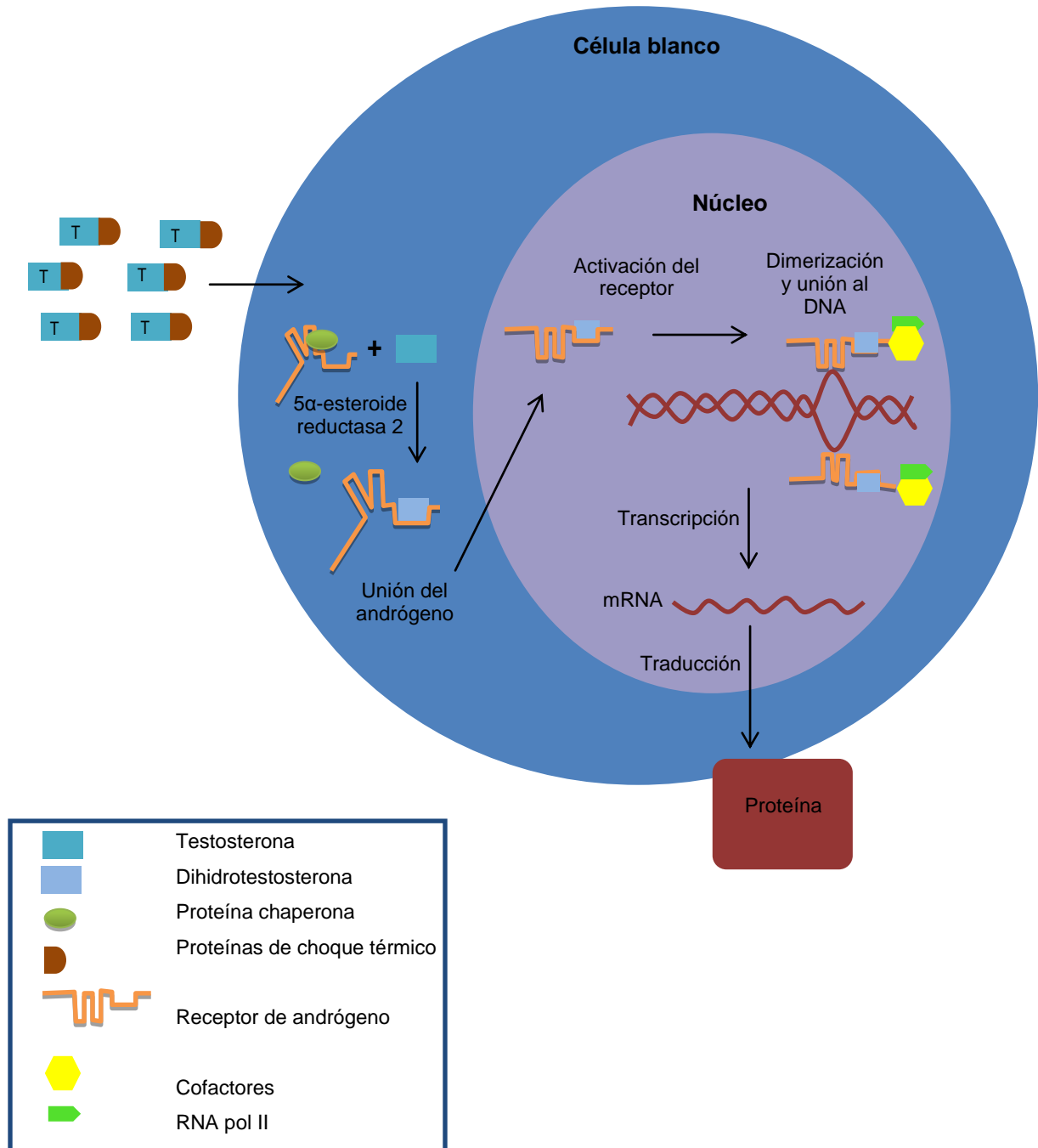


Fig. 6. Eventos moleculares que describen el mecanismo por el cual actúan los andrógenos y ejercen su efecto fisiológico.

El proceso de transcripción se puede dividir en las siguientes etapas: 1) ensamblaje del complejo de pre-iniciación en el promotor central; 2) inicio de la transcripción; 3) reconocimiento del promotor; 4) elongación y terminación (Tabla 4.) (Lee & Chang, 2003). De manera simultánea se lleva a cabo la traducción del mRNA que concluye con la síntesis de la proteína funcional, la cual ejerce el efecto androgénico en el organismo (Quigley et al., 1995).

Tabla 4. Factores generales de transcripción en célula de humano.

| Factor | Función |
|----------------------|--|
| TFIID TBP TAFs | Reconocimiento de secuencias TATA alrededor de -30 pb en el promotor. Regula actividad de TBP |
| TIIA | Interactúa con TBP, disocia reguladores negativos y estabiliza la unión TBP-DNA. |
| TIIB | Recluta complejo TFIIB-RNA Pol II en el promotor central y actúa como sitio de inicio de RNA Pol II. |
| TFIIF | Se asocia con la RNA Pol II y previene la RNA Pol II de interacciones no específicas con el DNA, lo que resulta en una interacción específica de la RNA Pol II en el promotor. |
| RNA Pol II | Funciones catalíticas en la síntesis de RNA y recluta TFIIE. |
| TFIIE | Recluta TFIIH y modula su actividad helicasa, ATPasa y cinasa. |
| TFIIH | Completa el ensamblaje de preiniciación en el promotor. |
| CAK | Fosforila el sitio CTD de RPB1 en RNA Pol II para la etapa de elongación. |
| Subunidades Core | Desenrolla la hélice del DNA mediante la helicasa y su actividad ATPasa. |

1.6 Desórdenes del Desarrollo Sexual

El correcto desarrollo sexual implica la activación secuencial de una serie de eventos en los que intervienen diversos factores de transcripción, moléculas de señalización y hormonas. Cuando ocurre una alteración o cambio dentro de esta cascada de señalización se tienen como consecuencia, en algunos casos, lo que se conoce como desórdenes del desarrollo sexual o DSD.

Los DSD están definidos como una condición congénita en la que el desarrollo cromosómico, gonadal o anatómico es atípico (Barbaro et al., 2011; Kim & Kim, 2012; Barseghyan et al., 2018). Estadísticamente esta condición afecta a 1 de cada 1000 individuos y puede ser identificada en diferentes etapas del desarrollo humano. En la mayoría de los casos se reconoce a los pacientes al momento del nacimiento debido a la observación de genitales ambiguos, disgenesia gonadal y genitales internos que no se relacionan con el sexo cromosómico, aunque no se descarta la posibilidad de que la condición sea detectada tiempo después debido a que los individuos presentan virilización postnatal, tumores gonadales, infertilidad y retraso o ausencia de la pubertad (Ostrer, 2014; Witchel, 2018).

Actualmente, los DSD son clasificados en 3 diferentes categorías (Tabla 5.): DSD cromosómicos, DSD 46,XY y DSD 46,XX (Hughes, 2008; Ostrer, 2014).

Tabla 5. Clasificación de los diferentes DSD's (Hughes, 2008).

| Aberraciones cromosómicas sexuales | DSD 46,XY | DSD 46,XX |
|---|--|---|
| A: Síndrome de Klinefelter (47,XXY) | A: Desórdenes del desarrollo gonadal (Testicular) | A: Desórdenes del desarrollo gonadal (Ovárico) |
| B: Síndrome de Turner (45,X) | 1. Disgenesia gonadal completa o parcial | 1. Disgenesia gonadal |
| C: Mosaicismo/disgenesia gonadal mixta (45,X/46,XY) | 2. DSD ovotesticular | 2. DSD ovotesticular |
| D: Quimerismo (46,XX/46,XY) | 3. Regresión gonadal | 3. DSD testicular |
| | B: Desórdenes en la síntesis o acción de andrógenos | B: Exceso en la producción de andrógenos |
| | 1. Desorden en la síntesis de andrógenos | 1. Fetal |
| | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mutaciones del receptor LH / HCG ▪ Mutaciones esteroideogénicas de la proteína reguladora aguda ▪ Síndrome Smith-Lemli-Opitz ▪ Mutaciones de escisión de la cadena lateral de colesterol (CYP11A1) ▪ Mutaciones en la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (HSD3B2) ▪ Mutaciones en la 17α-hidroxilasa /17, 20 liasa (CYP17A1) ▪ Mutaciones en la P450 oxidoreductasa (POR). ▪ Mutaciones en la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (HSD17B3) | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mutaciones en la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (HSD3B2) ▪ Mutaciones en 21-hidroxilasa (CYP21A2) ▪ Mutaciones en la P450 oxidoreductasa (POR) ▪ Mutaciones en 11β-hidroxilasa (CYP11B1) ▪ Mutaciones en el receptor de glucocorticoides |
| | | 2. Fetoplacental |
| | | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Deficiencia de la aromatasa (CYP19) ▪ Deficiencia de la oxido-reductasa |

| | | |
|--|--|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mutaciones en la 5α-reductasa tipo 2 (SRD5A2) <p>2. Desorden en la acción de andrógenos.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Síndrome de insensibilidad a los andrógenos. ▪ Drogas y moduladores ambientales <p>C: Otras</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Asociaciones sindrómicas del desarrollo genital masculino 2. Síndrome del conducto mulleriano persistente 3. Hipospadias aisladas 4. Hipogonadismo hipogonadotrópico congénito 5. Criptorquidia 6. Influencias medioambientales | <p>(POR)</p> <p>3. Maternal</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tumores virilizantes maternos ▪ Drogas androgénicas <p>C: Otras</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Asociaciones sindrómicas 2. Agenesia Mulleriana/ hipoplasia 3. Anormalidades uterinas. 4. Atresia vaginal |
|--|--|--|

Dentro de los DSD 46,XY existen 2 condiciones con alta incidencia mutacional como la *deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2* y el Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos (SIA). La deficiencia de la 5 α -reductasa se considera un desorden autosómico recesivo del desarrollo sexual masculino que se caracteriza por hipospadias perineoescrotal pseudovaginal y que se debe a diferentes mutaciones en su mayoría de tipo “*missense*” en el gen *SRD5A2* que codifica para la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 (Mendonca et al., 2017). En recién nacidos existe una

mayor dificultad para diagnosticar debido a que los niveles de T y DHT pueden presentarse en algunos casos normales, por lo que comúnmente se diagnostica con mayor facilidad en la infancia o al momento de inicio de la pubertad. Los varones afectados suelen tener anatomía externa femenina al nacer y al mismo tiempo presentan testículos bilaterales y tractos urogenitales masculinos normales en los cuales los conductos eyaculatorios finalizan en una vagina con terminación ciega. Este desorden explica algunos casos de varones con hipospadias aisladas o microfalos (Canto et al., 1997; Vilchis et al., 2000; Rusell & Wilson, 2014).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las alteraciones bioquímicas generadas por mutaciones en el gen *SRD5A2* han sido escasamente estudiadas, asimismo la identificación de dominios o sitios activos para la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 son desconocidos. Los pocos estudios sobre los dominios de la enzima provienen del análisis mutacional del gen. Lo antes mencionado sugiere ampliar los ensayos de mutagénesis y estructurales de la isoenzima con el objetivo de identificar aminoácidos funcionales en los sitios activos de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2.

3. HIPÓTESIS

Mutaciones puntuales en la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 pueden alterar las constantes cinéticas K_m y V_{max} .

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de diferentes mutaciones puntuales sobre las propiedades cinéticas de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar ensayos de transfección para cada mutante en células HEK293, con la finalidad de determinar la K_m y V_{max} comparada con la tipo silvestre.

Utilizar programas bioinformáticos para predecir la patogenicidad de cada mutante estudiada en la 5 α -esteroide reductasa tipo 2.

5. METODOLOGÍA

5.1 Preparación de células para transfección

En esta investigación se utilizó como modelo de estudio la línea celular HEK293 (células embrionarias de riñón humano). Las células se descongelaron, se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL y se adicionó 1 mL de medio completo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el cual incluye Suero Fetal Bovino (SFT) al 10% y como antibióticos, Penicilina-Estreptomicina al 1%. A continuación se centrifugó el tubo Falcon a 1000 xg durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular adicionando 2 mL de medio DMEM completo. Lo anterior fue decantado a una botella de cultivo celular con cuello inclinado de 25 cm² especialmente tratada para cultivo de tejidos y se llevó a un volumen total de 5 mL con el mismo medio. El frasco se observó al microscopio (objetivo 40X) para corroborar la presencia y viabilidad. Las células se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta que se obtuvo una confluencia del 80-90%.

Posteriormente se observaron al microscopio para confirmar la adherencia de las células a la pared del frasco de cultivo celular y se prosiguió a subcultivarlas. Para ello se retiró el medio por un costado del frasco, se realizó un lavado añadiendo cuidadosamente 5 mL de solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) que después se retiró suavemente. Se agregó 1 mL de tripsina para despegar a las células (este proceso se realizó en máximo 1 min para no poner en riesgo la viabilidad de las células) e inmediatamente se colocan 5 mL de medio DMEM completo para llevar a cabo la inactivación de la tripsina.

Las células se colocaron en un frasco de cultivo celular de mayor tamaño (75 cm²) y este se llevó a un volumen final de 12 mL de igual manera con medio DMEM completo y nuevamente fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ hasta volver a lograr una confluencia de 80%.

Para preparar las células para transfección, primero se les retiró el medio, se lavaron con 5 mL de PBS, se retiró y se agregaron 2 mL de tripsina debido a que hay mayor cantidad de células adheridas, esta última se inactivó con 6 mL de medio DMEM-SFT sin antibióticos. Posteriormente, se realizó la cuantificación de las células en una cámara de Neubauer con el objetivo de tener un promedio de 600,000 células en cada pozo de la caja de cultivo celular que se utilizó. Las cajas que se utilizaron en este experimento son de 6 pozos cada una y son de poliestireno, estériles y no pirogénicas. Una vez colocado el volumen adecuado de células en los pozos, se adicionó medio DMEM-SFT hasta llegar a un volumen final de 2 mL en cada uno y se incubaron por 24 h.

| Reactivo | Casa comercial | Matriz |
|--|---|----------------------------|
| Medio completo modificado por Dulbecco (DMEM) | Caissonlabs | Smithfield, Utah, USA |
| Suero fetal Bovino (SF) | Thermo Scientific | Logan, Utah, USA |
| Penicilina- Estreptomina | Gibco® by life technologies corporation | Gran Island, New York, USA |
| Solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) | Sigma-Aldrich® Co. | St. Louis, Missouri, USA |
| Tripsina | Gibco® by life technologies corporation | Gran Island, New York, USA |

5.2 Transfección células-plásmido.

En un tubo eppendorf de 0.6 mL se realizó una mezcla en donde se adicionaron 100 μ L de medio DMEM sin SFT ni antibióticos, 6 μ L de reactivo FuGENE[®]HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y 2 μ L de cDNA (2 μ g/ μ L) (Tabla 6). Se homogenizó e incubó a temperatura ambiente (TA) durante 15 min, posteriormente se adicionaron 108 μ L de la mezcla FuGENE-DNA a cada pozo. Se homogenizó teniendo cuidado para evitar desprendimiento de las células y se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 24 h adicionales. Para llevar a cabo este experimento se utilizó el vector de clonación pCMV6-XL4 (Fig. 7.), que contiene el cDNA para la SRD5A2 humana y que fue previamente transfectado en células HEK293.

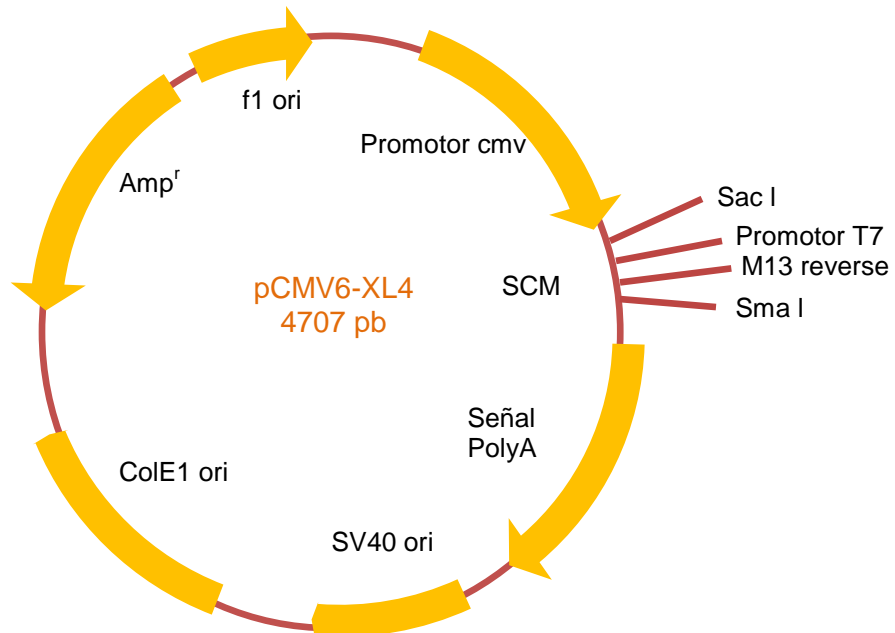


Fig. 7. Representación esquemática del vector de clonación utilizado para el proceso de transfección. Se observan los sitios importantes para su correcto funcionamiento. SCM = sitio de clonación múltiple.

Tabla 6. Para la transfección célula-plásmido se utilizó cDNA de las variantes génicas de SRD5A2 descritas a continuación.

| Exón | Cambio de base | Variante |
|--------|----------------|--------------|
| — | — | Sin plásmido |
| Exón 1 | 265C | L89 (WT) |
| Exón 1 | c.40A>C | p.S14R |
| Exón 2 | c.354C>A | p.F118L |
| Exón 2 | c.433C>T | p.R145L |
| Exón 4 | c.635C>G | p.P212R |

| Reactivo | Casa comercial | Matriz |
|---------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| FuGENE® HD Transfection Reagent | Roche® | Basilea, Suiza |
| Vector de clonación pCMV6-XL4 | OriGene Technologies, Inc. | Rockville, Maryland, USA |

5.3 Actividad de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2

Veinticuatro horas previas a realizar el experimento, en 6 tubos de vidrio de 12 x 75 mm, se añadieron concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 μ M de T y un volumen de T-[3 H] [actividad específica (ae) 95.5 Ci/mmol] equivalente a 400,000 desintegraciones por minuto (dpm) a cada tubo respectivamente, por triplicado y se dejaron a TA durante 24 h para evaporar el etanol en el que están contenidos.

A las células transfectadas y con extremo cuidado se les retiró el medio, se agregó 1 mL de PBS, se retiró la solución amortiguadora y las células obtenidas se colocaron en tubos Falcon de 15 mL. Se agregó nuevamente 1 mL de PBS para asegurarnos que se obtuvo la mayor cantidad de células y posteriormente se centrifugaron a 1000 xg durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y el precipitado

celular se resuspendió añadiendo 1 mL PBS manteniendo los tubos en hielo durante el procedimiento. Se llevó a cabo la lisis celular utilizando un sonicador (Ultrasonic Processor) a 37% de amplitud durante un periodo de 5 segundos y por triplicado a cada tubo. Posteriormente en los tubos cónicos que contenían T y T- ^{3}H], adicionalmente se les agregaron 100 μL de amortiguador Tris-citrato a $\text{pH}=5.5$ (TC), 90 μL del lisado celular y 0.5 μM de NADPH utilizado como cofactor. La mezcla anterior se homogeneizó por vortex durante 3 s y se incubó a 37°C en baño maría y con agitación por 15 min.

| Reactivo | Casa comercial | Matriz |
|--|--------------------------------|---------------------------|
| Testosterona | STERALOIDS INC. | Wilton, Connecticut, USA |
| T- ^{3}H] | Perkin Elmer [®] | Boston Massachusetts, USA |
| Solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) | Sigma-Aldrich [®] Co. | St. Louis, Missouri, USA |
| Amortiguador Tris-Citrato | AMRESCO [®] | Solon, Ohio, USA |
| NADPH | Sigma-Aldrich [®] Co. | St. Louis, Missouri, USA |

5.4 Extracción del esteroide

Finalizada la incubación, a cada tubo se le adicionó 1 mL de acetato de etilo saturado, se mezcló por vortex durante 1 min y una vez concluidos todos los tubos se procedió a centrifugarlos a 1000 xg durante 5 min a TA. Concluida la centrifugación, se obtuvo la fase orgánica de cada uno y se colocaron en tubos cónicos (realizando procedimiento por triplicado). Posteriormente se evaporaron los tubos cónicos con N_2 y finalmente el esteroide se resuspendió adicionando 500 μL de metanol. En diferentes viales se adicionaron 5 mL de líquido de centelleo y 10 μL del esteroide contenido en los tubos cónicos. Los viales se homogeneizaron por vortex durante 10 s para después ser colocados en un contador de líquido de

centelleo 1900 TR PACKARD. Una vez obtenidos los resultados, se realizaron los cálculos para obtener el volumen correspondiente de esteroide a 100,000 dpm. En diferentes tubos cónicos de vidrio se adicionaron 50 μ L de solución que contenía la mezcla de acarreadores (mezcla que contiene los siguientes andrógenos: 3 α y 3 β -androstadiol, T, Δ^4 -androstendiona, DHT y 5 α -androstendiona) y de igual forma el volumen de esteroide calculado anteriormente para después dejar evaporando los tubos durante 24 h a TA.

| Reactivo | Casa comercial | Matriz |
|--------------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 3 α y 3 β -androstadiol | STERALOIDS INC. | Wilton, Connecticut, USA |
| Δ^4 -androstendiona | | |
| 5 α -androstendiona | | |
| Líquido de centelleo | MP Biomedicals® LLC | Solon, Ohio |

5.5 Cromatografía en capa fina

Concluida la evaporación se agregaron 6 gotas de solución 1:1 (v:v) de cloroformo:etanol a cada tubo. Las muestras se aplicaron en los lugares correspondientes de una cromatoplaque de sílica gel 60 dividida en 9 columnas de 18 mm, utilizada como fase estacionaria, para después procederla a introducir en el sistema de elución A conteniendo como fase móvil 196 mL de cloroformo y 5 mL de metanol, el tiempo necesario para que la cromatoplaque se encuentre totalmente cubierta. Concluido este tiempo se prosiguió a introducir la cromatoplaque en el sistema de elución B conteniendo 180 mL de cloroformo y 20 mL de éter anhidro (ambos sistemas se encontraban saturados previamente a su utilización).

Posteriormente se confirmó la presencia de DHT revelando la cromatoplaque con una solución que contenía 50 mL de ácido acético, 1 mL de ácido sulfúrico y 0.5 mL de paranisaldehído (preparada en el momento en el cual se va a utilizar) y posteriormente aplicando calor a la misma utilizando una parrilla de calentamiento. En el cromatofolio se observaron los esteroides mediante coloraciones y corrimientos diferentes que correspondieron a cada andrógeno colocado previamente. Se recortaron los diferentes fragmentos que se obtuvieron y cada fragmento fue colocado en un vial de manera independiente y perfectamente etiquetado. A cada vial se le adicionó 1 mL de etanol, se mezcló por vortex y se agregaron 5 mL de líquido de centelleo, nuevamente se mezcló y una vez concluidos todos los viales, se cuantificaron en el contador de líquido de centelleo. Los resultados obtenidos (dpm totales) fueron tratados para conocer la cantidad exacta de T-[³H] que fue transformada a DHT-[³H].

| Reactivo | Casa comercial | Matriz |
|-----------------------------------|----------------|---------------------|
| Cromatoplaque de sílica gel 60 | Merck KGaA | Darmstadt, Alemania |

5.6 Cuantificación de proteínas

Se prepararon 50 mL de etanol al 95%. Se pesaron 50 mg de azul de Coomassie y se disolvieron en un vaso de precipitado de 250 mL con 25 mL de etanol previamente preparado. La disolución se colocó en un matraz aforado de 500 mL, se adicionaron 50 mL de ácido fosfórico y se llevó al aforo con ddH₂O. Para determinar la curva estándar en 5 tubos de vidrio de 25 X 150 mm, se adicionaron 100 µL de solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a

diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75 y 100 µg/ mL respectivamente) por triplicado. Posteriormente, a 18 tubos diferentes de 25 X 150 mm, se agregaron 100 µL de muestra de proteínas totales igualmente por triplicado. Una vez concluido, se agregaron 5 mL de solución azul de Coomassie previamente preparada a todos los tubos y aplicar vortex durante 10 s. Para finalizar se procedió a cuantificar espectrofotométricamente las muestras tanto de la curva estándar como de las muestras problema y los resultados fueron tratados para su posterior análisis.

| Reactivo | Casa comercial | Matriz |
|---|--------------------|--------------------------|
| Azul de Coomassie | Sigma-Aldrich® Co. | St. Louis, Missouri, USA |
| Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) | | |

6. RESULTADOS

La determinación del efecto de diferentes mutaciones puntuales sobre la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 se inició con los ensayos de transfección del cDNA tipo silvestre [wild type (WT); L89] y de diferentes mutantes (p.S14R, p.F118L y p.R145L). Como control negativo en este experimento se utilizó la mutante p.P212R, ya que se ha demostrado que la posición 212 abate notablemente la actividad de la enzima; asimismo, como un control interno fueron utilizadas células sin plásmido o sin transfectar (S/P) con la finalidad de cuantificar la actividad de la enzima y para los cuales se cultivó la línea celular HEK293 (Fig. 8).

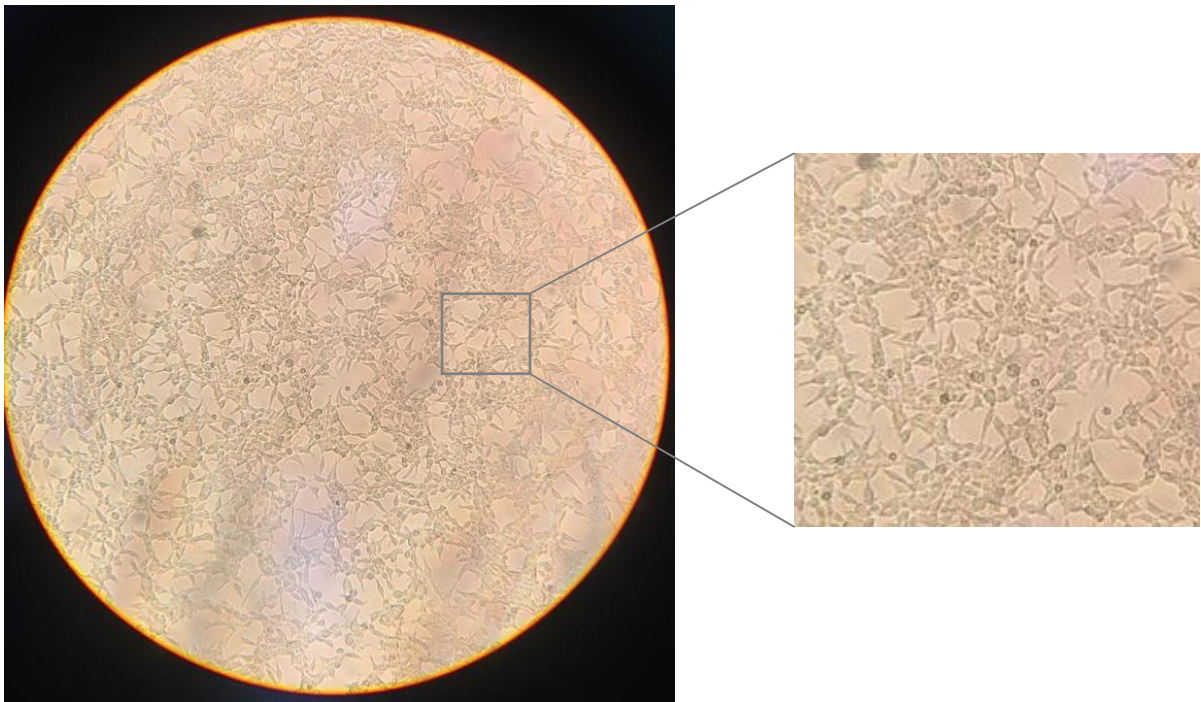


Fig. 8. Imagen representativa del medio de cultivo celular HEK293 utilizado para transfectar el vector de clonación pCMV6-XL4-WT y pCMV6-XL4-mutado. Objetivo utilizado 40X; microscopio ZEISS, Germany.

Previamente, se han encontrado pacientes cuyo desarrollo anatómico sexual concuerda con las diversas características físicas que manifiestan los DSD por lo que se tomaron muestras de sangre periférica de los mismos. Posteriormente se extrajo el gDNA de los leucocitos utilizando la técnica sacarosa-tritón, se realizaron ensayos de PCR en donde se amplificaron las regiones codificantes del gen y por medio de la técnica SSCP se observó que existen diversas alteraciones debido a que en los geles se observaban patrones de migración diferentes a los de los grupos control, revelando así 3 alteraciones genéticas distintas (p.S14R, p.F118L y p.R145L). Posteriormente, mediante un análisis de secuenciación se confirmaron las secuencias mutantes de *SRD5A2* y se realizó mutagénesis utilizando el kit QuickChange Lightning Site-Directed (Datos no presentados).

Para establecer las constantes cinéticas K_m y V_{max} , así como caracterizar la actividad de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2, se llevó a cabo la extracción y separación de los esteroides formados a partir de la línea celular HEK293 mediante una cromatografía en capa fina en la cual, después de eluir la cromatoplaaca tanto en la fase A como en la fase B, fue revelada con la solución de ácido sulfúrico previamente mencionada y a la cual se le aplicó calor hasta que se observaron los diferentes esteroides formados mediante diversas coloraciones y corrimientos los cuales corresponden a cada andrógeno colocado previamente (Fig. 9).

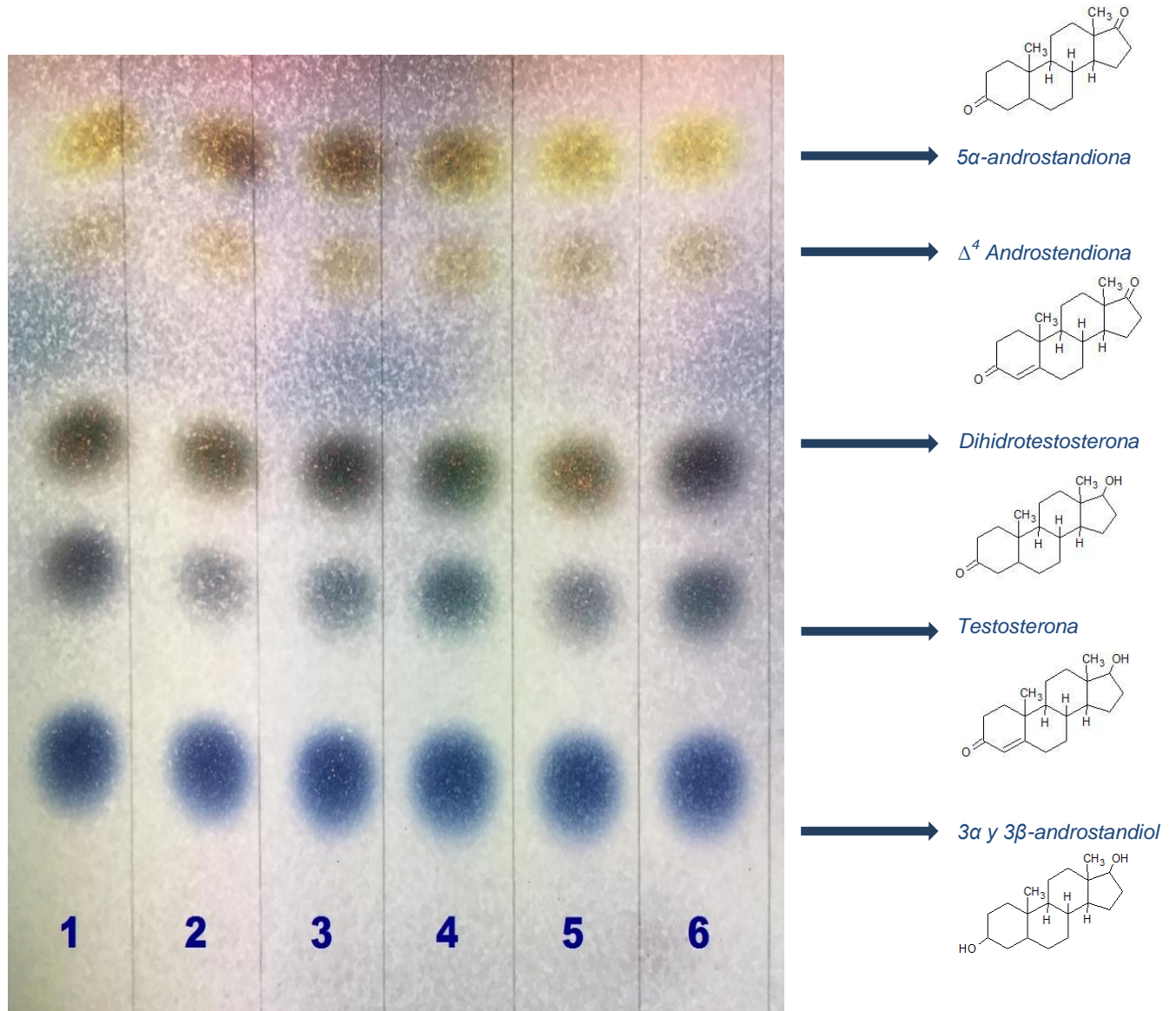


Fig. 9. Cromatografía en capa fina de la extracción de esteroides. Prueba cualitativa en donde cada esteroide está representado por una posición específica de movilidad en la cromatopla. Se presenta una cromatopla representativa de 3 réplicas biológicas (n=3), los números inferiores en la imagen representan las concentraciones crecientes de T (1=0.25, 2=0.5, 3=1.0, 4=2.0, 5=4.0, 6=8.0 μ M).

Estudios previos (Vilchis et al., 2010) han reportado que la mayor actividad de T se presenta a una concentración de 4 μM por lo que en el presente experimento se elaboraron diversas gráficas de andrógeno formado (pmol) por miligramo de proteína (mg P) por hora (h) con respecto a cada esteroide obtenido con la finalidad de comprobar que la actividad se llevara a cabo de manera correcta (Figs. 10-13).

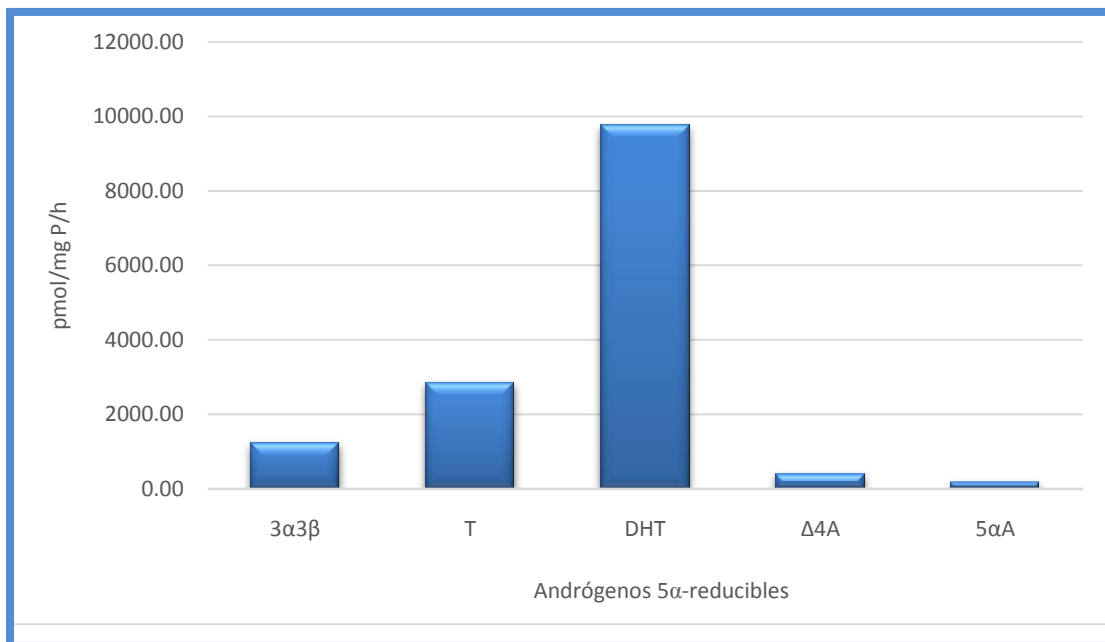


Fig. 10. Actividad *in vitro* de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2. Se cultivó la línea celular HEK293 transfectada con el cDNA WT (L89) utilizado como control positivo. Se obtuvieron los extractos correspondientes para determinar los andrógenos que se indican a una concentración 4 μM de T. Nota: (3 α ,3 β : 3 α ,3 β -androstadiol, T: testosterona, DHT: dihidrotestosterona, Δ^4 A: Δ^4 -androstendiona y 5 α A: 5 α -androstendiona) (n=3).

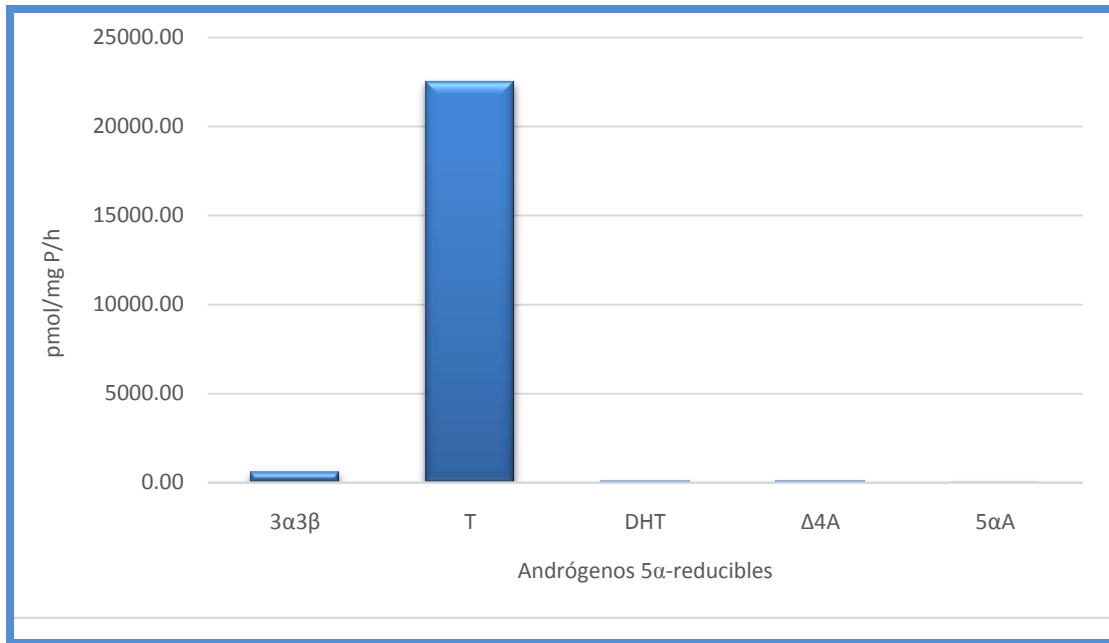


Fig.11. Actividad *in vitro* de la enzima 5α-esteroide reductasa tipo 2. Se cultivó la línea celular HEK293 transfectada con el cDNA mutado **p.S14R**. Se obtuvieron los extractos correspondientes para determinar los andrógenos que se indican a una concentración 4 μM de T. *Nota:* (3α,3β: 3α,3β-androstandiol, T: testosterona, DHT: dihidrotestosterona, Δ⁴A: Δ⁴-androstandiona y 5αA: 5α-androstandiona) (n=3).

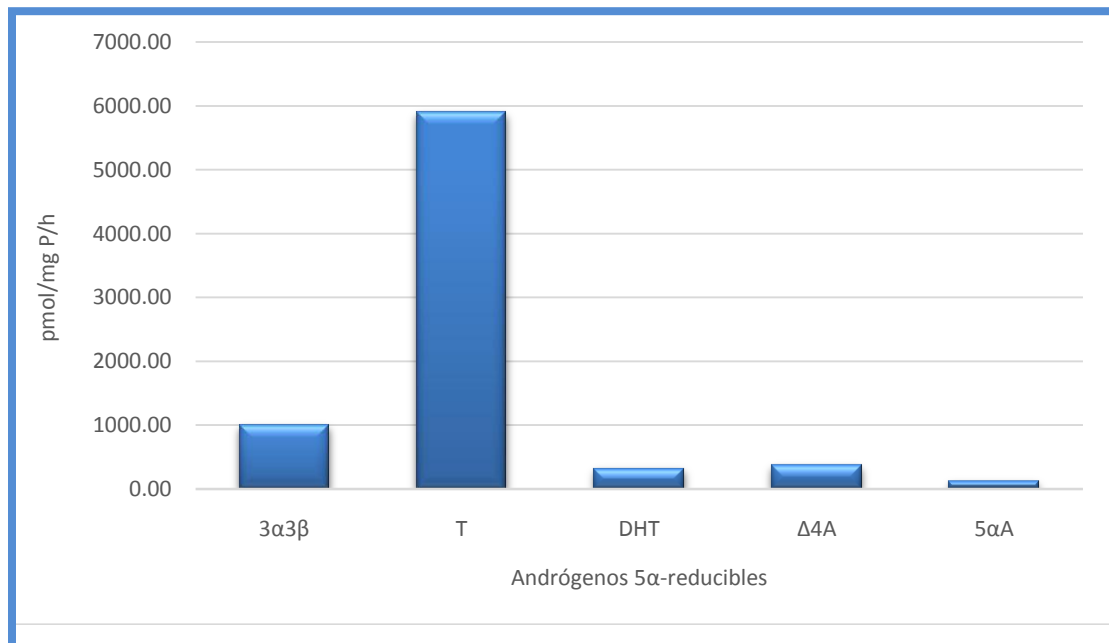


Fig.12. Actividad *in vitro* de la enzima 5α-esteroide reductasa tipo 2. Se cultivó la línea celular HEK293 transfectada con el cDNA mutado **p.R145L**. Se obtuvieron los extractos correspondientes para determinar los andrógenos que se indican a una concentración 4 μM de T. *Nota:* (3α,3β: 3α,3β-androstandiol, T: testosterona, DHT: dihidrotestosterona, Δ⁴A: Δ⁴-androstandiona y 5αA: 5α-androstandiona) (n=3).

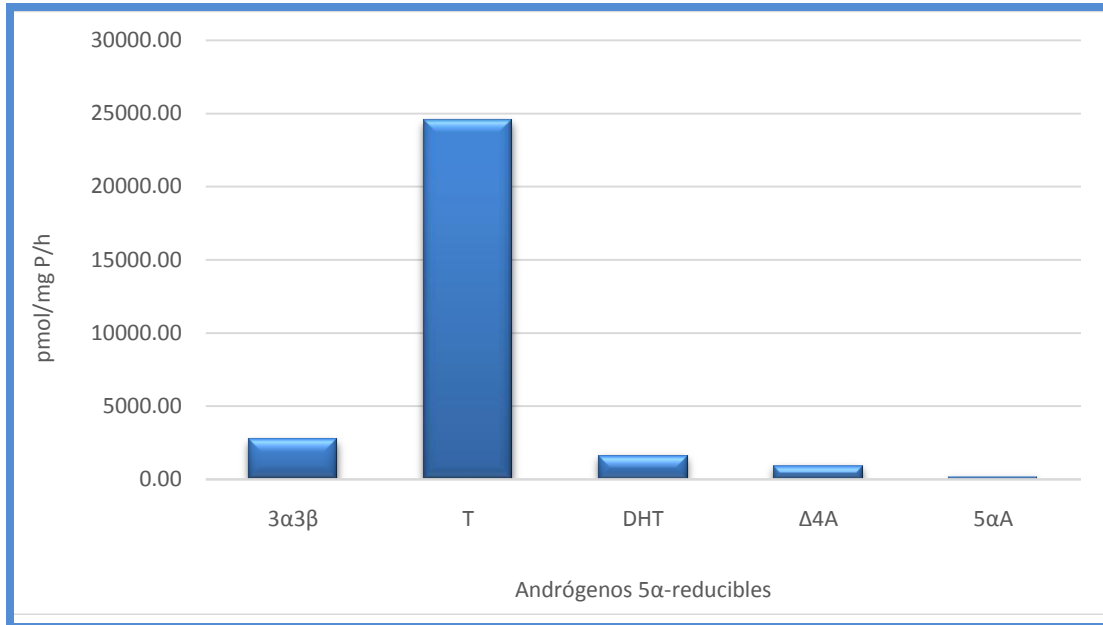


Fig. 13. Actividad *in vitro* de la enzima 5α-esteroide reductasa tipo 2. Se cultivó la línea celular HEK293 transfectada con el cDNA mutado **p.F118L**. Se obtuvieron los extractos correspondientes para determinar los andrógenos que se indican a una concentración 4 μM de T. Nota: (3α,3β: 3α,3β-androstandiol, T: testosterona, DHT: dihidrotestosterona, Δ⁴A: Δ⁴-androstandiona y 5αA: 5α-androstandiona) (n=3).

Las constantes cinéticas K_m y V_{max} de una enzima son de gran importancia debido a que nos proporcionan una idea de la afinidad que tiene una enzima por un determinado sustrato y el máximo de la velocidad con la que esta se une al sustrato. En este proyecto la enzima 5α-esteroide reductasa tipo 2 de tipo WT nos permitió comparar y reconocer las consecuencias bioquímicas de las mutaciones sin sentido (p.S14R, p.F118L y p.R145L) previamente descritas en pacientes diagnosticados clínicamente con deficiencia de 5α-reductasa tipo 2. Las propiedades cinéticas de las mutantes así como de las enzimas utilizadas como controles positivos (L89) y negativos (p.P212R) se obtuvieron a partir de la gráfica en la Fig. 14 y con ayuda del programa GraphPad Prism mediante el método de regresión no lineal.

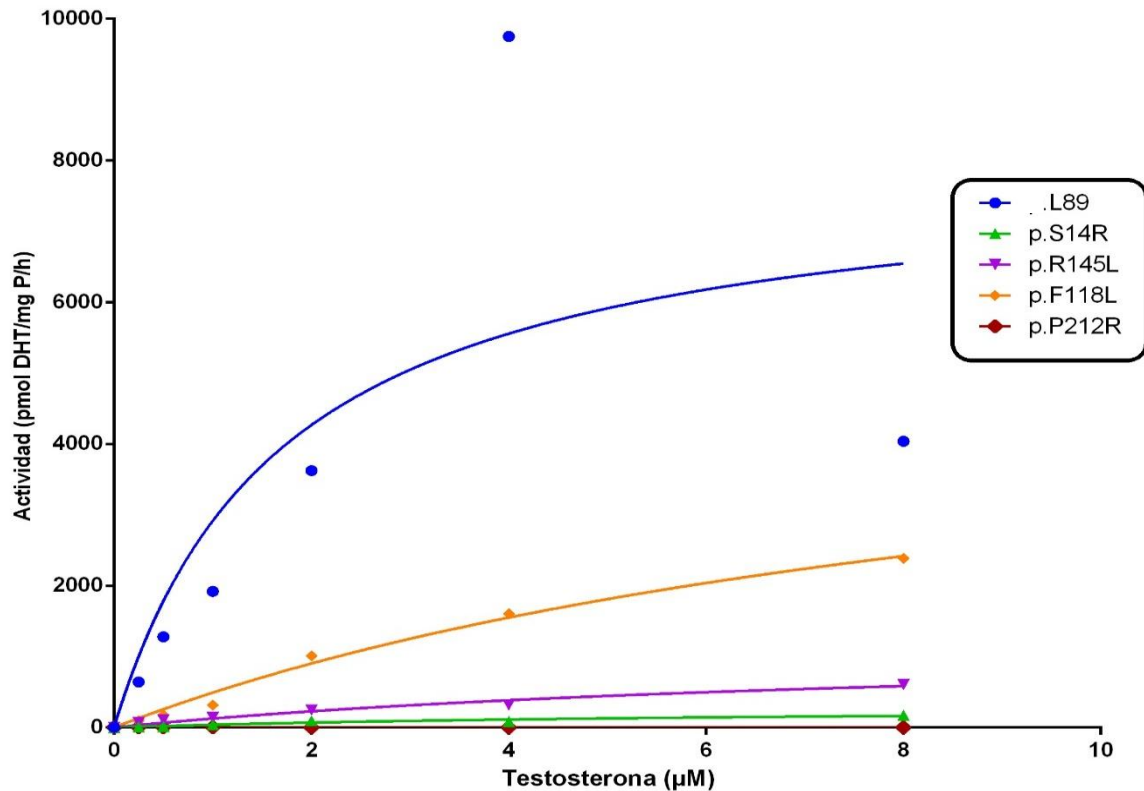


Fig. 14. Actividad de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 expresada en células HEK293 a concentraciones crecientes (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 μ M) de T marcada radiactivamente. Las curvas de saturación de las 3 variantes génicas así como de la WT se determinaron midiendo la conversión cuantitativa de T a DHT (n=3).

En estudios en los que se lleva a cabo la obtención de estas constantes es de gran importancia además, conocer la eficiencia con la que el sustrato se convierte en producto en determinado tiempo, a esto se le conoce como constante catalítica o número de recambio (K_{cat}), el cual de igual manera se obtuvo como resultado al hacer la relación de los valores de V_{max} obtenidos entre las constantes de afinidad correspondientes al control positivo y a cada mutante analizada (Tabla 7.) Con los resultados obtenidos es difícil establecer cuantitativamente la actividad de la enzima, por tanto, se debe ser muy cauteloso en mencionar los parámetros cinéticos.

Tabla 7. Propiedades cinéticas de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2.

| Gen | Variante génica | K_m (μM) | V_{max} (pmol/mgP/h) | K_{cat} ($\text{pmol mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$ $^1\mu\text{M}^{-1} \text{T}^{-1}$) |
|---------------|-----------------|----------------------------|--------------------------------------|--|
| SRD5A2 | L89 | 0.73 | 7963 | 4597.58 |
| | p.S14R | 7.03 | 308.2 | 43.86 |
| | p.F118L | 10.16 | 5489 | 540.26 |
| | p.R145L | 8.69 | 1218 | 140.19 |
| | p.P212R | ND | ND | ND |

*(ND) No determinado

De las variantes analizadas durante este estudio encontradas en el gen que codifica para la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2, se predijo la patogenicidad de cada una mediante 3 diversos programas bioinformáticos. Estos programas se basan en información documentada de la variante que se analiza, se cotejan en diferentes bases de datos específicas e identifican los cambios que ya se encuentran documentados. Tal como se observa en la Tabla 8., el programa SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu>) clasificólas 3 variantes como *perjudiciales*. De las variantes analizadas por el Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu>), las 3 mutaciones fueron consideradas como *probablemente dañinas*, mientras que analizadas por el programa Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>), p.S14R se considera como *neutral* y 2 de ellas (p.F118L y p.R145L) como *perjudiciales*.

Tabla 8. Clasificación de la patogenicidad de las diferentes mutantes descritas a lo largo de este estudio encontradas en el gen *SRD5A2*.

| Gen | Exón | Variante | Cambio de base | Polyphen | Provean | SIFT |
|---------------|--------|----------|----------------|----------------------|-------------|-------------|
| SRD5A2 | Exón 1 | p.S14R | c.40A>C | Probablemente dañina | Neutral | Perjudicial |
| | Exón 2 | p.F118L | c.354C>A | Probablemente dañina | Perjudicial | Perjudicial |
| | Exón 2 | p.R145L | c.433C>T | Probablemente dañina | Perjudicial | Perjudicial |

7. DISCUSIÓN

La actividad catalizada por la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 es de suma importancia debido a la enorme contribución que ejerce la conversión de T a DHT antes del nacimiento y para efectuar el correcto desarrollo de los genitales externos (uretra, falo, escroto y glándula prostática) por acción de DHT en individuos XY. Se ha sugerido que la actividad de la enzima *SRD5A2* podría estar involucrada en varias alteraciones endócrinas tales como la hipertrofia prostática benigna, hirsutismo femenino, en la alopecia en su mayoría en individuos masculinos y posiblemente tenga una gran implicación en el cáncer de próstata cuando existen niveles elevados de DHT como consecuencia del aumento en la actividad de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 (Giwerzman et al., 2005). Para ello, se han desarrollado diversos tratamientos con finasterida, fármaco que actúa como inhibidor de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 evidenciando una disminución significativa en la tasa de aparición de cáncer de próstata lo cual sugiere que este inhibidor previene o retrasa la aparición de la enfermedad (Makridakis et al., 2004).

En diversos estudios se ha demostrado que la falta de función o ausencia de la enzima resulta en la disminución de los niveles de concentración adecuada de DHT lo que conlleva a un cuadro clínico denominado deficiencia de 5 α -esteroide reductasa tipo 2, clasificada como un DSD 46,XY. Esta alteración se considera un desorden genético autosómico recesivo y se debe a diversas mutaciones específicas en el gen *SRD5A2*. La anomalía congénita está caracterizada por una diferenciación incompleta de los genitales en individuos con genotipo 46,XY y

clínicamente presentan estructuras reproductivas masculinas internas pero con estructuras femeninas externas.

En la actualidad, se han descrito más de 100 mutaciones diferentes del gen *SRD5A2* a lo largo de los 5 exones que lo componen, estas se basan principalmente en sustituciones de un único nucleótido o de sentido erróneo, mutaciones sin sentido y deleciones. La variabilidad en la expresión fenotípica depende del tipo de mutación y su efecto sobre la actividad enzimática, así mismo diversos estudios han descrito que aproximadamente el 60% de los casos descritos son considerados homocigotos mientras que el otro porcentaje restante es identificado como heterocigotos y heterocigotos compuestos (Andersson et al, 1991; Wilson et al, 1993; Boudon³ et al, 1995; Vilchis et al., 2008; Maimoun et al, 2010). No obstante, para la amplia cantidad de mutaciones descritas a la fecha, los estudios de cinética enzimática han sido descritos en menos del 15% de los trabajos reportados.

En este proyecto se realizaron los estudios de cinética enzimática para la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 a partir de mutaciones descritas en nuestro laboratorio. Los primeros resultados obtenidos comprueban que la actividad de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 en cada mutante (p.S14R, p.F118L y p.R145L) se encontraba disminuida. Para las 3 mutaciones génicas, se observó que la concentración de T en la célula fue mayor que la concentración de DHT en comparación con la enzima WT (L89).

Estos resultados obtenidos evidencian una probable alteración relacionada con la manifestación clínica y concuerdan con lo informado en diversos artículos (Wigley et al., 1994; Makridakis et al., 2004; Nicoletti et al., 2005; Maimoun et al., 2010), los cuales mencionan que en presencia de diversas mutaciones, la actividad de la enzima disminuye en comparación con la WT, aunque es necesario resaltar que no todas las alteraciones génicas en *SRD5A2* que expresan deficiencia de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 tienen como consecuencia bioquímica la disminución de la expresión de la enzima. Se ha demostrado que mutaciones en una sola base como p.A49T, p.I161L o p.G183S, aumentan significativamente la actividad de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 en comparación con la alteración de tipo silvestre (Vilchis et al., 2008), lo que de igual manera puede desencadenar diversas manifestaciones clínicas.

Las actividades enzimáticas de las diferentes variantes (p.S14R, p.F118L y p.R145L) así como de los utilizados como grupo control (L89 y p.P212R) ya sea en estado homocigoto o heterocigoto, se evaluaron realizando los diferentes ensayos de transfección y los estudios de 5 α -esteroide reductasa tipo 2 con lo cual se obtuvieron los resultados descritos en la Fig. 14.

A lo largo de esta investigación se empleó como grupo control a la variante polimórfica L89 ubicada en la región codificante del exón 1 de *SRD5A2*. Se ha demostrado que L89 se considera como un polimorfismo silencioso debido a que se tiene evidencia de que no altera el desarrollo fenotípico en humanos y se encuentra en alta frecuencia en la población (Vilchis et al., 2008). Todas las

variantes analizadas durante este proyecto se secuenciaron previamente para corroborar las secuencias mutantes en *SRD5A2* (datos no presentados).

Como control negativo durante este trabajo se utilizó la mutante p.P212R. En la actualidad se ha descrito esta variante solo en pacientes con un origen étnico mexicano-mestizo, lo que indica la prevalencia de esta alteración por este grupo étnico en particular. En la mutante p.P212R se modifica un aminoácido que se encuentra altamente conservado en diferentes especies animales (bovino, cerdo, perro, rata y ratón), lo que sugiere que el residuo de prolina ubicada en la posición 212 de la proteína es esencial para la adecuada actividad enzimática. En la investigación de Vilchis et al. realizada en el año 2008, se confirmó mediante experimentos de mutagénesis, que la enzima mutante (212R) comparada con la enzima WT (P212) presentaba una reducción de la actividad enzimática en aproximadamente el 60% de los pacientes analizados. Al respecto de la mutante 212, existe evidencia de que casi todas las variantes génicas localizadas entre los codones 197 y 230 dentro del exón 4 tienen como consecuencia la completa inactivación de la enzima (Wilson et al., 1993; Vilchis et al., 2008). Aunado a esto, los residuos 206-226 codifican una región de 21 aminoácidos que constituyen 1 de los 4 dominios transmembranales de la enzima, por tanto, la recurrencia de una mutación en este sitio demuestra la importancia del cuarto dominio transmembranal como región clave para el correcto funcionamiento de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2.

Las tres diferentes alteraciones examinadas durante este proyecto se caracterizaron mediante análisis funcionales *in vitro*. La mutante p.F118L consiste en una transversión de C por A en el nucleótido 354 lo que conduce a un cambio de fenilalanina por leucina. Este cambio origina la pérdida del grupo aromático de la fenilalanina y que se presente ahora la cadena no polar de leucina, siendo una pérdida importante que pueda estar implicada en la unión del complejo enzima-sustrato. La variante p.F118L presenta una pérdida parcial de la actividad (V_{max} 5489 pmol/mg P/h) de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 (30 por ciento menos de actividad) en comparación con la de la enzima WT (V_{max} 7963 pmol/mg P/h). Nuestros datos son consistentes con los informados previamente por Makridakis et al. en el año 2004 ya que demostraron que la modificación en la actividad (V_{max}) de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 mutada en el nucleótido 118 resulta en alteraciones comparadas con la WT. Asimismo, evidenciaron que cambios en la actividad inducen cambios en el valor de K_m ya sea para T, para el cofactor NADPH o para ambas. Como se conoce, entre mayor sea el valor de K_m menor es la afinidad que presentará la enzima por el sustrato o el cofactor. La variante p.F118L presenta un valor de K_m incrementado al igual que en los datos informados por Makridakis et al. y un valor 88% menor de K_{cat} en comparación con la de la WT. Los estudios *in silico* fueron conclusivos en cuanto a esta alteración y se catalogó a la variante p.F118L como perjudicial o probablemente dañina, por tanto la mutación afecta gravemente la función de la proteína, lo que facilita una variante que cause la enfermedad. Estos resultados podrían sugerir que la variante p.F118L tiene alterada la configuración estructural de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2, imposibilitando así que exista la unión con el sustrato T y poniendo en evidencia

que el aminoácido 118 fenilalanina, es de suma importancia para la unión del sustrato.

La segunda variante analizada p.R145L consiste en una transición en el nucleótido 433 de C por T y en el cambio del residuo de arginina (un aminoácido polar con carga positiva conferida por el grupo guanidino de su cadena lateral) por leucina (aminoácido de cadena ramificada y polar sin carga). Los resultados del análisis funcional *in vitro* para p.R145L evidenciaron la pérdida casi total (V_{\max} 1218 pmol/mg P/h) de la actividad de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 (85 por ciento menos de actividad) en comparación con la de tipo silvestre (V_{\max} 7963 pmol/mg P/h). El valor de K_m de la mutante se incrementó respecto al valor de la WT, por consiguiente la afinidad por el sustrato T estuvo reducido. De igual manera, se demostró una disminución considerable en el valor de K_{cat} con una pérdida de aproximadamente el 97%. El análisis *in silico* realizado por los tres programas bioinformáticos determinó que esta mutación afectaba completamente la función de la proteína y por lo que se propone que se considere como un factor de origen de la enfermedad. En consecuencia, la expresión fenotípica anormal que presentan individuos con esta alteración puede ser conferida a que p.R145L inactiva la actividad enzimática de 5 α -reducción. En diversos estudios se ha demostrado que esta variación se encuentra expresada en individuos de diferente población alrededor del mundo. Se han encontrado individuos afectados en poblaciones de Nueva Guinea, Italia, Estados Unidos y Brasil, así como una sustitución (p.R145L) en una población al sur de China que de igual manera se

caracteriza por presentar hipospadias, por lo que se presume, p.R145L no tiene preferencia étnica.

La tercera y última mutación analizada durante esta investigación en el gen *SRD5A2*, p.S14R, se basa de igual manera en una transversión que involucra la sustitución de A por C, lo que repercute en el cambio de serina (aminoácido polar sin carga) por arginina. El análisis *in vitro* de esta variante dió como resultado un decremento sumamente importante en la reducción de la actividad de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 (V_{max} 308.2 pmol/mg P/h), ya que mostró una pérdida del 96 por ciento de la actividad enzimática con respecto a la enzima WT (V_{max} 7963 pmol/mg P/h). Resultado que, al igual que en la variante p.R145L, es difícil establecer cuantitativamente la actividad de la enzima, por lo que se debe ser muy cauteloso en mencionar los parámetros cinéticos, sin embargo, es evidente la pérdida completa de la actividad enzimática. Del mismo modo que las dos variantes anteriores y en comparación con las mismas, p.S14R presentó el menor valor K_{cat} con una disminución en la eficiencia del 99.05% y un valor de K_m incrementado con respecto a la WT. Los resultados obtenidos destacan que existe una menor afinidad de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2 por T, razón por la que se propone que la enzima presenta alteraciones a nivel estructural evitando así su unión con el sustrato para formar DHT.

En el año 2010, Maimoun et al. comprobaron e informaron 3 datos importantes sobre la variante p.S14R mediante la alineación de la secuencia del gen *SRD5A2*. En primer lugar, concluyeron que el aminoácido S14 se encuentra altamente

conservado en diferentes especies lo que concuerda con nuestros resultados y sugiere la gran importancia de este residuo para la actividad de tipo 2 de la 5 α -esteroide reductasa. En segundo lugar, concluyeron que en algunos de los casos, la mutación p.S14R se puede llegar a asociar con el polimorfismo p.V89L (estudiado principalmente en el cáncer de próstata), lo que le confiere a la enzima diferentes consecuencias funcionales y en tercer lugar, que la alteración p.S14R, en ocasiones se puede llegar a confundir con el síndrome parcial de insensibilidad a andrógenos (PAIS) ya que revela un cuadro clínico muy similar a diferencia de que una vez realizado el diagnóstico molecular, se descarta PAIS cuando se corrobora una secuencia del gen *AR* normal. El estudio *in silico* realizado (a excepción de Provean, el cual valora a la alteración como neutra), concuerda con los resultados obtenidos, demostrando así que dos de los programas utilizados predicen que la mutación p.S14R es perjudicial para la enzima SRD5A2.

Se ha descrito que existe una gran variedad de manifestaciones fenotípicas en individuos al nacer con deficiencia de la enzima 5 α -esteroide reductasa tipo 2, no en todos los casos es semejante y varía dependiendo del sitio de la alteración manifestando desde clitoromegalia al momento del nacimiento o se pueden llegar a presentar fenotipos más virilizados con hipospadias perineoescrotal o testículos criptorquídicos.

Los estudios *in silico* realizados mediante programas bioinformáticos predicen la patogenicidad producida por los diferentes cambios que existen dentro de un gen. Esto ayuda a entender y priorizar las variantes que van apareciendo a lo largo del

tiempo y a la caracterización de las que tienen mayores implicaciones para el ser humano. De esta manera, se puede, proveer mayor evidencia que contribuya al área clínica y así llegar a resultados más pronto y precisos para quienes padezcan estas alteraciones.

8. CONCLUSIONES

Las mutaciones p.F118L, p.R145L y p.S14R se definieron previamente mediante secuenciación a lo largo del gen *SRD5A2*. Las mutaciones p.R145L y p.S14R producen la pérdida total de la actividad de la enzima, mientras que la mutación p.F118L presenta una pérdida parcial, manifestando desórdenes en el desarrollo sexual debido a la deficiencia de la actividad de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2.

Los resultados obtenidos en las actividades enzimáticas de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 de las variantes p.F118L, p.R145L y p.S14R, sugieren que es indispensable la correcta actividad catalítica de la enzima para la adecuada conversión del sustrato T en DHT e influir en el correcto desarrollo de los genitales tanto internos como externos en la embriogénesis y durante la pubertad.

Los estudios en este proyecto dejan en claro la importancia biológica de la 5 α -esteroide reductasa tipo 2 en la diferenciación sexual. Asimismo, se demuestra el papel fundamental que tiene la estructura génica y consecuentemente obtener una actividad enzimática óptima. Sin embargo, aún se desconoce la estructura tridimensional de la proteína.

9. PERSPECTIVA

Los estudios posteriores estarán basados en el modelaje molecular para predecir la estructura tridimensional de la enzima silvestre y las mutantes reportadas en este estudio usando programas bioinformáticos como Robetta (<http://rosetta.bakerlab.org>) y PyMol (<http://www.pymol.org/>).

10. BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, S., Berman, D. M., Jenkins, E. P. & Russell, D. W. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354, 159-161, doi: 10.1038/354159a0 (1991).
- Andersson, S., Bishop, R. W. & Russell, D. W. Expression cloning and regulation of steroid 5 alpha-reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 16249-16255 (1989).
- Andersson, S. & Russell, D. W. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 3640-3644 (1990).
- Bain, J. The many faces of testosterone. *Clinical Interventions in Aging* 2, 567-576 (2007).
- Barbaro, M., Wedell, A. & Nordenstrom, A. Disorders of sex development. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 16, 119-127, doi:10.1016/j.siny.2011.01.001 (2011).
- Barseghyan, H., Delot, E. C. & Vilain, E. New technologies to uncover the molecular basis of disorders of sex development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 468, 60-69, doi:10.1016/j.mce.2018.04.003 (2018).
- Bashamboo, A. & McElreavey, K. Human sex-determination and disorders of sex-development (DSD). *Seminars in Cell & Developmental Biology* 45, 77-83, doi:10.1016/j.semcdb.2015.10.030 (2015).
- Beato, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344 (1989).
- Boudon¹, C. *et al.* 5 alpha-reductase activity in cultured epithelial and stromal cells from normal and hyperplastic human prostates--effect of finasteride (Proscar), a 5 alpha-reductase inhibitor. *Cellular and Molecular Biology* 41, 1007-1015 (1995).
- Boudon², C. *et al.* A new deletion of the 5 alpha-reductase type 2 gene in a Turkish family with 5 alpha-reductase deficiency. *Clinical Endocrinology* 43, 183-188 (1995).
- Boudon³, C. *et al.* Molecular study of the 5 alpha-reductase type 2 gene in three European families with 5 alpha-reductase deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80, 2149-2153, doi:10.1210/jcem.80.7.7608269 (1995).

- Cai, L. Q. *et al.* 5 alpha-reductase-2 gene mutations in the Dominican Republic. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81, 1730-1735, doi:10.1210/jcem.81.5.8626825 (1996).
- Canto, P. *et al.* Mutations of the 5 alpha-reductase type 2 gene in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5 alpha-reductase-2 deficiency. *Clinical Endocrinology* 46, 155-160 (1997).
- Cheng, J. *et al.* Phenotype and molecular characteristics in 45 Chinese children with 5alpha-reductase type 2 deficiency from South China. *Clinical Endocrinology* 83, 518-526, doi:10.1111/cen.12799 (2015).
- Davey, R. A. & Grossmann, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical Biochemist. Reviews* 37, 3-15 (2016).
- Davis, D. L. & Russell, D. W. Unusual length polymorphism in human steroid 5 alpha-reductase type 2 gene (SRD5A2). *Human Molecular Genetics* 2, 820 (1993).
- Eicheler, W. *et al.* Immunocytochemical localization of human 5 alpha-reductase 2 with polyclonal antibodies in androgen target and non-target human tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 42, 667-675, doi:10.1177/42.5.8157936 (1994).
- Eicheler, W., Dreher, M., Hoffmann, R., Happle, R. & Aumuller, G. Immunohistochemical evidence for differential distribution of 5 alpha-reductase isoenzymes in human skin. *The British Journal of Dermatology* 133, 371-376 (1995).
- Fang, S., Anderson, K. M. & Liao, S. Receptor proteins for androgens. On the role of specific proteins in selective retention of 17-beta-hydroxy-5-alpha-androstan-3-one by rat ventral prostate in vivo and in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 6584-6595 (1969).
- Giwerzman, Y. L., Abrahamsson, P. A., Giwerzman, A., Gadaleanu, V. & Ahlgren, G. The 5alpha-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, 679-685, doi:10.1016/j.eururo.2005.06.011 (2005).
- Gobinet, J., Poujol, N. & Sultan, C. Molecular action of androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology* 198, 15-24 (2002).
- Gómez-Chang, E., Larrea, F. & Martínez-Montes, F. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 15 (1):24-36 (2012).

- Hackel, C. *et al.* New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5alpha-reductase deficiency type 2. *Journal of Molecular Medicine* 83, 569-576, doi: 10.1007/s00109-005-0651-7 (2005).
- Hanukoglu, I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43, 779-804, doi: 10.1016/0960-0760(92)90307-5 (1992).
- Hiort, O. & Holterhus, P. M. The molecular basis of male sexual differentiation. *European Journal of Endocrinology* 142, 101-110 (2000).
- Hiipakka, R. A. & Liao, S. Molecular mechanism of androgen action. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 9, 317-324 (1998).
- Horton, R. Dihydrotestosterone is a peripheral paracrine hormone. *Journal of Andrology* 13, 23-27 (1992).
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J. & Azhar, S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism* 7, 47, doi:10.1186/1743-7075-7-47 (2010).
- Hughes, I. A. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 22, 119-134, doi:10.1016/j.beem.2007.11.001 (2008).
- Hughes, I. A. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology* 142, 3281-3287, doi:10.1210/endo.142.8.8406 (2001).
- Imperato-McGinley, J. & Zhu, Y. S. Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency. *Molecular and Cellular Endocrinology* 198, 51-59 (2002).
- Jameson, S. A., Lin, Y. T. & Capel, B. Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Developmental Biology* 370, 24-32, doi:10.1016/j.ydbio.2012.06.009 (2012).
- Jenkins, E. P. *et al.* Characterization and chromosomal mapping of a human steroid 5 alpha-reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue. *Genomics* 11, 1102-1112 (1991).
- Jenster, G. *et al.* Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Molecular Endocrinology* 5, 1396-1404, doi:10.1210/mend-5-10-1396 (1991).
- Kim, K. S. & Kim, J. Disorders of sex development. *Korean Journal of Urology* 53, 1-8, doi:10.4111/kju.2012.53.1.1 (2012)

- Labrie, F. *et al.* Structure of human type II 5 alpha-reductase gene. *Endocrinology* 131, 1571-1573, doi:10.1210/endo.131.3.1505484 (1992).
- Lee, D. K. & Chang, C. Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 84, 41-49 (2003).
- Lee, M. M. & Donahoe, P. K. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews* 14, 152-164, doi:10.1210/edrv-14-2-152 (1993).
- Liang, T., Cascieri, M. A., Cheung, A. H., Reynolds, G. F. & Rasmusson, G. H. Species differences in prostatic steroid 5 alpha-reductases of rat, dog, and human. *Endocrinology* 117, 571-579, doi:10.1210/endo-117-2-571 (1985).
- Lu, N. Z. *et al.* International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacological Reviews* 58, 782-797, doi:10.1124/pr.58.4.9 (2006).
- Maatouk, D. M. & Capel, B. Sexual development of the soma in the mouse. *Current Topics in Developmental Biology* 83, 151-183, doi:10.1016/S0070-2153(08)00405-5 (2008).
- MacLaughlin, D. T. & Donahoe, P. K. Sex determination and differentiation. *The New England Journal of Medicine* 350, 367-378, doi:10.1056/NEJMra022784 (2004).
- Maimoun, L. *et al.* Undervirilization in XY newborns may hide a 5alpha-reductase deficiency: report of three new SRD5A2 gene mutations. *International Journal of Andrology* 33, 841-847, doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01036.x (2010).
- Makridakis, N., Akalu, A. & Reichardt, J. K. Identification and characterization of somatic steroid 5alpha-reductase (SRD5A2) mutations in human prostate cancer tissue. *Oncogene* 23, 7399-7405, doi:10.1038/sj.onc.1207922 (2004).
- McClelland, K., Bowles, J. & Koopman, P. Male sex determination: insights into molecular mechanisms. *Asian Journal of Andrology* 14, 164-171, doi:10.1038/aja.2011.169 (2012).
- Mendonca, B. B. *et al.* Reprint of "Steroid 5alpha-reductase 2 deficiency". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 165, 95-100, doi:10.1016/j.jsbmb.2016.11.006 (2017).

- Miller, W. L. & Auchus, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews* 32, 81-151, doi:10.1210/er.2010-0013 (2011).
- Miller, W. L. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology* 379, 62-73, doi:10.1016/j.mce.2013.04.014 (2013).
- Misrahi, M. *et al.* Gonadotropin receptors and the control of gonadal steroidogenesis: physiology and pathology. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 12, 35-66 (1998).
- Morais da Silva, S. *et al.* Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics* 14, 62-68, doi:10.1038/ng0996-62 (1996).
- Nicoletti, A. *et al.* SRD5A2 gene analysis in an Italian population of under-masculinized 46,XY subjects. *Clinical Endocrinology* 63, 375-380, doi:10.1111/j.1365-2265.2005.02348.x (2005).
- Normington, K. & Russell, D. W. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 19548-19554 (1992).
- Ono, M. & Harley, V. R. Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nature Reviews. Endocrinology* 9, 79-91, doi:10.1038/nrendo.2012.235 (2013).
- Ostrer, H. Disorders of sex development (DSDs): an update. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99, 1503-1509, doi:10.1210/jc.2013-3690 (2014).
- O'Shaughnessy, P. J., Baker, P. J., Heikkila, M., Vainio, S. & McMahon, A. P. Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis--androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal leydig cells. *Endocrinology* 141, 2631-2637, doi:10.1210/endo.141.7.7545 (2000).
- Papadopoulos, V. *et al.* Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 408, 90-98, doi:10.1016/j.mce.2015.03.014 (2015).
- Payne, A. H. & Hales, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews* 25, 947-970, doi:10.1210/er.2003-0030 (2004).
- Pelletier, G. *et al.* Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450 (scc), 3 beta-hydroxysteroid

- dehydrogenase and cytochrome P450 (c17)) in rat adrenal cortex and gonads. *The Journal of Endocrinology* 171, 373-383 (2001).
- Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Morishima, Y. & Murphy, P. J. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays in Biochemistry* 40, 41-58 (2004).
- Quarmby, V. E. *et al.* Expression of recombinant androgen receptor in cultured mammalian cells. *Molecular Endocrinology* 4, 1399-1407, doi:10.1210/mend-4-9-1399 (1990).
- Quigley, C. A. *et al.* Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Reviews* 16, 271-321, doi:10.1210/edrv-16-3-271 (1995).
- Ramos, L., Chavez, B., Mares, L., Valdes, E. & Vilchis, F. Mutational analysis of the androgen receptor (NR3C4) gene in patients with 46,XY DSD. *Gene* 641, 86-93, doi:10.1016/j.gene.2017.10.038 (2018).
- Rheume, E. *et al.* Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Molecular Endocrinology* 5, 1147-1157, doi:10.1210/mend-5-8-1147 (1991).
- Rittmaster, R. S. 5alpha-reductase inhibitors. *Journal of Andrology* 18, 582-587 (1997).
- Rojas-Durán, *et al.* The androgen receptor in the prostate physiopathology. *Revista de Neurobiología* 2(2):230511 (2011).
- Russell, D. W. & Wilson, J. D. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 63, 25-61, doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.000325 (1994).
- Russell, D. W. & Wilson, J. D. Steroid 5 alpha-Reductase 2 Deficiency. *Genetic Steroid Disorders. San Diego Academic Press* 1, 199-214, doi: 10.1016/B978-0-12-416006-4.00014-4 (2014).
- Ryl, A. *et al.* Molecular Analysis of the SRD5A1 and SRD5A2 Genes in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia with Regard to Metabolic Parameters and Selected Hormone Levels. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14, doi: 10.3390/ijerph14111318 (2017).
- Sanderson, J. T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology* 94, 3-21, doi:10.1093/toxsci/kfl051 (2006).

- Sinclair, A. H. *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244, doi:10.1038/346240a0 (1990).
- Simard, J. *et al.* Molecular biology and genetics of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *The Journal of Endocrinology* 150 Suppl, S189-207 (1996).
- Steers, W. D. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology* 58, 17-24; discussion 24 (2001).
- Stocco, D. M., Zhao, A. H., Tu, L. N., Morohaku, K. & Selvaraj, V. A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 441, 7-16, doi:10.1016/j.mce.2016.07.036 (2017).
- Swerdloff, R. S., Dudley, R. E., Page, S. T., Wang, C. & Salameh, W. A. Dihydrotestosterone: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications of Elevated Blood Levels. *Endocrine Reviews* 38, 220-254, doi:10.1210/er.2016-1067 (2017).
- Thigpen, A. E. *et al.* Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *The Journal of Clinical Investigation* 90, 799-809, doi:10.1172/JCI115954 (1992).
- Thigpen, A. E. *et al.* Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *The Journal of Clinical Investigation* 92, 903-910, doi:10.1172/JCI116665 (1993).
- Thigpen, A. E. & Russell, D. W. Four-amino acid segment in steroid 5 alpha-reductase 1 confers sensitivity to finasteride, a competitive inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 8577-8583 (1992).
- Tremblay, J. J. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* 103, 3-10, doi:10.1016/j.steroids.2015.08.001 (2015).
- Vermeulen, A., Giagulli, V. A., De Schepper, P., Buntinx, A. & Stoner, E. Hormonal effects of an orally active 4-azasteroid inhibitor of 5 alpha-reductase in humans. *The Prostate* 14, 45-53 (1989).
- Vilchis, F., Canto, P., Chavez, B., Ulloa-Aguirre, A. & Mendez, J. P. Molecular analysis of the 5 alpha-steroid reductase type 2 gene in a family with deficiency of the enzyme. *American Journal of Medical Genetics* 69, 69-72 (1997).
- Vilchis, F., Chávez, B. Steroid Reductases. *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine* 3008-3011 (2002).

- Vilchis, F. *et al.* Novel compound heterozygous mutations in the SRD5A2 gene from 46,XY infants with ambiguous external genitalia. *Journal of Human Genetics* 53, 401-406, doi:10.1007/s10038-008-0274-2 (2008).
- Vilchis, F. *et al.* 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, 358-364, doi:10.2164/jandrol.109.009407 (2010).
- Vilchis, F., Mendez, J. P., Canto, P., Lieberman, E. & Chavez, B. Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Clinical Endocrinology* 52, 383-387 (2000).
- Wigley, W. C. *et al.* Natural mutagenesis study of the human steroid 5 α -reductase 2 isozyme. *Biochemistry* 33, 1265-1270 (1994).
- Wilhelm, D., Palmer, S. & Koopman, P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews* 87, 1-28, doi:10.1152/physrev.00009.2006 (2007).
- Wilson, J. D., Griffin, J. E. & Russell, D. W. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocrine Reviews* 14, 577-593, doi:10.1210/edrv-14-5-577 (1993).
- Wilson, J. D. Sexual differentiation. *Annual Review of Physiology* 40, 279-306, doi:10.1146/annurev.ph.40.030178.001431 (1978).
- Witchel, S. F. Disorders of sex development. *Best practice & research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* 48, 90-102, doi:10.1016/j.bpobgyn.2017.11.005 (2018).
- Yuan, S. *et al.* Genotype-phenotype correlation and identification of two novel SRD5A2 mutations in 33 Chinese patients with hypospadias. *Steroids* 125, 61-66, doi:10.1016/j.steroids.2017.06.010 (2017).
- Zhu, Y. S., Katz, M. D. & Imperato-McGinley, J. Natural potent androgens: lessons from human genetic models. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 12, 83-113 (1998).