



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Inserción de mutaciones en el gen *SRD5A2* y su impacto sobre las propiedades catalíticas de la enzima**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Maestra en Ciencias**

PRESENTA:

**Lizette Mares Gómez**

**TUTOR PRINCIPAL**

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina  
Facultad de Medicina, Unidad de Investigación en Obesidad

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dra. Lilian González Segura  
Facultad de Química

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres  
Facultad de Química

Ciudad de México, Noviembre, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	3
<b>ABREVIATURAS</b>	4
<b>ANTECEDENTES</b>	5
Diferenciación sexual	5
Esteroidogénesis	9
5 $\alpha$ -reductasa 2	17
Genética Molecular de <i>SRD5A2</i>	19
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	25
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	26
<b>HIPOTESIS</b>	27
<b>OBJETIVOS</b>	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	29
Mutantes	29
Diseño de Oligonucleótidos	29
PCR y determinación de la temperatura de fusión (T <sub>m</sub> )	31
Análisis en geles de agarosa	31
Mutagénesis	32
Aislamiento y purificación del plásmido (Minipreparación)	34
Aislamiento y purificación del plásmido (Maxipreparación)	35
Secuenciación del gen <i>SRD5A2</i>	36
Transfección de células HEK293	37
Actividad de 5 $\alpha$ -esteroide reductasa en células HEK293	37
Análisis <i>in silico</i>	39
<b>RESULTADOS</b>	41
Diseño de oligonucleótidos	41
Mutagénesis sitio dirigida	43
Secuenciación del gen <i>SRD5A2</i>	46
Actividad de 5 $\alpha$ -esteroide reductasa 2 en células HEK293	51
<b>DISCUSIÓN</b>	55
<b>CONCLUSIONES</b>	61
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	62

---

---

## RESUMEN

La 5 $\alpha$ -reductasa 2 de humano (*SRD5A2*, 3-oxo-5-alfa-esteroide delta 4-deshidrogenasa, EC 1.3.99.5) desempeña un papel determinante en la masculinización de los genitales externos. Actualmente, se han reportado más de 114 mutaciones patogénicas diferentes en el gen *SRD5A2*; sin embargo, hay poca información disponible sobre su impacto en las propiedades catalíticas. En este trabajo determinamos el efecto de mutaciones puntuales sobre las propiedades cinéticas ( $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$ ) de la *SRD5A2* de pacientes 46,XY con desórdenes del desarrollo sexual. En ensayos previos de PCR-SSCP, se identificaron 10 variantes génicas diferentes y, a través de secuenciación, se determinaron las mutaciones con cambio de sentido (V3I, S14R, A52T, F118L, R145W, R171S, L226P, F229S, S245Y, A248V). Nosotros recreamos las diez variantes encontradas y mediante transfección transitoria se expresaron en células HEK293. Los estudios funcionales mostraron que las mutantes perdieron parcial o completamente su actividad en comparación con la enzima de tipo silvestre. Analizando cada mutación con diferentes programas bioinformáticos (PolyPhen2, PROVEAN, SIFT y MUPRO), obtuvimos que las alteraciones estaban asociadas con pérdida de la actividad enzimática. Nuestros datos sugieren que las mutaciones reducen la eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) o resultan en actividad enzimática disminuida y, a pesar de que la estructura tridimensional de la *SRD5A2* todavía no se conoce, las alteraciones reportadas en la actividad enzimática podrían explicarse con base en interacciones erróneas entre los residuos de aminoácidos, el sustrato testosterona o NADPH.

Palabras clave: *Diferenciación sexual, SRD5A2, mutagénesis, DDS 46,XY, cinética Michaelis-Menten*

---

---

## ABREVIATURAS

<b>ACTH:</b> Corticotrofina	<b>NAD:</b> Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>AMH:</b> Hormona anti-Mülleriana	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>AR:</b> Receptor de andrógenos	<b>PGD2:</b> Prostaglandina D2 sintasa
<b>BSA:</b> Albúmina de suero bovino	<b>PROVEAN:</b> Analizador de efectos de variación de proteínas
<b>BrEt:</b> Bromuro de etidio	<b>RPM:</b> Revoluciones por minuto
<b>cAMP:</b> Adenosin monofosfato cíclico	<b>RSP01:</b> R-spondin-1
<b>cDNA:</b> DNA complementario	<b>SIFT:</b> Clasificación de sustituciones intolerantes a partir de aminoácidos tolerantes
<b>DDS-46,XY:</b> Desorden de desarrollo sexual 46,XY	<b>SSI:</b> solución salina isotónica
<b>DHEA:</b> Dehidroepiandrosterona	<b>SF1:</b> Factor esteroideogénico 1
<b>DHH:</b> Desert HedgeHog	<b>SFT:</b> Suero fetal de ternera
<b>DHT:</b> 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona	<b>SOX9:</b> SRY-BOX 9
<b>DMRT1:</b> Factor de transcripción 1 relacionado con Doublesex y Mab3	<b>SRD5A2:</b> Esteroide 5 $\alpha$ -reductasa-2
<b>DPC:</b> días post coito	<b>SRY:</b> Proteína de la región Y determinante del sexo
<b>FGF9:</b> Factor de crecimiento de fibroblastos 9	<b>SSCP:</b> Polimorfismo de conformación de cadena sencilla
<b>FSH:</b> Hormona foliculoestimulante	<b>STAR:</b> Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
<b>FOXL2:</b> Forkhead box L2	<b>TA:</b> Temperatura ambiente
<b>H<sub>2</sub>O<sub>odd</sub>:</b> H <sub>2</sub> O bidestilada-desionizada	<b>TESCO:</b> Potenciador específico de testículo del centro Sox9
<b>GATA4:</b> Proteína de unión a GATA 4	<b>T:</b> Testosterona
<b>hCG:</b> Gonadotropina coriónica humana	<b>WNT4:</b> Wingless-type MMTV integration site family, member 4
<b>HEK293:</b> Células embrionarias de riñón humano 293	<b>WT:</b> Tipo silvestre
<b>INSL3:</b> Factor similar a insulina-3	<b>WT1:</b> Tumor de Wilms tipo 1
<b>LB:</b> Luria Bertani	<b>3<math>\beta</math>-HSD:</b> 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$
<b>LH:</b> Hormona luteinizante	<b>17<math>\beta</math>-HSD:</b> 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
<b>LHX1:</b> LIM homeobox gene 1	
<b>MPM:</b> Marcador de peso molecular	
<b>MUPRO:</b> Predicciones de cambios en la estabilidad de proteínas en mutaciones	
<b>NADPH:</b> Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	

---

---

## ANTECEDENTES

### Diferenciación sexual

En mamíferos, la determinación y diferenciación del sexo dependen de múltiples factores involucrados a nivel cromosómico, gonadal y fenotípico. El desarrollo sexual está dividido en tres etapas consecutivas que inician con el establecimiento del sexo cromosómico al momento de la fecundación. En esta fase el sexo femenino está constituido por los cromosomas sexuales XX (sexo homogamético), mientras el sexo masculino está representado por los cromosomas XY (sexo heterogamético). En el cromosoma Y se localiza el gen determinante testicular, denominado *SRY* (Proteína de la región Y determinante del sexo). El gen *SRY* induce el desarrollo de la gónada bipotencial hacia testículo, mecanismo denominado determinación del sexo gonadal. La tercera etapa es el desarrollo del sexo fenotípico (Fig. 1), en donde las estructuras internas y externas de los genitales se diferencian por la secreción y acción de hormonas esteroideogénicas específicas (Hughes I., 2008; Hiort O., 2013).z

Alrededor de la quinta semana de gestación el borde urogenital se hace visible en embriones humanos y alrededor de los 9 dpc (días post coito) en roedores. En este período de tiempo, la función biológica de los genes *WT1* (Tumor de Wilms tipo 1), *SFI* (Factor esteroideogénico 1), *GATA4* (Proteína de unión a GATA 4) y *LHX1* (LIM homeobox gene 1) es importante para inducir la transformación del borde urogenital en una gónada bipotencial (Fig. 1). Múltiples líneas de investigación han mostrado que estos genes regulan transcripcionalmente la expresión del *SRY*. La formación del testículo a partir de una gónada indiferenciada se realiza en presencia de *SRY* y de los genes autosómicos *SFI*, *SOX9* (SRY-BOX 9), *DHH* (Desert HedgeHog) y *DMRT1* (Factor de transcripción 1 relacionado con Doublesex y Mab3)

---

---

(Öçal G., 2011; Ono y Harley, 2013). Sekido y cols., reportaron que en ratones el gen *SRY* actúa conjuntamente con *SF1*, activando la expresión de *SOX9* al unirse a una región específica del gen denominada TESCO (Potenciador específico de testículo del centro Sox9). De manera análoga, en humanos y roedores, los datos indican que el factor transcripcional *SOX9* controla la expresión de los genes *FGF9* (Factor de crecimiento de fibroblastos 9) y *PGD2* (Prostaglandina D2 sintasa). Asimismo, ha sido documentado que ambos factores regulan positivamente al gen *SOX9*. Recientemente, el factor transcripcional *SOX9* fue identificado como una molécula importante para la diferenciación de las células de Sertoli, ya que activa la expresión del gen *AMH* (Hormona anti-Mülleriana) e inhibe mediante su glucoproteína dimérica el desarrollo de los conductos de Müller en embriones masculinos (Sekido y Lovell-Badge, 2008; Hiramatsu et al., 2010). Las moléculas de señalización intercelular como DHH han sido identificadas de importancia biológica durante el desarrollo embrionario. Al respecto, se ha reportado que la expresión del gen *DHH* ha sido detectada en células de Sertoli después del inicio de la expresión de *SRY*. En ratones, se ha mostrado que el homólogo proteico DHH es un regulador positivo de la diferenciación de las células de Leydig, encargadas de la biosíntesis de hormonas esteroideas testiculares (Bitgood y McMahon, 1995; Yao et al., 2002; Paliwal et al., 2011).

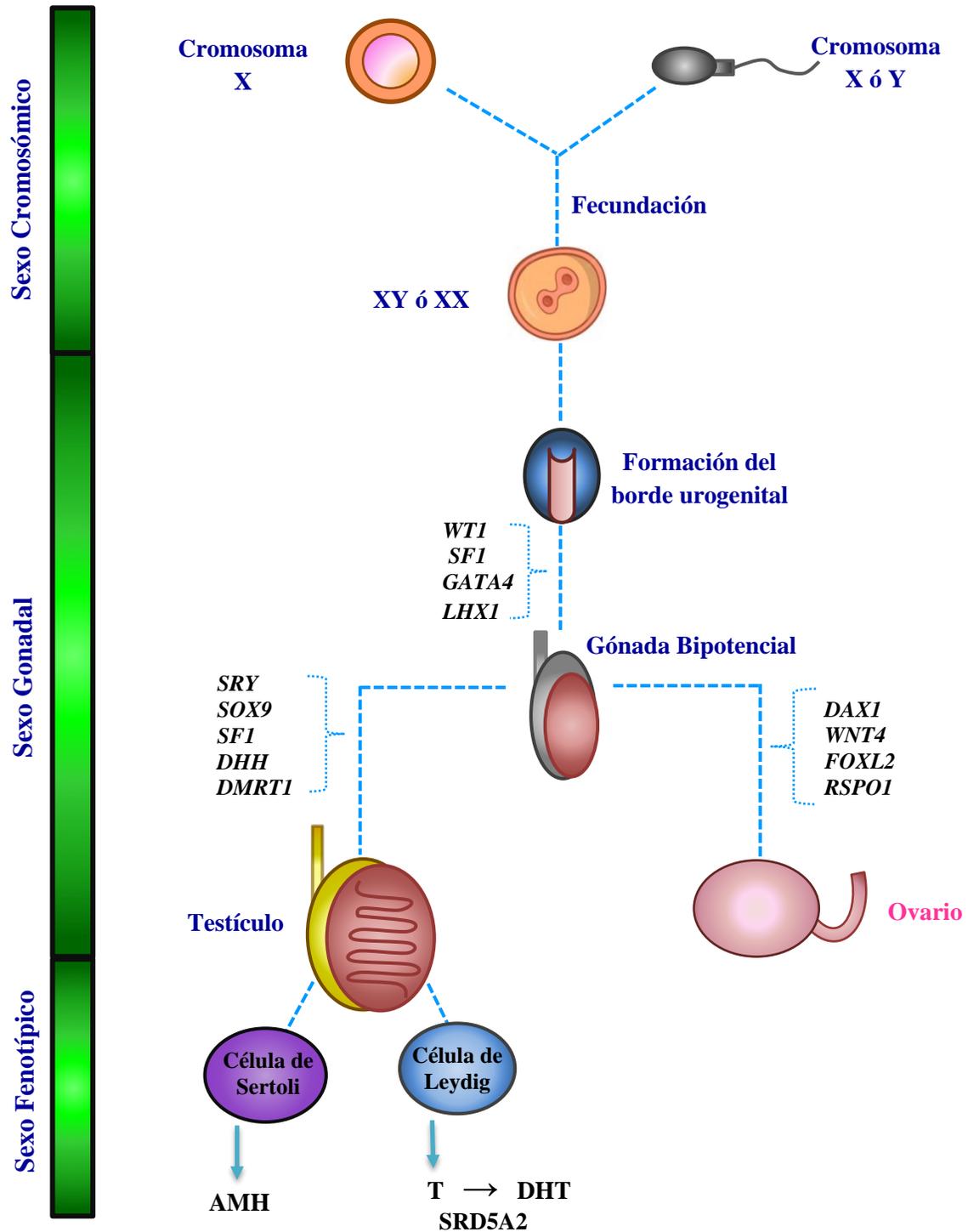
En células germinales y de Sertoli, el factor de transcripción DMRT1 promueve la determinación testicular al activar la transcripción de *SOX9* y se ha observado que inhibe la feminización al reprimir la expresión génica de *FOXL2* (Forkhead box L2), *WNT4* (Wingless-type MMTV integration site family, member 4) y *RSPO1* (R-spondin-1) (Chauhan et al., 2017; Zhang y Zarkower, 2017). En embriones XY, el receptor nuclear proteico SF1 ha mostrado regular la expresión de genes involucrados en la esteroidogénesis suprarrenal y

---

---

gonadal, incluyendo *STAR* (Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda), *CYP11A1*, *CYP17A1* y *HSD3B2*. Aunque en individuos con carga cromosómica XX, la descripción de genes determinantes del sexo es menos conocida; recientemente se ha identificado la expresión de los genes *DAX1*, *WNT4*, *FOXL2* y *RSPO1* durante la diferenciación y desarrollo ovárico (Ono y Harley, 2013; Chauhan et al., 2017).

En humanos, durante la sexta semana de gestación los conductos paramesonérficos (conductos de Müller) y los conductos mesonérficos (conductos de Wolff) persisten en la gónada indiferenciada. La diferenciación del ovario durante la vida fetal no requiere la acción de hormonas esteroideas sexuales; mientras que en embriones masculinos la diferenciación gonadal es dependiente de la acción de hormonas esteroideas. Hacia finales de la sexta semana, la expresión de *SOX9* promueve la diferenciación de las células de Sertoli. Una de las funciones más importantes de las células de Sertoli es la biosíntesis de AMH y la inducción de la diferenciación de las células de Leydig. La AMH es una proteína que a través de la unión al receptor AMH tipo II, causa la regresión de los conductos de Müller, inhibiendo la formación de útero, trompas de Falopio y el tercio superior de la vagina (Paliwal et al., 2011; Ono y Harley, 2013; Chauhan et al., 2017). Alrededor de la octava semana de gestación, las células de Leydig sintetizan andrógenos, primordialmente testosterona, un esteroide  $\Delta^4$ -3ceto con 19 átomos de carbono que regula la diferenciación gonadal de los conductos de Wolff (epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales). Las células de Leydig producen el factor INSL3, necesario para el descenso transabdominal del testículo; mientras que el desarrollo de genitales externos masculinos (uretra, escroto y pene) y próstata es controlado por la acción de DHT, un esteroide  $5\alpha$ -reducido que es producto de la enzima  $5\alpha$ -reductasa 2.



**Fig. 1.** Representación esquemática de las etapas de determinación y diferenciación sexual. Se incluyen los genes que intervienen en la formación de la gónada bipotencial, testículo y ovario, respectivamente. Una de las características principales de la esteroidogénesis es la formación de andrógenos testiculares como T y en tejidos blanco DHT.

---

---

## Esteroidogénesis

Las hormonas del tipo ciclopentanoperhidrofenantreno están divididas estructural y biológicamente en glucocorticoides, mineralocorticoides y esteroides sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos). En vertebrados estas hormonas regulan diferentes procesos fisiológicos como el mantenimiento de las funciones reproductivas, metabólicas y homeostasis hídrica. En mamíferos existen principalmente tres glándulas endocrinas (glándula suprarrenal, ovario y testículos) encargadas de la biosíntesis de hormonas esteroides activas a partir de una molécula con 27 átomos de carbono, denominada colesterol. Además, transitoriamente la placenta sintetiza esteroides y en menor proporción el sistema nervioso central (Miller y Auchus, 2011; Luu-The V., 2013). En tejidos, los esteroides activos son sintetizados a partir de varios precursores metabólicos como androstandiol ( $5\alpha$ -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol), androstendiol ( $5$ -androsten- $3\beta,17\beta$ -diol) o androsterona ( $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -androstan-17-ona) (Luu-The V., 2013).

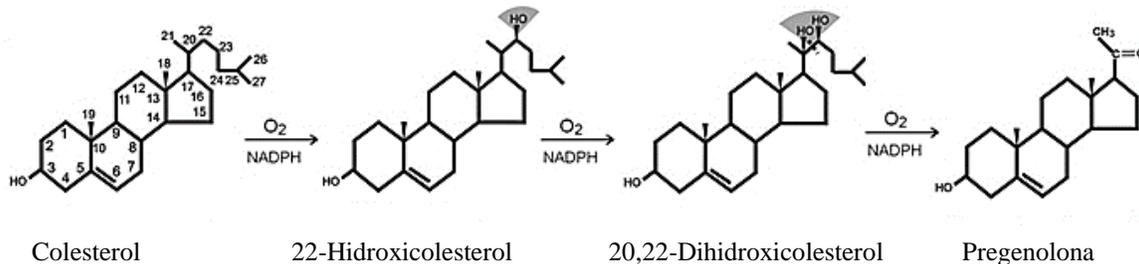
Debido a que el colesterol es el precursor esencial de todas las hormonas esteroides, la inducción de la esteroidogénesis inicia con la movilización de esta molécula de la membrana externa hacia la membrana interna de la mitocondria mediante de la proteína de 37 kDa denominada StAR (Sugawara et al., 1995). Otro factor de importancia biológica en la regulación de genes involucrados en la síntesis de hormonas esteroides es el receptor nuclear SF1. Esta proteína de 461 aminoácidos presenta dominios de unión al DNA, denominados dedos de zinc, necesarios para la unión a los motivos AGGTCA localizados río arriba de los genes CYP. No obstante la importancia fisiológica de estos dos genes en la inducción y regulación de la esteroidogénesis, la principal vía de control es llevada a cabo mediante las

---

---

hormonas polipeptídicas secretadas por el eje hipotálamo-hipófisis. En células esteroidogénicas las hormonas hipofisarias (como LH, FSH, ACTH) inducen la producción de cAMP, el cual puede estimular la transcripción génica y la fosforilación de StAR (Miller y Auchus, 2011).

El paso inicial y limitante en la esteroidogénesis es el rompimiento de la cadena lateral del colesterol para producir pregnenolona. Las tres reacciones de monooxigenación en la molécula del colesterol son catalizadas en la membrana mitocondrial interna por acción del citocromo P450<sub>scc</sub> o CYP11A1. La biosíntesis de pregnenolona sucede a través de la hidroxilación del carbono 22 para formar 22-hidroxicolesterol. La segunda reacción es la hidroxilación del carbono 20 para formar 20,22-dihidroxicolesterol. La tercera reacción consiste en el rompimiento de la cadena lateral del colesterol entre el carbono 20 y 22 para producir Pregnenolona (Fig. 2). Cada una de las tres reacciones requiere una molécula de O<sub>2</sub>, una molécula de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y el sistema de transferencia de electrones mitocondrial. Este sistema mitocondrial consiste primordialmente de dos coenzimas denominadas ferredoxina y ferredoxina reductasa (Hanukoglu I., 1992; Miller, 2002; Payne y Hales, 2004; Sanderson JT., 2006; Miller y Auchus, 2011; Morzycki JW., 2014). Se ha reportado que la región carboxilo terminal del CYP11A contiene dos dominios importantes: un sitio de unión al esteroide y un sitio de unión al grupo hemo. Estos sitios son dominios altamente conservados en humanos y roedores, ya que estas regiones presentan un 100% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Vilchis et al., 2002).



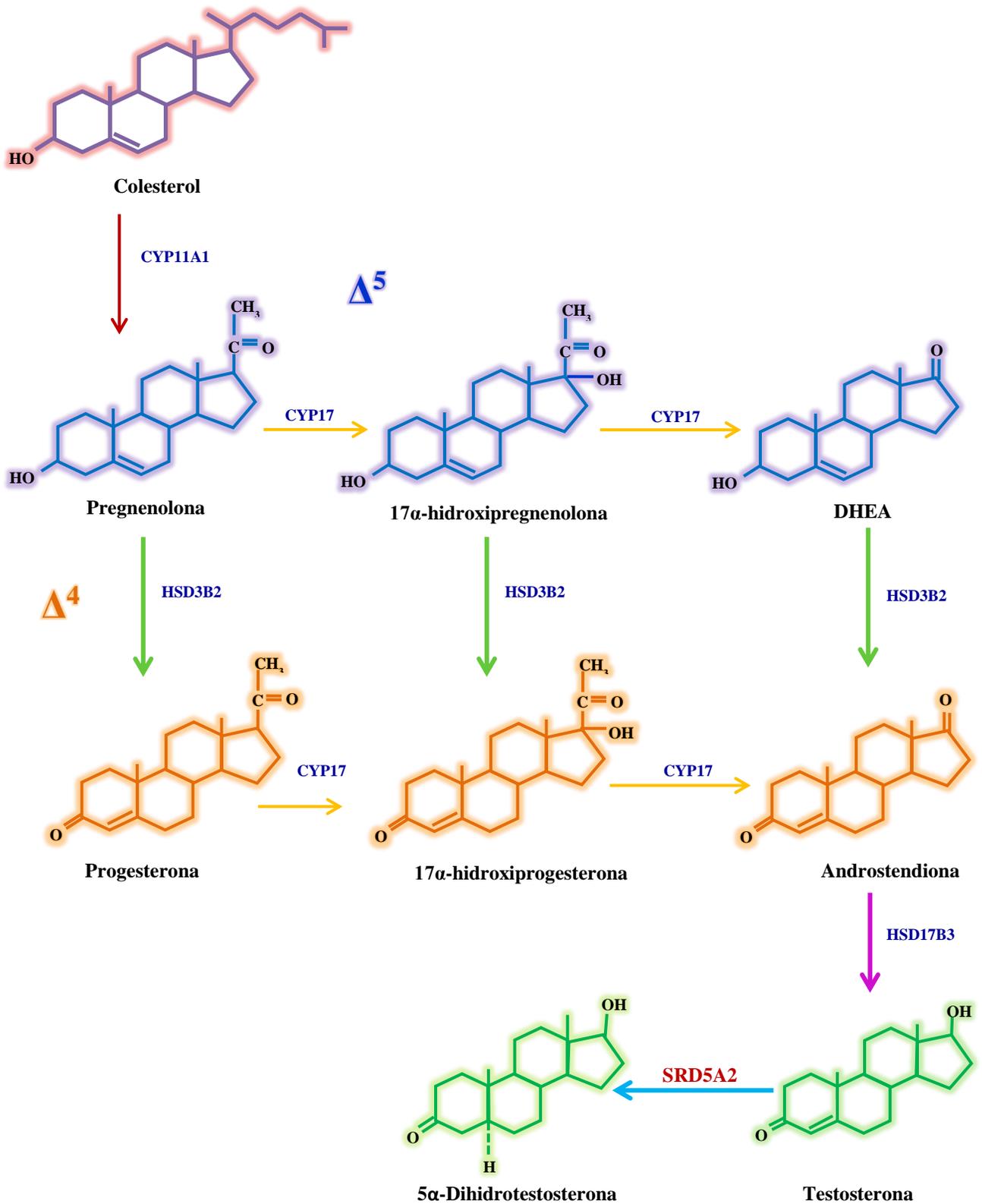
**Fig. 2.** Reacción enzimática catalizada por el CYP11A. El CYP11A cataliza tres reacciones de oxidación secuenciales seguidas de escisión de las seis cadenas laterales de carbono. Cada reacción de oxidación requiere una molécula de oxígeno y una molécula de NADPH (Modificado de Payne y Hales, 2004).

La síntesis de testosterona ocurre principalmente a través de dos vías denominadas delta 4 ( $\Delta^4$ ) y delta 5 ( $\Delta^5$ ). La preferencia para sintetizar testosterona por estas dos vías está en función de la especie y en algunas ocasiones del tejido (Fig. 3). En el humano, a diferencia del roedor, la vía predominante para la síntesis de testosterona es la vía  $\Delta^5$ . La ruta está caracterizada por la biotransformación de pregnenolona en  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona y DHEA mediante otro citocromo P450, denominado CYP17A1. La reacción catalizada por el CYP17A1 presenta actividad de  $17\alpha$ -hidroxilasa/ $17,20$  liasa en tejidos como la glándula suprarrenal y la gónada, aunque su expresión también ha sido detectada en piel (Miller y Auchus, 2011). La proteína P450c17 cataliza dos reacciones mixtas: la  $17\alpha$ -hidroxilación de esteroides de 21 carbonos (como pregnenolona y progesterona) y la ruptura del enlace C17-C20. En la vía  $\Delta^5$ , el CYP17A1 convierte la pregnenolona en  $17\alpha$ -pregnenolona, y, mediante la actividad  $17/20$ -liasa se obtiene la DHEA (Dehidroepiandrosterona). En cambio, en la vía  $\Delta^4$ , la progesterona se biotransforma en androstendiona, teniendo como metabolito intermediario a la  $17\alpha$ -progesterona (Hanukoglu I., 1992; Payne y Hales, 2004; Miller y Auchus, 2011). La actividad de  $17,20$ -liasa es aproximadamente cincuenta veces más eficiente para la conversión de  $17\alpha$ -

---

---

hidroxipregnenolona en DHEA que para la conversión de 17-hidroxiprogesterona en androstendiona, esto es consistente con las grandes cantidades de DHEA secretadas por la suprarrenal adulta y fetal de humanos (Lee-Robichaud et al., 1995; Auchus et al., 1998).

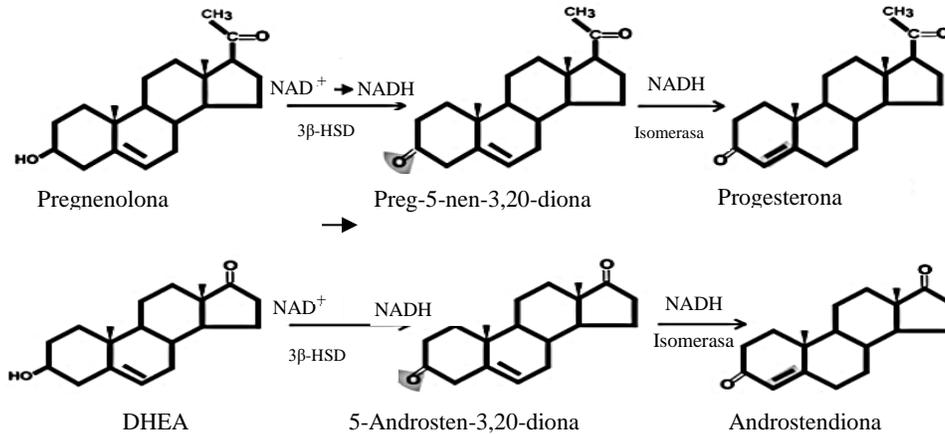


**Fig. 3.** Representación esquemática de las vías  $\Delta^4$  y  $\Delta^5$  para la formación de esteroides activos a partir del colesterol en tejidos endocrinos.

---

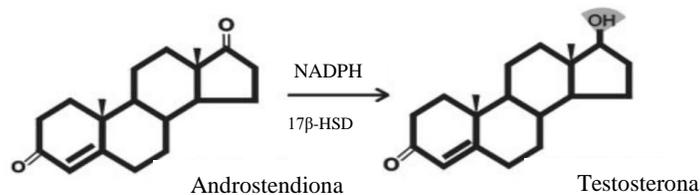
---

La molécula de DHEA sufre reacciones de deshidrogenación e isomerización por la enzima 3 $\beta$ -HSD, dando lugar a la formación de androstendiona, un precursor en la síntesis de T (Miller, 2002; Fukami et al., 2013). La 3 $\beta$ -HSD (isomerasa) 2 es una enzima de 371 aminoácidos codificada por el gen *HSD3B2* y se encuentra anclada a la membrana mitocondrial externa. Esta enzima bifuncional es necesaria para catalizar la conversión de los  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiesteroides (pregnenolona, 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona y DHEA) a  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides (como progesterona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogestero y androstendiona). La conversión inicia mediante la deshidrogenación del C3 en presencia de la coenzima NAD<sup>+</sup>; posteriormente se activa la isomerización del  $\Delta^5$ -3 cetoesteroide a  $\Delta^4$ -3 cetoesteroide (Hanukoglu I., 1992; Payne y Hales, 2004; Miller y Auchus, 2011) (Fig. 4). Adicional a esto, la 3 $\beta$ -HSD2 tiene la capacidad de convertir 5-androsteno, 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ( $\Delta^5$ -diol) a testosterona y 5 $\alpha$ -androstano-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol a DHT (Simard et al., 2005). Ensayos de protección de ribonucleasa utilizando diversos tejidos de humano revelaron que la isoenzima 3 $\beta$ -HSD2 es el mRNA más abundante en la glándula suprarrenal, ovarios y testículos, mientras que el transcrito tipo I corresponde exclusivamente al mRNA expresado predominantemente en la placenta, piel, próstata y glándula mamaria (Gringras y Simard, 1999).



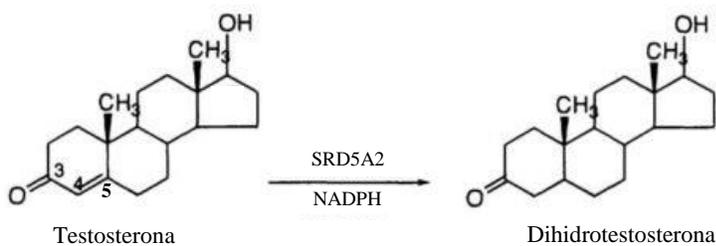
**Fig. 4.** Reacción enzimática catalizada por la 3β-HSD2. La enzima cataliza la deshidrogenación del grupo 3-hidroxilo produciendo un intermedio de 5-3-ceto y NADH reducido que activa la isomerización del 5-3-ceto para producir el 4-cetoesteroide (Modificado de Payne y Hales, 2004).

La última etapa para la formación de testosterona se lleva a cabo por la enzima 17β-HSD tipo 3 a partir de androstendiona (Fig. 5). Existen al menos 14 isoformas de la 17β-HSD, estas isoformas varían en su tamaño, estructura, especificidad por el sustrato, utilización del cofactor y funciones fisiológicas. Sin embargo, únicamente 6 presentan importancia en la esteroidogénesis. La enzima 17β-HSD tipo 3 es una proteína hidrofóbica de 310 aminoácidos, utiliza como cofactor al NADPH y se expresa casi exclusivamente en el testículo (Geissler et al., 1994; Peltoketo et al., 1999). Actúa como reductasa y oxidasa, convirtiendo los 17-cetoesteroides y 17β-hidroxiesteroides en andrógenos, estas reacciones se llevan a cabo a partir de DHEA y androstendiona para obtener androstendiol y testosterona, respectivamente (Hanukoglu I., 1992; Payne y Hales, 2004; Sanderson JT., 2006; Miller y Auchus, 2011).



**Fig. 5.** Reacción enzimática catalizada por la 17HSD. El tipo III actúa predominantemente como una reductasa y utiliza preferentemente androstenediona como sustrato (Modificado de Payne y Hales, 2004).

En tejido urogenital masculino, la  $\alpha$ -reducción en el carbono 5 de la testosterona induce la formación de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) (Fig.6); un andrógeno con mayor potencia biológica. La enzima SRD5A2 cataliza la  $5\alpha$ -reducción de enlaces  $\Delta^{4,5}$  en compuestos  $\Delta^4$ -3-cetoesteroides como progesterona, androstendiona y testosterona, entre otros. Esta reacción es dependiente de NADPH; este cofactor aporta un ión hidruro al carbono 5, mientras que el carbono 4 adquiere un protón del medio (Björkhem I., 1969; Björkhem & Holmberg, 1973). Durante las primeras semanas de embriogénesis en individuos 46,XY, esta enzima es importante para la diferenciación de los genitales externos (uretra penénea, escroto y pene) y la próstata (Andersson et al., 1991; Russell y Wilson, 1994; Vilchis et al., 2008). Aunque la función esencial de la  $5\alpha$ -reductasa 2 en la diferenciación sexual masculina está firmemente establecida, el papel biológico de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 es menos claro.



**Fig. 6.** Reacción catalizada por la enzima SRD5A2. El enlace  $\Delta^{4,5}$  de testosterona es  $5\alpha$ -reducido en presencia de NADPH, el producto final es DHT (Modificado de Payne y Hales, 2004).

---

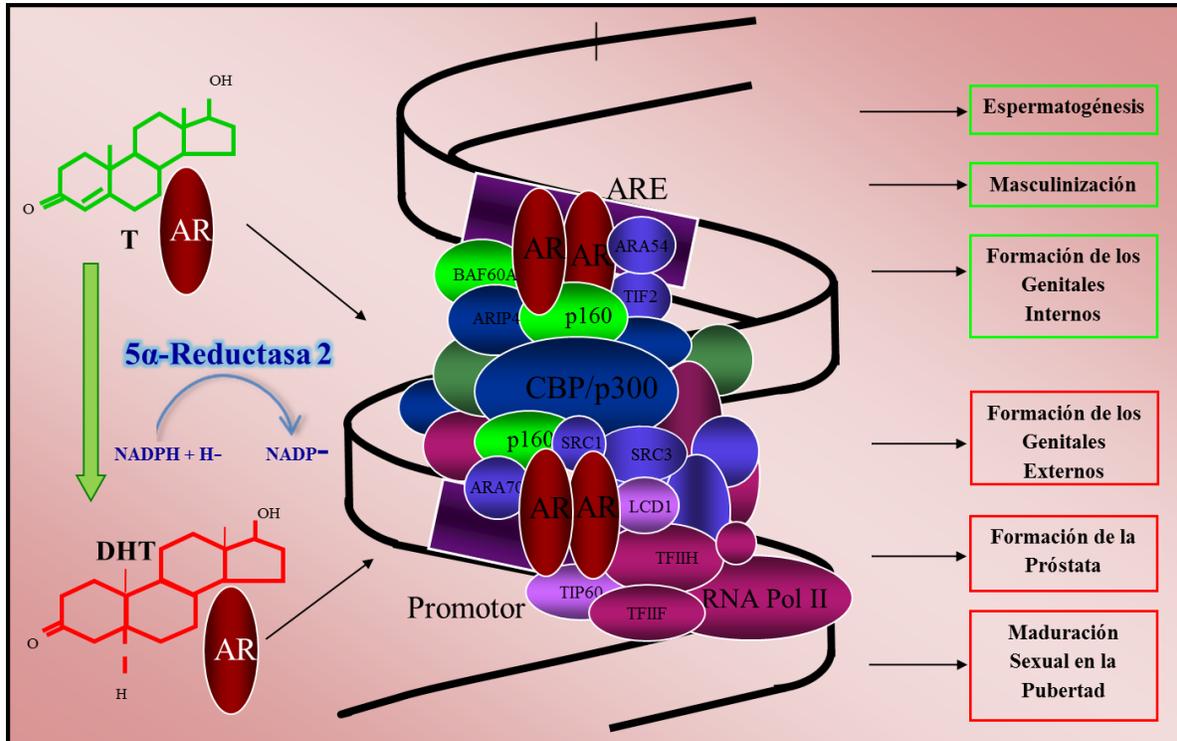
---

## 5 $\alpha$ -reductasa 2

La 5 $\alpha$ -esteroide reductasa 2 (EC:1.3.99.5; SRD5A2) es una enzima microsomal dependiente de NADPH, la cual desempeña un papel fundamental en la diferenciación sexual humana y la fisiología de los andrógenos. Durante el desarrollo embrionario esta isoenzima es clave para la transformación de T en DHT, considerada esta última la única responsable de inducir los mecanismos de diferenciación sexual que conllevarán al desarrollo de los genitales externos masculinos y la próstata (Fig. 7). Además, la actividad de la SRD5A2, parece estar asociada con la etiología de varias alteraciones endocrinas, tales como la hiperplasia prostática benigna, la alopecia androgenética, el acné, el hirsutismo femenino y, muy posiblemente, el cáncer de próstata.

El gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 (*SRD5A2*) se localiza en el cromosoma 2 (región p23) y está constituido por 5 exones y 4 intrones que abarcan aproximadamente 56-kb del DNA genómico (Labrie et al., 1992). En humanos, el *SRD5A2* codifica una proteína hidrofóbica de 254 aminoácidos con una talla estimada de 29,000 Da. Alrededor del 37% de los residuos de aminoácidos presentan cadenas laterales comúnmente encontradas hacia el interior hidrofóbico de las proteínas globulares (Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Val); estos aminoácidos hidrofóbicos se distribuyen a lo largo de la enzima y sugieren la presencia de al menos 4 regiones transmembranales. De igual forma, no se ha encontrado evidencia de modificación postraduccional de la enzima 2 (por ejemplo, fosforilación, acilación, isoprenilación). Estas características estructurales sugieren que la 5 $\alpha$ -reductasa-2 es una proteína intrínseca de membrana profundamente incrustada en la bicapa lipídica (Russell y Wilson, 1994).

A la fecha los datos proporcionan muy poca información sobre la estructura tridimensional de la 5 $\alpha$ -reductasa-2, por lo que son necesarios estudios estructurales para determinar el plegado correcto de la proteína.



**Fig. 7.** Representación esquemática de la reacción enzimática catalizada por la 5 $\alpha$ -reductasa-2 y su papel central en la diferenciación sexual masculina. La testosterona y DHT se unen al mismo receptor pero ejercen efectos fisiológicos diferentes. La interacción de testosterona y AR (receptor de andrógenos) regula la producción de gonadotropinas, la espermatogénesis y la formación de los genitales internos (conductos deferentes, vesícula seminal y epidídimo). La unión de DHT al AR regula la virilización de genitales externos en escroto, pene y uretra peneana.

---

---

El análisis mutacional del gen *SRD5A2* y la determinación de las constantes cinéticas realizadas por Russell y Wilson (1994) indicaron que las sustituciones que afectan la unión a T se sitúan en los extremos terminales de la proteína, mientras que las mutaciones que alteran la unión a NADPH se encuentran en la parte media. Con base en estas observaciones, ellos sugirieron un arreglo no lineal en el dominio funcional de la enzima.

Diversos estudios sugieren la necesidad de ampliar los ensayos de mutagénesis y determinar la estructura tridimensional, con la finalidad de describir las bases bioquímicas de los dominios o aminoácidos funcionales del sitio activo en la *SDR5A2*.

### **Genética Molecular del *SRD5A2***

Los estudios de genética molecular han demostrado claramente que la formación insuficiente de DHT causada por mutaciones en el gen *SRD5A2*, resultan en “deficiencia de 5 $\alpha$ -esteroide reductasa 2”, una forma específica de DDS-46,XY (Desordenes del Desarrollo Sexual 46,XY). La deficiencia de 5 $\alpha$ -esteroide reductasa 2 es una enfermedad relativamente rara que resulta en concentraciones bajas de DHT y diferenciación incompleta de los genitales externos. Los sujetos afectados son individuos 46,XY que presentan al nacimiento genitales ambiguos, caracterizados comúnmente por la presencia de genitales internos masculinos (vasos deferentes, vesículas seminales y epidídimo) y genitales externos femeninos (labios mayores y menores y un vagina corta que termina en fondo ciego); o bien pueden presentar micropene y una próstata hipoplásica. Los ductos Müllerianos están ausentes. Sin embargo, los derivados Wolffianos están bien diferenciados, excepto por los ductos eyaculatorios los cuales terminan en el saco vaginal o el perineo, cerca de la uretra. Los testículos se encuentran

---

---

en el canal inguinal o en los pliegues labio-escrotales y debido a su apariencia fenotípica, a estos pacientes se les asigna casi siempre un rol social femenino (Wilson et al., 1993).

En la pubertad ocurre la virilización y el *habitus* corporal es muscular caracterizado por crecimiento del falo hasta 5 cm de longitud, los pliegues labio-escrotales se tornan rugosos y pigmentados, los testículos aumentan de tamaño y descienden hacia los pliegues labio-escrotales; estos sujetos no desarrollan ginecomastia. En forma interesante, no hay desarrollo de acné, crecimiento de vello facial ni crecimiento prostático, lo que indica que estos cambios son dependientes de DHT. En un estudio de sujetos afectados de la República Dominicana, se describió que casi todos aquellos que fueron inicialmente criados como niñas, adoptaron un género masculino durante la pubertad. El perfil hormonal en los adultos se caracteriza por concentraciones plasmáticas bajas de DHT, a pesar de las concentraciones relativamente altas de T, lo que conlleva a una proporción T/DHT mayor a 36 (normal 8-16). Las concentraciones séricas de LH son elevadas, sugiriendo un papel de DHT en la retro-alimentación negativa a nivel hipotalámico y las concentraciones de FSH son normales o altas, lo que refleja daño en tubos seminíferos. En el periodo posnatal, la proporción T/DHT es alta. Durante la infancia y la niñez, la administración de hCG resulta en una concentración sérica de T normal, pero una concentración sérica de DHT subnormal (Wilson et al., 1993).

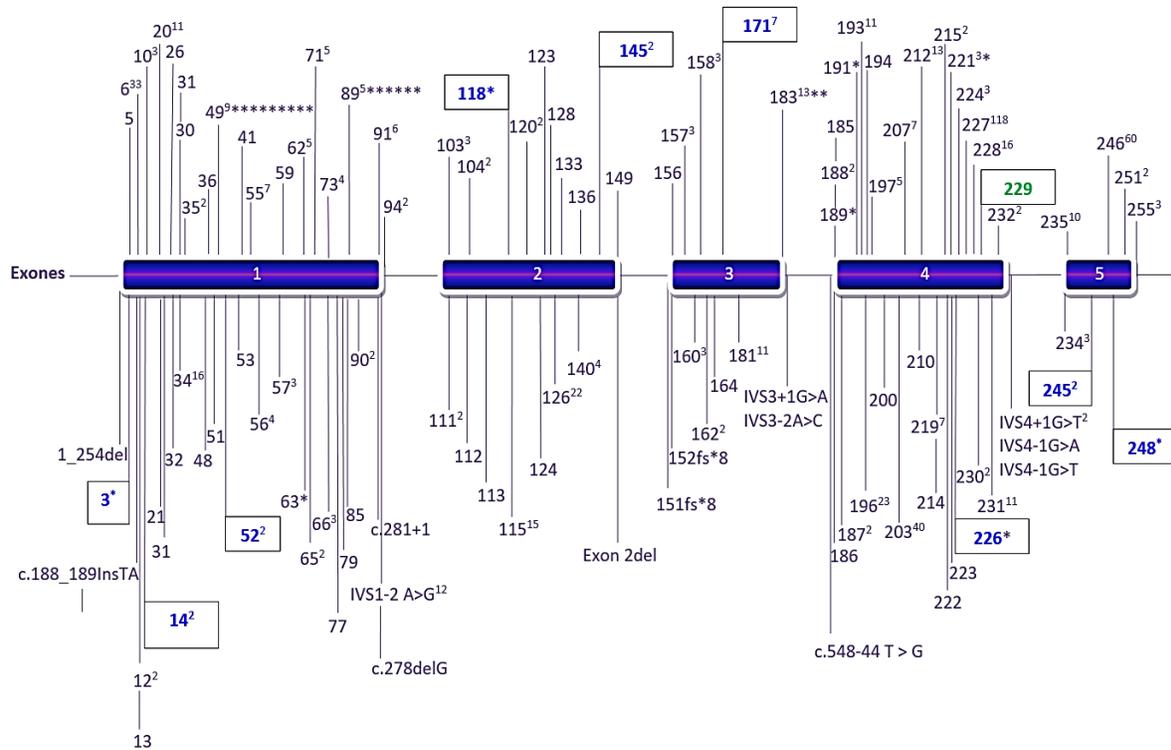
El DDS-46,XY debido a deficiencia de  $5\alpha$ -esteroide reductasa 2 tiene un patrón hereditario autosómico recesivo, no obstante se han reportado varios casos de pacientes con solo un alelo afectado, además de un caso único de disomía uniparental (Chávez et al., 2000). Los sujetos afectados pueden ser homocigotos, heterocigotos compuestos o heterocigotos simples. Sin embargo, el fenotipo anormal en estos últimos es difícil de explicar, particularmente por el

---

---

modo de transmisión de esta deficiencia enzimática. Las alteraciones génicas en el *SRD5A2* no tienen repercusiones fenotípicas en las mujeres de manera que las portadoras homocigotas o heterocigotas se desarrollan con normalidad y son completamente fértiles (Chávez et al., 2000; Chávez et al., 2014).

A la fecha se han reportado 114 alteraciones génicas diferentes del *SRD5A2* en pacientes con deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2, esto incluyendo inserciones y deleciones de base simple, mutaciones erróneas, sin-sentido y sinónimas, además de una delección completa del gen y al menos 3 variantes polimórficas (Fig. 8). De éstas, aproximadamente el 65% son mutaciones de base simple que provocan cambio de aminoácido. Adicionalmente, se ha documentado la ocurrencia de alteraciones en el *SRD5A2* en otras patologías del humano como lo son las hipospadias no sindrómicas y el cáncer de próstata; no obstante, en el caso del CaP solo se han encontrado mutaciones somáticas y no como alteraciones de la línea germinal (Makridakis et al., 2004). Tanto en la deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2, como en las otras alteraciones, prácticamente la totalidad de las mutaciones reportadas a la fecha son mutaciones inactivantes; esto es, abolen o reducen en forma drástica la actividad de la enzima. Estas mutaciones introducen una señal de terminación prematura o bien implican un cambio de aminoácido; estas modificaciones se han detectado a lo largo de la región codificante y todas afectan, ya sea la región de unión del sustrato o al cofactor NADPH, resultando en proteínas truncadas o en productos catalíticamente inactivos.



**Fig. 8.** Localización de las mutaciones del *SRD5A2* reportadas a la fecha. Los números en superíndice indican las alteraciones recurrentes que han sido asociadas a deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2, mientras que los asteriscos muestran las veces que han sido vinculadas a cáncer de próstata. En azul se indican las mutantes estudiadas en este trabajo y en color verde se indica una nueva mutación.

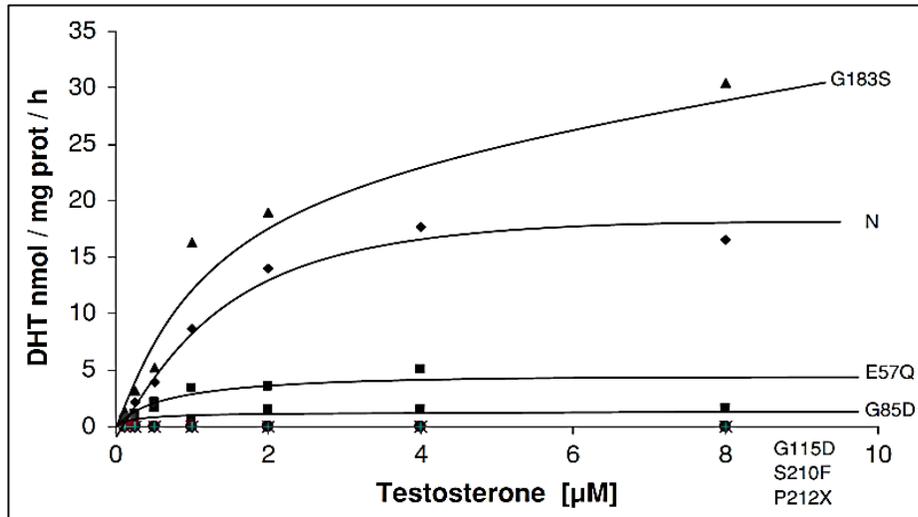
Nuestro grupo de investigación ha descrito alrededor de 30 casos de esta deficiencia en familias no relacionadas, en las cuales se encontraron 15 mutaciones de base simple diferentes, incluyendo dos mutaciones sin sentido (R227X y P212X) y el resto son mutaciones erróneas distribuidas a lo largo de la región codificante, con un gran número de ellas, localizadas en el exón 4 (21/29) lo que representa casi un 85% del total de las mutaciones encontradas (Vilchis et al., 2000; 2010). La recurrencia de alteraciones génicas en este sitio específico del exón 4 ha subrayado la importancia del cuarto dominio transmembranal (aa. 206-226) como una región crítica para el correcto funcionamiento de la *SRD5A2*. Con base

---

---

en resultados de estudios moleculares previos, se ha sugerido que el exón 4 podría ser un sitio propenso a mutaciones inactivantes en el *SRD5A2* (Vilchis et al., 2008). Si bien la mayoría de las variantes reportadas del *SRD5A2* (exceptuando las mutaciones erróneas o las deleciones completas del gen) son consideradas (de facto) deletéreas, el análisis minucioso y sistemático de los casos descritos, indica que solamente en un porcentaje muy bajo de estos, se ha demostrado su efecto potencialmente patogénico.

Se considera que de las 114 mutaciones registradas existe poca información sobre los estudios bioquímicos y sus consecuencias enzimáticas en poco menos de 15 de ellas. Por ejemplo, las enzimas mutantes como, S31F, I161L o G183S al ser expresadas en células HEK293 exhiben una  $K_m$  y una  $V_{max}$  más alta que el gen silvestre (Vilchis et al., 2008; 2010), lo cual ha sugerido que existen variantes con fenotipo dominante que resultan en mutaciones activantes. En apoyo a este planteamiento, datos derivados del análisis cinético de enzimas mutadas descritas en biopsias de adenocarcinoma prostático (Makridakis et al., 2004), indican que ciertas mutaciones erróneas en *SRD5A2* (V3I, F118L y A248V) incrementan significativamente la actividad *in vitro* de la 5 $\alpha$ -reductasa, de tal manera que alteran sus propiedades bioquímicas y farmacológicas. Los valores para  $K_m$  y  $V_{max}$  de las enzimas mutantes son elevados cuando se comparan con los de la forma silvestre, sugiriendo así, que estas sustituciones son variantes génicas activantes (Fig. 9).



**Fig. 9.** Actividad enzimática *in vitro* de las variantes génicas del SRD5A2 reportadas. N= tipo silvestre. Las mutantes son indicadas como G183S, E57Q, G115D, S210F y P212X (Imagen tomada de Vilchis et al., 2008).

Asimismo, las variantes polimórficas A49T (rs523349) y V89L (rs9282858) han sido asociadas con una mayor predisposición al cáncer prostático, al desarrollo de hipospadias e inclusive con un alto riesgo de desarrollar cáncer ovárico, debido a una mayor actividad enzimática que posee en comparación al alelo silvestre; sin embargo los resultados disponibles distan mucho de apoyar tales afirmaciones.

---

---

## JUSTIFICACIÓN

Las observaciones realizadas por nuestro grupo de investigación han sugerido que no todas las alteraciones génicas en *SRD5A2* asociadas a deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2, abolen o abaten la actividad catalítica de la enzima. Actualmente, se han estudiado las consecuencias bioquímicas sólo en el 20% de las mutantes reportadas. Aunado a esto, la mayoría de la información proviene básicamente de ensayos enzimáticos realizados en fibroblastos con mutaciones y en menor grado deriva de estudios funcionales, en los que se recrean las alteraciones mediante mutagénesis sitio dirigida. Con base en lo anterior y a que nuestro grupo de investigación ha descrito alrededor de 30 casos de esta deficiencia en familias mexicanas no relacionadas (Vilchis et al., 2000; 2010), nosotros creemos importante analizar el impacto funcional sobre la actividad de la enzima de las mutaciones descritas en esta patología.

---

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la literatura las alteraciones bioquímicas generadas por mutaciones en el gen *SRD5A2* han sido escasamente estudiadas. Asimismo, existe poca información sobre la identificación del sitio activo (unión a NADPH o testosterona) de la 5 $\alpha$ -reductasa 2. A la fecha, los escasos estudios sobre los dominios de la enzima provienen del análisis mutacional del gen. En conjunto la información actual sugiere realizar ensayos de mutagénesis y bioquímicos, con el objetivo de identificar los aminoácidos del sitio activo de la *SRD5A2*.

En este proyecto analizamos los parámetros cinéticos de diez mutantes descritas por nuestro grupo de investigación en familias mexicanas no relacionadas e incluimos una mutación nueva, la sustitución F229S.

---

---

## HIPÓTESIS

Las mutantes simples V3I, S14R, A52T, F118L, R145W, R171S, L226P, F229S, S245Y y A248V en el gen *SRD5A2* generarán variantes de la enzima inactivas.

---

---

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Generar mediante mutagénesis sitio dirigida variantes de la SRD5A2 y determinar *in vitro* su efecto sobre las propiedades cinéticas de la enzima.

### Objetivos Específicos

- 1.- Recrear mediante mutagénesis dirigida diferentes mutantes simples (V3I, S14R, A52T, F118L, R145W, R171S, L226P, F229S, S245Y y A248V).
- 2.- Expresar en ensayos de transfección transitoria en células eucariontes HEK293 cada una de las variantes génicas referidas en el objetivo específico 1, con el fin de cuantificar su actividad enzimática, utilizando extractos celulares y [<sup>3</sup>H]-testosterona como sustrato.
- 3.- Establecer el efecto que tiene cada una de las variantes génicas del *SRD5A2* sobre la capacidad enzimática, determinando los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  del testosterona, en ensayos enzimáticos *in vitro*.
- 4.- Implementar el uso de programas de computación para predecir el posible impacto de las sustituciones sobre la función de la proteína.

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Mutantes

Previamente, nuestro grupo de investigación ha identificado mediante PCR y SSCP (estudio conformacional del polimorfismo de cadena sencilla) y secuenciación una serie de mutaciones puntuales en pacientes con DDS 46,XY asociados clínicamente a deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2. Las mutaciones recreadas y estudiadas en este proyecto fueron las siguientes: V3I, S14R, A52T, F118L, R145L, R171S, L226P, F229S, S245Y y A248V. Se consideró como enzima tipo silvestre a la SRD5A2 con L89 y debido a que previamente hemos determinado que la mutación P212R abole la actividad catalítica de la enzima se utilizó dicha variante como control negativo. Además, como control de transfección se utilizaron células HEK293 sin plásmido o sin transfectar.

### Diseño de Oligonucleótidos

El conjunto de oligonucleótidos que se emplearon en la mutagénesis dirigida para cada una de las variantes se diseñaron mediante el programa QuikChange Primer Design (<http://www.genomics.agilent.com/>). Las características que presentaron los dos oligonucleótidos fueron: contener la mutación deseada en la mitad del oligonucleótido, ser complementarios y opuestos a la misma secuencia del *SRD5A2* sin modificar, tener una longitud entre 25 y 45 pares de bases, presentar un contenido mínimo de GC del 40% y terminar en una o más bases C o G (Tabla 1).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos sintéticos utilizados para amplificar mediante PCR las mutantes del SRD5A2. El codón afectado está subrayado y en color rojo se indica el nucleótido mutante.

Variante	Nombre de la secuencia	Número de bases	Secuencia 5'-3'
<b>V3I</b>	V3I5	27	cggcgcgatgcag <u>att</u> cagtccagca
	V3I3	27	tgctggcact <u>gaat</u> ctgcatcgcgccg
<b>S14R</b>	S14R5	25	gtgctggcaggc <u>cg</u> cgccactttgg
	S14R3	25	ccaaagtggc <u>cg</u> gcctgccagcac
<b>A52T</b>	A52T5	23	caggaacc <u>agg</u> tggcgcgggctg
	A52T3	23	cagcccgcgc <u>acct</u> ggttctg
<b>F118L</b>	F118L5	31	catttcagtgca <u>gag</u> ggcagtgctctgag
	F118L3	31	ctcagaggcactgcc <u>ctct</u> gcactggaatg
<b>R145L</b>	R145L5	36	ccaagctaaa <u>cca</u> atgtctgtgtaccaccatcag
	R145L3	36	ctgatgggtggtacacagacata <u>tggt</u> ttagcttgg
<b>R171S</b>	R171S5	35	ctgatttccaggct <u>act</u> gagctggcgcaatat
	R171S3	35	atattgcgccagctc <u>agt</u> aagcctggagaatcag
<b>L226P</b>	L226P5	33	gtggtgaaaagctcgc <u>cg</u> gcccaaggaaacaaag
	L226P3	33	ctttgttcttgggc <u>cg</u> cgagcttttcaccac
<b>F229S</b>	F229S5	31	cctatggtggtg <u>aga</u> agctcgagcccaagg
	F229S3	31	ccttgggctgcgagct <u>ctc</u> caccacatagg
<b>S245Y</b>	S245Y5	35	taaggcttcc <u>gat</u> atttgggtagtctcaaac
	S245Y3	35	gtttgaggactaccccaaat <u>at</u> tcggaagccctta
<b>A248V</b>	A248V5	39	aagatgaatggaataagg <u>a</u> ctttccgagatttgggtag
	A248V3	39	ctaccccaaatctcgaaag <u>gtc</u> cttattccattcatctt

---

---

## **PCR y determinación de la $T_m$ (temperatura de fusión)**

Para determinar la  $T_m$  específica de los oligonucleótidos para cada mutante se realizó una PCR en gradiente de temperatura (58 °C a 66 °C). Las reacciones se realizaron al mezclar 12.5 µL de la solución GoTaq Long PCR Master Mix 2X (Promega), 1 µl del oligonucleótido 5' (20 µM), 1 µl de oligonucleótido 3' (20 µM), 2 µl de DNA plasmídico que contenía el cDNA para la SRD5A2 y se llevarán a un volumen final de 25 µl con H<sub>2</sub>O. Las reacciones se amplificaron con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94 °C durante 3 minutos; 18 ciclos a 94 °C por 30 segundos, el gradiente de temperatura (60-66 °C) por 10 segundos y a 68 °C por 2.45 minutos. Finalmente 1 ciclo de 3 minutos a 72 °C. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador de 96 pozos (Veriti, Applied Biosystems).

## **Análisis en geles de agarosa**

Se tomaron 5 µl de los amplicones obtenidos por PCR y se les adicionaron 3 µl de solución de carga (azul de bromofenol 0.25%, cianol xileno 0.25% y ficol 400 15.0%). La mezcla se depositó en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt o Midori Green (Nippon Genetics EUROPE GmbH, Düren; Germany). Las muestras se sometieron a electroforesis y se corrieron a 100 volts durante 1 hora. Los geles se analizaron en un transiluminador (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ System). Se utilizaron marcadores de peso molecular de 100 y 1000 pares de bases (pb) para identificar el peso esperado.

---

---

## Mutagénesis Sitio Dirigida

Para recrear las mutantes se utilizaron 70-100 ng del vector de expresión pCMV6-XL4 clona SC119922 de Origene (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD) el cual contiene el cDNA completo del gen *SRD5A2* humano (Fig. 10). Los vectores mutantes se construyeron optimizando el sistema de mutagénesis dirigida QuikChange® Lightning de Agilent Technologies (Santa Clara, CA). Este procedimiento involucra tres etapas consecutivas:

### 1) Síntesis de la cadena mutante

La reacción se realizó con 5 µl de la solución amortiguadora 10X, 2 µl de pCMV-XL4 (100 ng), 1 µl (125 ng) del oligonucleótido 5', 1 µl (125 ng) del oligonucleótido 3', 0.5 µl de la mezcla de dNTPs (10 nM), 0.75 µl del reactivo QuikSolution y se llevó a un volumen final de 50 µl con H<sub>2</sub>O dd. Finalmente, se agregaron 0.5 µl de la enzima QuikChange Lightning. Los parámetros de amplificación fueron: 1 ciclo de 3 minutos a 95 °C, 18 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 10 segundos a la temperatura específica de cada par de oligonucleótidos, 2.45 minutos a 68 °C y 1 ciclo de 5 minutos a 68 °C.

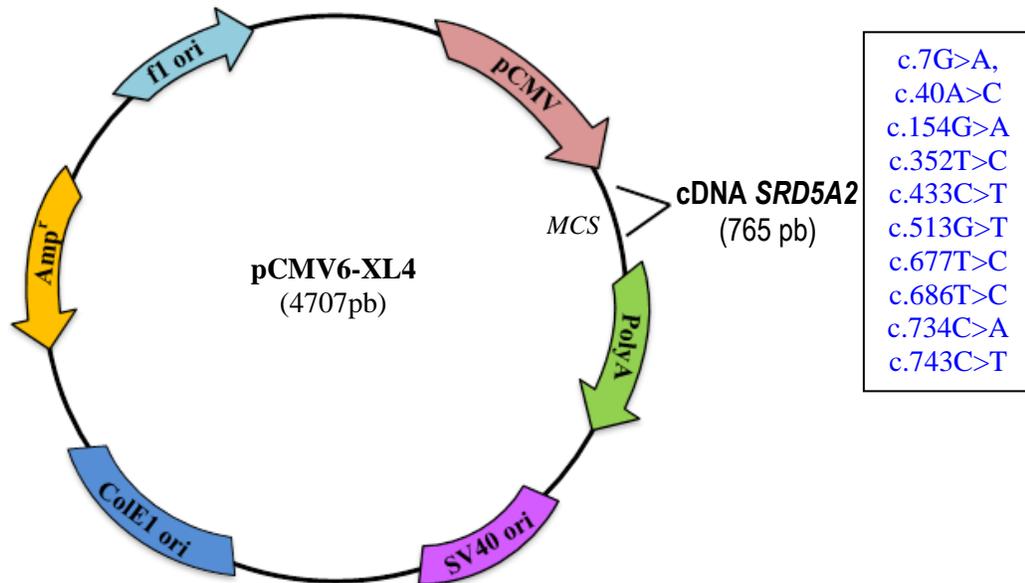
### 2) Digestión de los productos de PCR con *DpnI*

Los amplicones se transfirieron a tubos de 0.5 ml, se agregó 1 µl de la enzima *DpnI* a cada reacción de amplificación (DNA-*DpnI*). Se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C durante 5 minutos.

---

### 3) *Transformación de las células ultra-competentes XL10 Gold*

Se hicieron alícuotas con 45  $\mu$ l de células ultra competentes XL10-Gold y se agregaron 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, se mezclaron y se incubaron sobre hielo durante 2 minutos. Se transfirieron 2  $\mu$ l del complejo DNA-DpnI de cada reacción a las alícuotas de células ultra-competentes. Las reacciones de transformación se mezclaron suavemente y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. Los tubos se calentaron en baño maría a 42 °C durante 30 segundos, transcurrido el tiempo se incubaron sobre hielo por 2 minutos. Posteriormente, se agregaron 0.5 ml de medio NZY (10 g de caseína hidrolizada, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 12.5 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 M, 12.5 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 20 ml de glucosa 2 M) a cada tubo y se incubaron a 37 °C por 1 hora con agitación a 225 rpm (Heidolph UNIMAX 1010 + Inkubator 1000). Las células XL10-Gold transformadas se sembraron en placas LB-agar (32 g de medio agar LB, Invitrogen, 5 g de NaCl) con 100  $\mu$ g/ml ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C. Las colonias transformadas se inocularon en 7 ml de medio LB (20 g de medio caldo LB, Invitrogen, 5 g de NaCl) con 100  $\mu$ g/ml ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación horizontal. El DNA plasmídico se aisló utilizando el kit GenElute™ Five-Minute plasmid Miniprep de Sigma Aldrich.



**Fig. 10.** Esquema del plásmido utilizado para la construcción de vectores de expresión mutantes con el cDNA de la SRD5A2. Se observan las regiones de importancia para el adecuado funcionamiento y análisis. pCMV= promotor de Citomegalovirus, MCS= sitio de clonación múltiple, PolyA= señal de poliadenilación, SV40 ori= origen de replicación, ColE1 ori= origen de replicación, Amp<sup>r</sup>= gen de resistencia a Ampicilina, fl ori= origen de replicación.

### **Aislamiento y purificación del plásmido (Minipreparación)**

El DNA plasmídico para cada mutante se aisló de los cultivos anteriores utilizando el kit GenElute™ Five-Minute plasmid Miniprep de Sigma Aldrich, que contiene el siguiente protocolo: en un tubo colector de 2 ml se agregaron 400 µL de cultivo bacteriano y 40 µL de la solución *Reconstituted Lysis*. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 2 minutos. Se agregaron 400 µl de *Binding Solution* al lisado y se mezcló por inversión 15 veces. La mezcla se colocó en una columna de unión y se sometió a centrifugación (Microcentrifuga Eppendorf 5415 C) durante 20 segundos a máxima velocidad. El eluido se descartó y se adicionaron 700 µl de *Washed Solution* a la columna.

---

---

Se centrifugó durante 30 segundos y se decantó el eluido. La columna se transfirió a un tubo colector limpio y se agregaron 30 µl de solución de elución directamente en el filtro. Se centrifugó durante 30 segundos. El DNA eluido se recolectó y se analizó mediante restricción.

#### *1) Restricción enzimática*

Se realizó una restricción enzimática utilizando 2 µl de solución amortiguadora 10X (Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, Ditioneitol 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5), 0.5 µl de enzima XbaI, 5 µl de DNA y se llevó a un volumen final de 20 µl con H<sub>2</sub>O. La reacción se incubó durante 2 horas a 37 °C. Al término de la incubación los productos digeridos se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt o Midori Green.

### **Aislamiento y purificación del plásmido (Maxipreparación)**

Las clonas analizadas y seleccionadas (clona con un único fragmento de talla esperada de aproximadamente 800 pares de bases) por restricción enzimática se inocularon en 100 ml de medio LB (75 µg/ml ampicilina) y se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación a 225 rpm. Para realizar la extracción de DNA plasmídico por maxipreparaciones, se utilizó el kit PureYield™ Maxi Binding (Promega, Madison, WI, USA) y se siguieron las indicaciones del proveedor: a partir de 100 ml de medio LB se obtuvo el botón celular por centrifugación a 1000 xg durante 10 minutos a TA. El sobrenadante se descartó, se agregaron 12 ml de Cell Resuspension Solution y se agitó vigorosamente hasta resuspender el botón celular. Se adicionaron 12 ml de Cell Lysis Solution, se mezcló suavemente y se incubó por 3 minutos a TA. Se adicionaron 12 ml de Neutralization Solution al lisado celular y se mezcló

---

---

suavemente. La mezcla se centrifugó a 12,000 xg durante 20 minutos a TA. Se ensambló la columna Blue PureYield™ Clearing dentro de la columna White PureYield™ Maxi Binding, ambas columnas se colocaron en un puerto colector de vacío. El lisado se colocó dentro de la columna azul y se aplicó vacío hasta que el líquido pasó por ambas columnas. La columna azul se descartó y se conservó la columna blanca. Se adicionaron 5 ml de *Endotoxin Removal Wash* a la columna, la columna se conectó a una llave con vacío, posteriormente se agregaron 20 ml de *Column Wash*, se accionó el vacío durante 5 minutos. Se colocó la columna PureYield™ Maxi Binding dentro de un tubo Falcon de 50 ml y se agregó 1 ml de H<sub>2</sub>O Nuclease-Free directamente a la membrana de la columna de unión. Se sometió a centrifugación en un rotor oscilante a 1000 xg por 5 minutos. Se recolectó el eluido que contenía el DNA plasmídico y se almacenó a -20 °C.

### **Secuenciación del gen *SRD5A2***

El DNA plasmídico purificado con la mutante deseada para cada construcción (100 ng) se analizó en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando el estuche BigDye Terminator v3.1 de Applied Biosystems. Las reacciones se realizaron al mezclar 2.0 µL de la solución BigDye Terminator Reaction Mix, 1.0 µl de la solución BigDye Buffer Solution 5X, 1.0 µl de oligonucleótido 5' o 3' (1.6 pmol), 1.0 µl de DNA plasmídico (100 ng) y se llevaron a un volumen final de 10 µl con H<sub>2</sub>O. Las reacciones se amplificaron con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94 °C durante 5 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 10 segundos y a 72 °C por 2.45 minutos. Finalmente 1 ciclo de 3 minutos a 72 °C. Los resultados obtenidos se examinaron

---

---

en el programa ChromasLite 2.1.1 ([www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)). Las secuencias se analizaron al menos tres veces en ambos sentidos para verificar la integridad del DNA.

### **Transfección de células HEK293**

Un día antes de la transfección se sembraron 600,000 células HEK293 en microplacas de 6 pozos (diámetro 34.8 mm) que contenían 2 ml de medio DMEM (Medio esencial mínimo de Eagle) y SFT (suero fetal de ternera) al 10%. Asimismo, se preparó el DNA plasmídico a una concentración de 2 µg/µl con solución amortiguadora TE (Tris 1.0 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.5).

Para realizar la transfección se utilizó el estuche FuGene® HD Transfection Reagent (Roche) y en cada reacción se preparó un complejo de transfección que contenía 100 µl de DMEM libre de suero y sin antibiótico, 2 µg de DNA plasmídico y 6 µl del reactivo FuGene HD Transfection. Se agitó vigorosamente el complejo FuGene HD Transfection/DNA y se incubó a TA durante 15 minutos. Al término de la incubación se adicionó homogéneamente el complejo de transfección sobre las células, las cuales se incubaron 24 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Actividad de 5α-esteroide reductasa 2 en células HEK293**

Para desprender las células HEK293 se retiró el medio DMEM, se agregó 1 ml de SSI (solución salina isotónica) y se raspó el fondo de cada pozo. Las células obtenidas se colocaron en tubos falcón de 15 ml y se centrifugaron a 1000 xg por 10 min, transcurrido el

---

---

tiempo se decantó el SSI y se resuspendió el botón celular en 1.0 ml de SSI. Las células se sonicaron 3 veces durante 5 segundos a 4 °C.

Se prepararon mezclas de reacción con 90 µl del sonicado celular, 100 µl de una solución Tris-citrato (0.1 M, pH 5.5), 10 µl de NADPH (concentración final 0.5 mM), 400,000 dpm [<sup>3</sup>H]-testosterona y diferentes concentraciones de testosterona no radiactiva (curva de saturación 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 µM). Las mezclas se incubaron durante 15 minutos a 37°C con agitación continua y al finalizar el periodo de incubación, a cada tubo se le agregó 1 ml de acetato de etilo saturado con SSI. Las muestras se agitaron vigorosamente durante 1 minuto y se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 *xg*; la fase orgánica se recuperó en un tubo de fondo cónico. El proceso de extracción se realizó tres veces. Las muestras se evaporaron con nitrógeno y a continuación se adicionaron 500 µl de metanol a cada tubo, se tomó una alícuota de 10 µl y se agregó en un vial con 5 ml de líquido de centelleo. Las muestras se homogenizaron por vortex y se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo líquido (Packard 1900 TR, A Canberra Company). Con base a la medición radiactiva se tomaron 100,000 dpm de cada extracto, se colocaron en tubos de fondo cónico y se agregaron 80 µl (1 µg/µl) de mezcla de estándares internos (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -androstandiol, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -androstandiol, testosterona, DHT,  $\Delta^4$  androstendiona y 5 $\alpha$ -androstandiona). Las muestras se dejaron evaporar a temperatura ambiente toda noche, posteriormente se adicionaron 6 gotas de una solución metanol-cloroformo (1:1) a cada tubo. Los esteroides se aplicaron con capilares en cromatoplasas de silica gel, posteriormente las cromatoplasas se introdujeron en dos cámaras de elución saturadas; el sistema 1 que contenía cloroformo-metanol (98:2.5) y el sistema 2 con cloroformo-éter anhidro (90:10). Las placas se colocaron primero en el sistema 1 hasta que el frente del eluyente se situó próximo a la parte superior de la cromatoplasa, se dejó secar y se introdujo en el sistema 2 hasta que el frente llegó a la parte

---

---

superior. Una vez secas, las placas se rociaron con una solución reveladora que contenía 0.5 ml de paranisaldehído, 50 ml de ácido acético, 1 ml de ácido sulfúrico y se calentaron. Se recortaron los fragmentos correspondientes a cada esteroide, los cuales se colocaron en viales, se les adicionó 1 ml de etanol (EtOH) absoluto y se agitó con el vortex durante 1 minuto. Seguido se agregaron 5 ml de líquido de centelleo, los viales se agitaron y se cuantificó la radiactividad en el contador de centelleo líquido. Para determinar las propiedades enzimáticas de cada mutante y controles, se cuantificó las proteínas totales utilizando el reactivo de Bradford (azul de Coomassie, EtOH al 95%, ácido fosfórico al 85%, H<sub>2</sub>O dd), asimismo, se preparó una curva estándar con BSA. Las muestras se prepararon con 100 µl del sonicado celular y 5 ml del reactivo de Bradford, se agitó con vortex y se leyeron en un espectrofotómetro (Beckman DU 650 Spectrophotometer) a una longitud de 595 nanómetros.

### ***Análisis in silico***

Los resultados obtenidos para cada mutante fueron analizados utilizando los programas bioinformáticos de predicción de patogenicidad PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer; [http://provean.jcvi.org/seq\\_submit.php](http://provean.jcvi.org/seq_submit.php)), SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant amino acid substitutions; [http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_enst\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html)) y MUPRO (predictions of protein stability changes upon mutations; <http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>).

El programa PolyPhen-2 identifica la proteína en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot y el análisis que realiza se fundamenta en la comparación de secuencias homólogas, el uso de información filogenética y características estructurales de dicha proteína. La mayoría de estas

---

---

características implican la comparación de una propiedad del alelo de tipo silvestre y la propiedad correspondiente al alelo mutante.

Para determinar la gravedad de una sustitución de aminoácidos, el programa SIFT utiliza como parámetro la conservación de la secuencia de proteínas secuencias homólogas. SIFT supone que las posiciones importantes en una secuencia de proteínas se conservan a lo largo de la evolución y, por lo tanto, los cambios en estas posiciones pueden afectar la función de la proteína.

El análisis del programa PROVEAN se realiza mediante la comparación de la secuencia de referencia y variante de una proteína con respecto a sus homólogos recopilados en la base de datos NCBI, por medio de BLAST. El parámetro de identidad de secuencia global debe corresponder mínimo al 75%

El programa MUpro desarrolla un análisis en un gran conjunto de datos de mutación mediante el uso de máquinas de soporte vectorial para predecir cambios en la estabilidad de la proteína. Este programa aprovecha tanto la secuencia de la proteína como la información estructural de mutaciones de aminoácidos individuales.

---

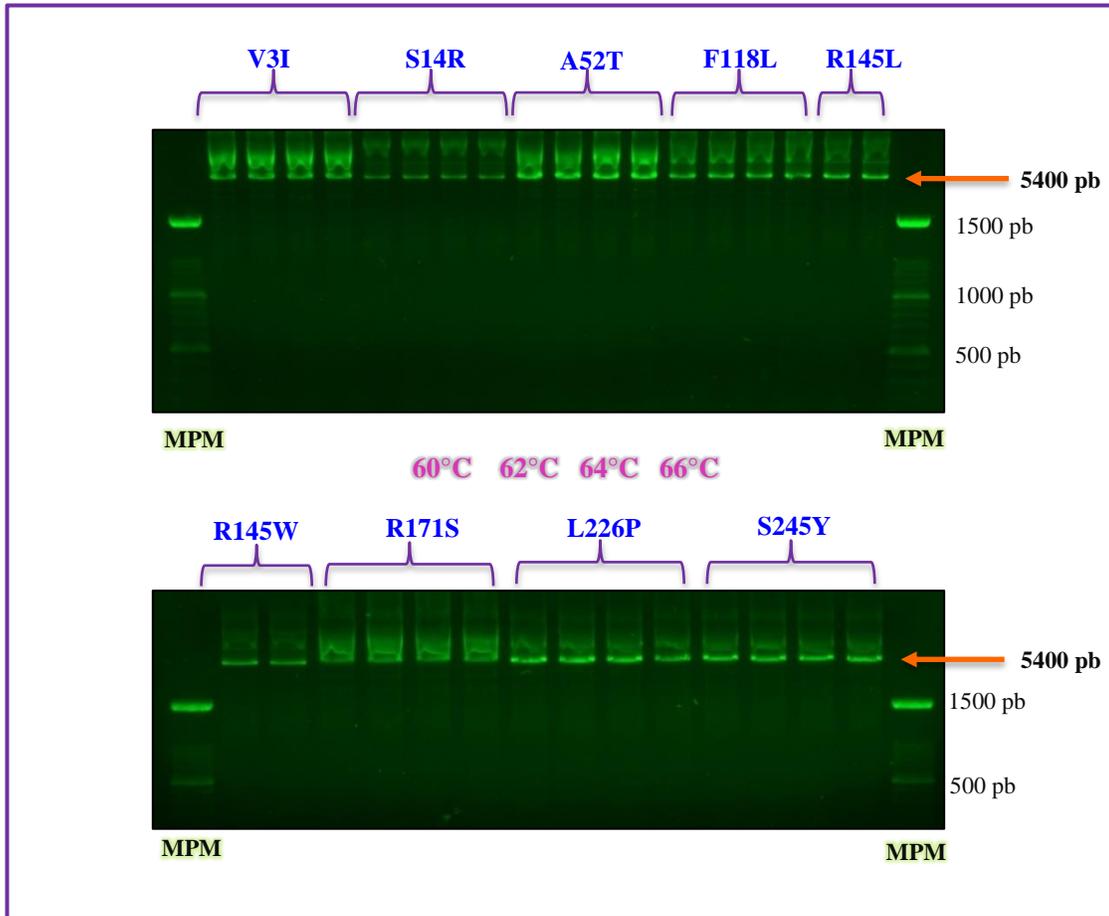
---

## RESULTADOS

### Diseño de oligonucleótidos

Con la finalidad de recrear las mutaciones identificadas en pacientes con deficiencia de 5 $\alpha$ -esteroide reductasa 2, se utilizó la base de datos del banco de genes ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) para obtener la secuencia del gen *SRD5A2* de humano (NM\_000348.3) y a partir de esta se diseñaron los oligonucleótidos mutagénicos con el programa QuikChange Primer Design. Los oligonucleótidos se adquirieron por el proveedor Integrated DNA Technologies (Iowa, Estados Unidos).

Mediante un PCR en gradiente de temperatura y el análisis electroforético de los amplicones (Fig. 11) se determinó la  $T_m$  óptimo de cada par de oligonucleótidos (Tabla 2).



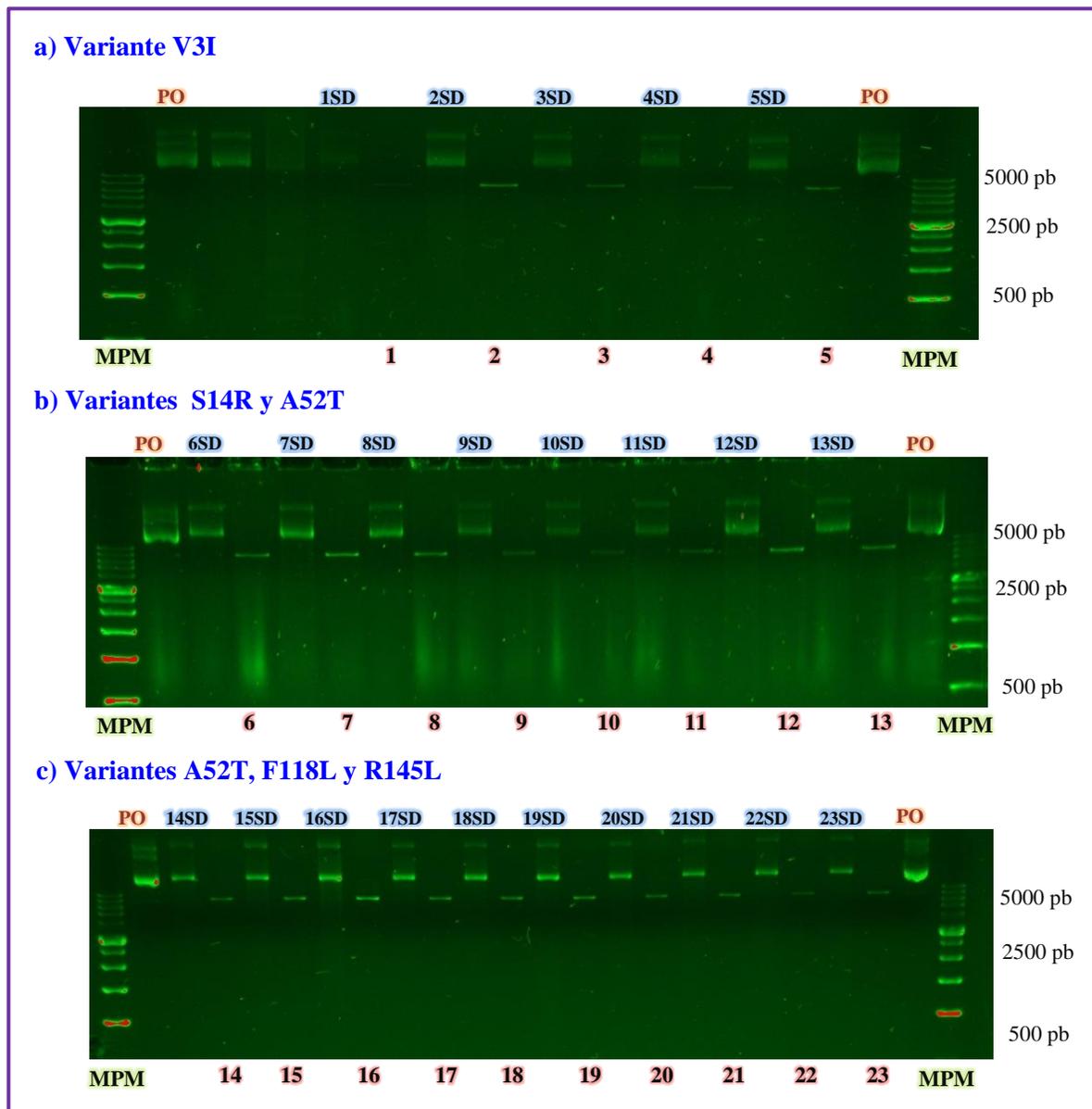
**Fig. 11.** Esquema representativo de algunos de los amplicones (flecha) obtenidos mediante PCR en gradiente de temperatura. Se indican las variantes analizadas y las temperaturas utilizadas. MPM de 100 pb.

**Tabla 2.** Temperatura de fusión óptima de oligonucleótidos mutagénicos.

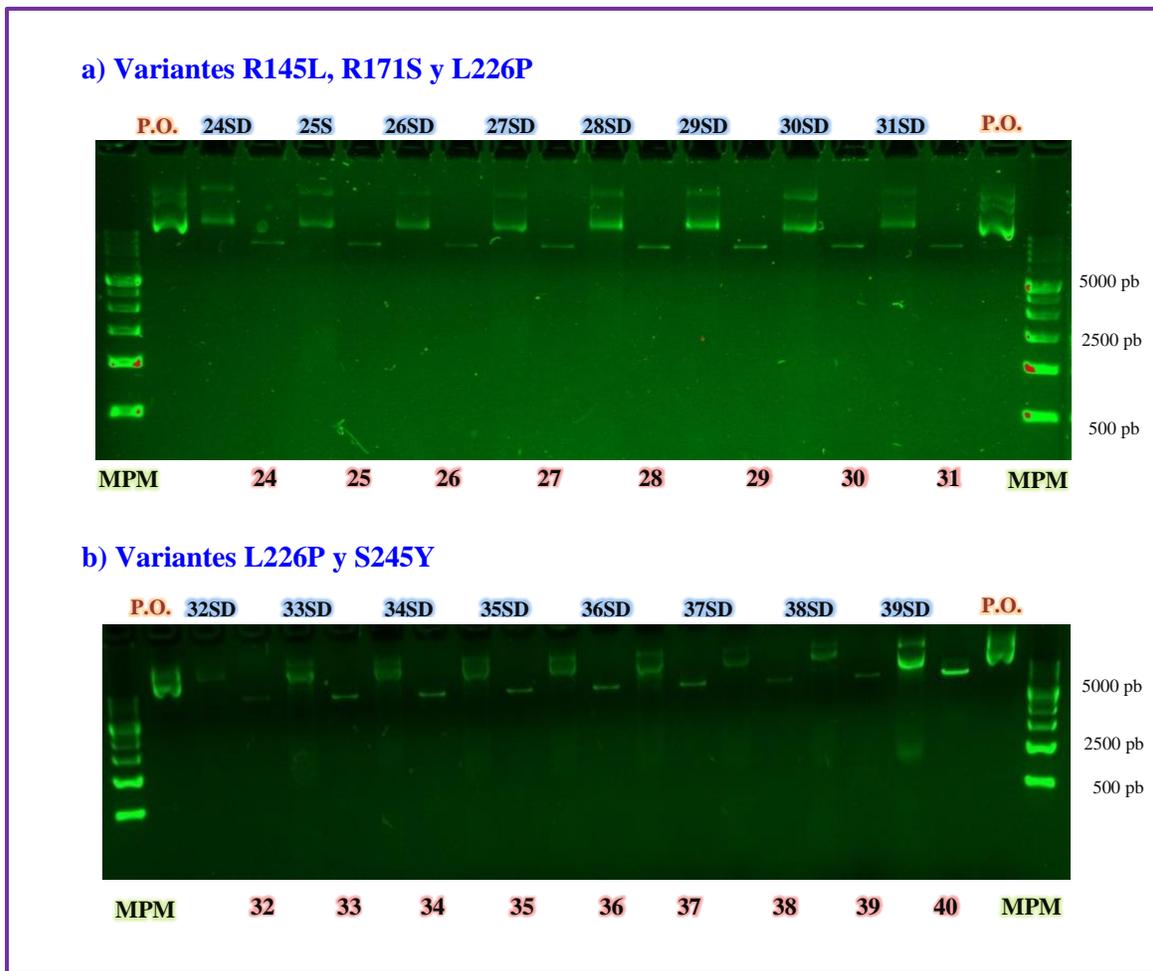
<b>Variante</b>	<b>Oligo 5'</b>	<b>Oligo 3'</b>	<b>Tm óptima</b>
<b>V3I</b>	V3I5	V3I3	60°C
<b>S14R</b>	S14R5	S14R3	60°C
<b>A52T</b>	A52T5	A52T3	60°C
<b>F118L</b>	F118L5	F118L3	60°C
<b>R145W</b>	R145W5	R145W3	60°C
<b>R171S</b>	R171S5	R171S3	60°C
<b>L226P</b>	L226P5	L226P3	60°C
<b>F229S</b>	F229S5	F229S3	60°C
<b>S245Y</b>	S245Y5	S245Y3	60°C
<b>A248V</b>	A248V5	A248V3	60°C

### **Mutagénesis sitio dirigida**

Una vez establecidas las condiciones óptimas de cada par de oligonucleótidos se realizaron cada una de las reacciones de mutagénesis dirigida. Los vectores resultantes se introdujeron en bacterias ultra-competentes, las cuales se hicieron crecer durante una noche en medio de cultivo selectivo. El DNA plasmídico para cada mutante se aisló, purificó y analizó mediante restricción enzimática, con el objetivo de verificar la presencia del plásmido y el fragmento correspondiente al gen *SRD5A2* (Fig. 12 y 13).



**Fig. 12.** Esquema representativo del DNA plasmídico analizado mediante restricción enzimática con XbaI (linealización del plásmido). Los números indican la clona analizada. a) La numeración del 1-5 corresponden a la variante V3I. b) Del 6-10 a la variante S14R y del 11-13 al cambio A52T. c) Los números 14 y 15 pertenecen a la variante A52T, del 16-20 a la F118L y del 21-23 a R145L. PO= plásmido original, SD= clona sin digerir. MPM de 1000 pb.



**Fig. 13.** Esquema representativo del DNA plasmídico analizado por restricción enzimática con XbaI (linealización del plásmido). Los números indican la clona analizada. a) El número 24 corresponde a la variante R145L, del 25-30 al cambio R171S y el número 31 a L226P. b) Del 32-35 corresponden a la variante L226P, mientras que del 36-40 a S245Y. P.O.= plásmido original, SD= clona sin digerir. MPM de 1000 pb.

---

---

## Secuenciación del gen *SRD5A2*

Para los análisis de secuenciación se eligieron al menos dos clonas de cada mutante; los resultados fueron seleccionados con base en la presencia de un plásmido con la talla esperada de ~5400 pares de bases y linealizado mediante restricción para confirmar la integridad estructural. El DNA plasmídico de las clonas seleccionadas se utilizó para realizar ensayos de secuenciación Sanger con la finalidad de determinar la presencia de las sustituciones nucleotídicas correspondientes.

Los resultados indicaron la presencia de una transición G>C en la posición 7 de la secuencia nucleotídica del *SRD5A2*. La sustitución generó el cambio de una valina por una isoleucina (V3I) en el aminoácido 3 (Fig. 14). Los análisis de predicción de patogenicidad mostraron que exclusivamente en el programa MUpro la estabilidad de la proteína *SRD5A2* disminuía (Tabla 3).

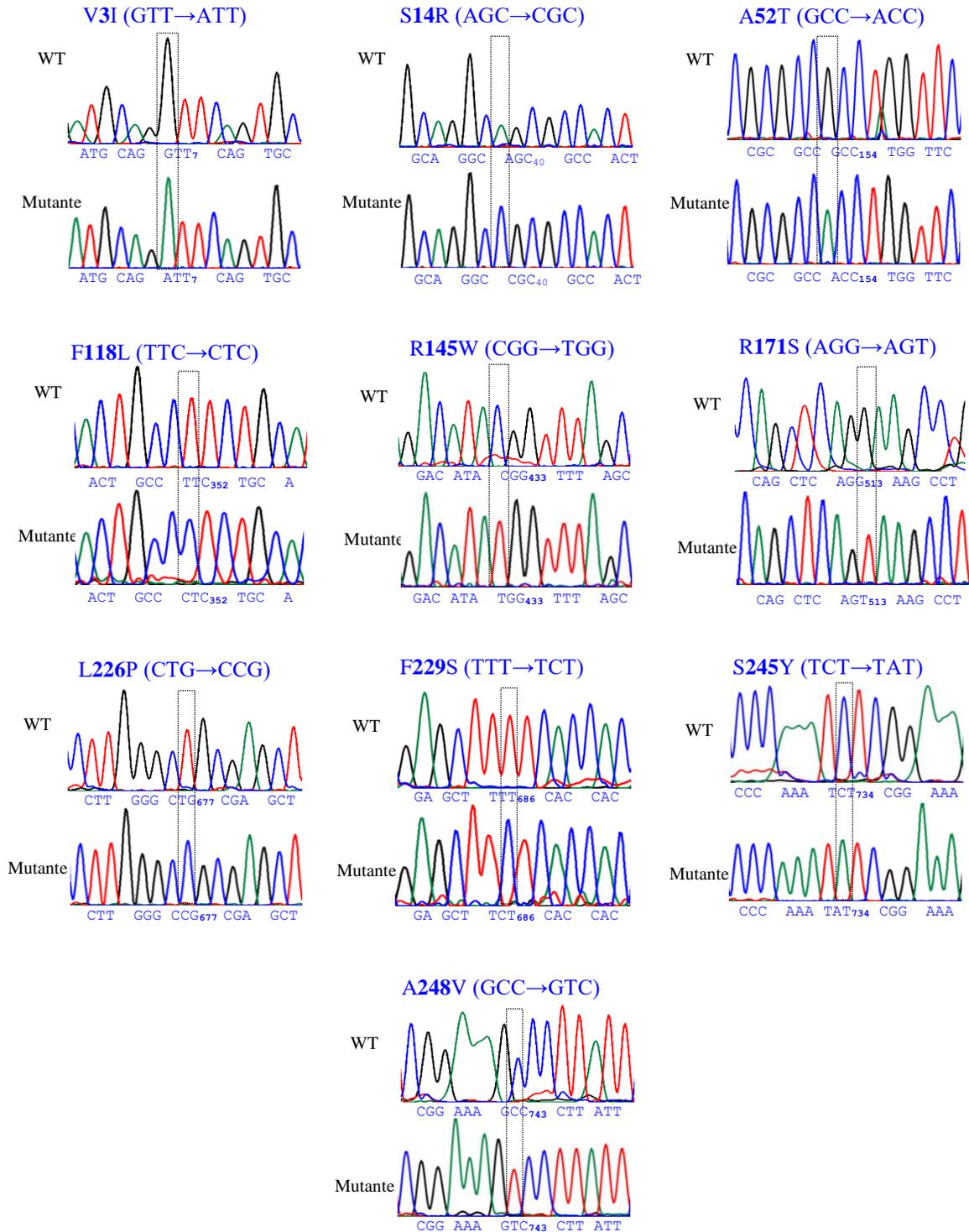
Los ensayos de secuenciación mostraron una alteración A>C en el nucleótido 40, la transversión originó una sustitución de serina a arginina en el aminoácido 14 (S14R). Los análisis bioinformáticos mostraron un daño probable en la enzima *SRD5A2* mediante PolyPhen2 (Fig. 14; Tabla 3).

---

---

Mediante secuenciación se determinaron las transiciones G>A, T>C y C>T localizadas en las posiciones 154 (c.154G>A), 352 (c.352T>C) y 433 (c.433C>T) del cDNA de la SRD5A2, respectivamente (Fig. 14). Estas alteraciones ocasionaron un cambio de una alanina por una treonina en el codón número 52 (A52T), una substitución de fenilalanina por leucina en el codón 118 (F118L) y un cambio de arginina por triptófano en el codón 145 (R145W). En los estudios *in silico* se observó que las tres mutaciones reportadas presentaban un probable daño a la enzima, con un efecto deletéreo y una menor estabilidad de la proteína, así como una mutación que afecta la función de la proteína y causante de enfermedad (Tabla 3).

Los análisis de secuencia indicaron la presencia de una transversión G>T en el nucleótido 513 del cDNA (c.513G>T) que codifica para la SRD5A2, la mutación génica ocasionó un cambio en el codón 171 (Fig. 14) el cual generó un intercambio de una arginina por una serina (R171S). Los ensayos predictivos mediante los cinco programas señalaron un probable daño al mostrar una asociación a enfermedad con decremento en la estabilidad de la proteína, asimismo una mutación que afecta la función de la proteína (Tabla 3).



**Fig. 14.** Secuencia nucleotídica parcial del *SRD5A2* de humano en pacientes con deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2. En color azul se indica la sustitución de aminoácidos y el cambio de nucleótidos en la secuencia tipo silvestre (WT).

---

---

Estudios de secuenciación del cDNA-SRD5A2 caracterizaron dos transiciones tipo T>C en las posiciones 677 y 686 (c.677T>C y c.686T>C). Las mutaciones determinadas originaron dos cambios en los codones 226 y 229 que generaron un cambio de leucina por prolina (L226P) y fenilalanina por serina (F229S), respectivamente (Fig. 14). Los programas de predicción para conocer los efectos funcionales de ambas substituciones indicaron ser causantes de enfermedad con decremento de la estabilidad en la enzima (Tabla 3).

Una transversión C>A localizada en la posición 734 (c.734C>A) fue identificada mediante secuenciación, la transversión se encuentra en el codón 245 (Fig. 14) y genera el cambio de una serina por tirosina (S245Y). La substitución mostro ser deletérea, con decremento en la estabilidad y causante de enfermedad mediante tres estudios *in silico* para predecir la patogenicidad de la enzima (Tabla 3).

Los análisis de predicción señalaron que la mutación A248V produce un probable daño a la enzima y un decremento en la estabilidad de la proteína (Fig. 14, Tabla 3).

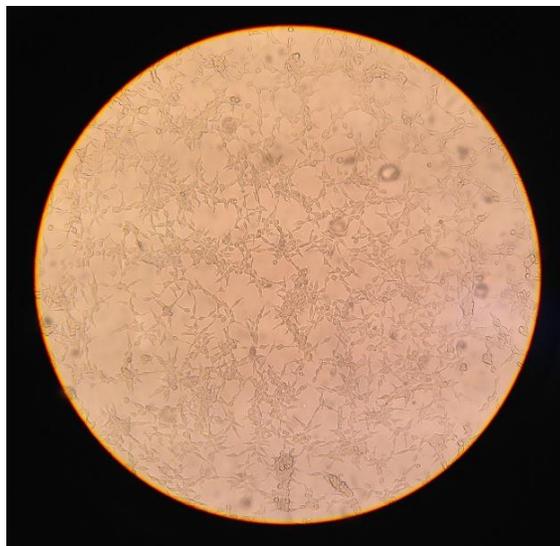
**Tabla 3.** Análisis y predicción *in silico* de la patogenicidad y efectos funcionales de las sustituciones erróneas determinadas en la enzima SRD5A2.

Gen	Localización	Substitución nucleotídica	Substitución a.a.	PolyPhen2	PROVEAN	SIFT	MUpro
<i>SRD5A2</i>	Exon 1	c.7G>A	V3I	Benigno	Neutral	Tolerada	Decrementa estabilidad
	Exon 1	c.40A>C	S14R	Daño probable	Neutral	Tolerada	Incrementa estabilidad
	Exon 1	c.154G>A	A52T	Daño probable	Deletéreo	Afecta la función	Decrementa estabilidad
	Exon 2	c.352T>C	F118L	Daño probable	Deletéreo	Afecta la función	Decrementa estabilidad
	Exon 2	c.433C>T	R145W	Daño probable	Deletéreo	Afecta la función	Decrementa estabilidad
	Exon 3	c.513G>T	R171S	Daño probable	Deletéreo	Afecta la función	Decrementa estabilidad
	Exon 4	c.677T>C	L226P	Benigno	Neutral	Tolerada	Decrementa estabilidad
	Exon 4	c.686T>C	F229S	Benigno	Neutral	Tolerada	Decrementa estabilidad
	Exon 5	c.734C>A	S245Y	Benigno	Deletéreo	Tolerada	Decrementa estabilidad
	Exon 5	c.743C>T	A248V	Daño probable	Neutral	Tolerada	Decrementa estabilidad

---

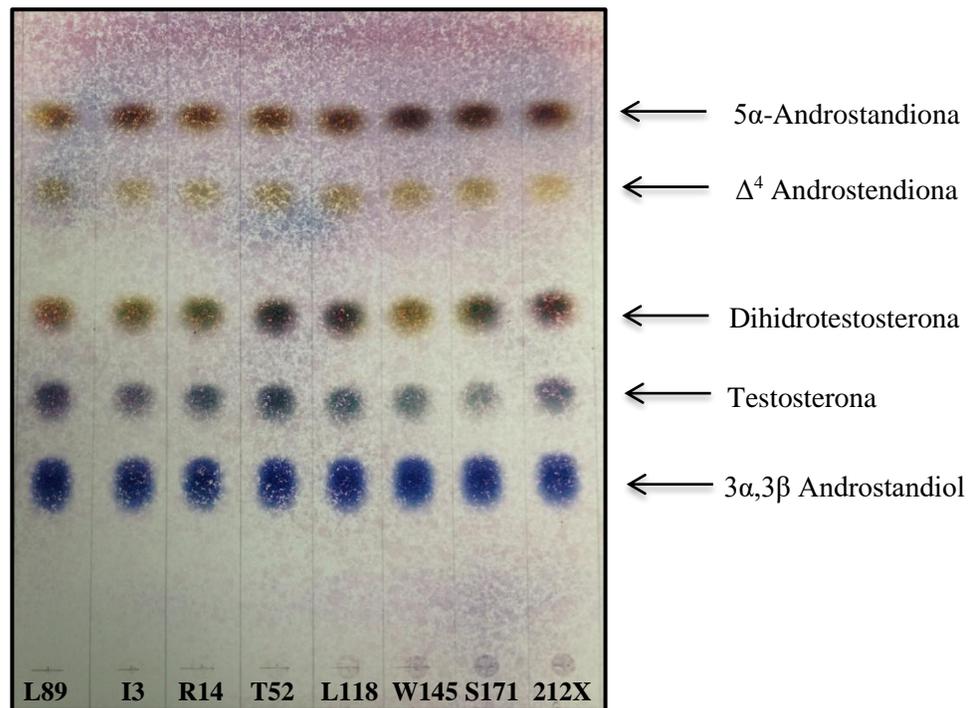
## Actividad de 5 $\alpha$ -esteroide reductasa 2 en células HEK293

Después de determinar la secuencia nucleotídica de los plásmidos y con la finalidad de conocer la actividad de 5 $\alpha$ -esteroide reductasa de las enzimas mutantes y WT, las construcciones se introdujeron en células HEK293 (Fig.15) mediante transfección transitoria.



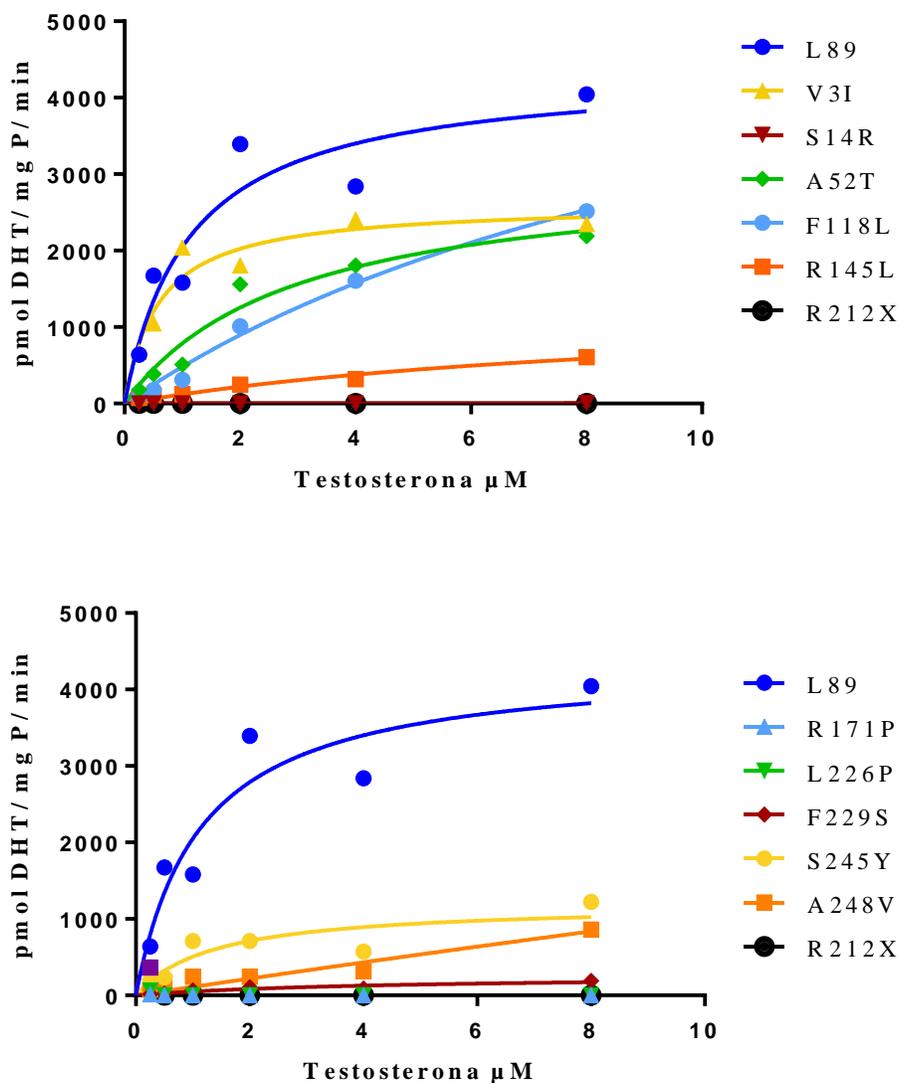
**Fig. 15.** Foto representativa de células HEK293 cultivadas y transfectadas con el cDNA de SRD5A2 de humano. Objetivo 100X, microscopio Karl Zeiss modelo ID03.

Las células transfectadas se incubaron y transcurridas 24 horas se obtuvo la fracción microsomal, la cual se incubó en presencia de [ $^3$ H]-testosterona. Posteriormente, para identificar y aislar la [ $^3$ H]-DHT formada en cada mutante, se realizó la separación de esteroides mediante cromatografía en placa fina (Fig. 16) utilizando un estándar de acarreadores.



**Fig. 16.** Imagen representativa de la cromatografía en capa fina para la extracción de esteroides. Las bandas de colores indican la presencia de los diferentes andrógenos (señalados con flechas) utilizados en el estándar de acarreadores. En la parte inferior se indica la posición del WT y las mutantes analizadas.

Finalmente, para caracterizar la actividad de  $5\alpha$ -reductasa 2 se cuantificó la formación de [ $^3\text{H}$ ]-DHT (pmol de DHT) por miligramo de proteína (mg P) del extracto celular por hora (h); se utilizó como control negativo la mutación P212R y el control positivo fue L89. Como se muestra en la Fig.17, la enzima que contiene el cDNA WT (L89) catalizó la reducción de T a DHT adecuadamente. En contraste, las curvas de saturación para V3I, A52T, F118L, R171S y R145L mostraron una disminución en la formación de DHT, particularmente en el último caso. Además los resultados para la mutante S14R indicaron que la formación de DHT fue indetectable.



**Fig. 17.** Actividad de 5 $\alpha$ -reductasa 2 expresada en células HEK293. Las curvas de saturación para la enzima silvestre (L89) y las enzimas mutantes se determinaron midiendo la conversión de [ $^3$ H]-testosterona en DHT con concentraciones crecientes de testosterona sin marcar (0,25-8,0  $\mu$ M). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Las constantes cinéticas se determinaron al analizar los datos obtenidos mediante el método de regresión no lineal. En la Tabla 4, se encuentran los valores de la afinidad enzimática ( $K_m$ ), capacidad catalítica ( $V_{max}$ ) y la eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) de las proteínas SRD5A2 normales y mutantes.

**Tabla 4.** Constantes cinéticas de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 silvestre y mutantes. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  (media  $\pm$  D.E., n = 3) se determinaron mediante regresión no lineal. La eficiencia catalítica está representada por la relación  $V_{max}/K_m$ . ND: ningún producto detectable.

Gen	Substitución de aminoácido	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (pmol/mg P*min)	$V_{max}/K_m$ ( pmol/mg P*min* $\mu$ M)
<i>SRD5A2</i>	L89 (wt)	0.76 $\pm$ 0.1	4044 $\pm$ 197	5321
	V3I	0.62 $\pm$ 0.2	2612 $\pm$ 170	4281
	S14R	ND	ND	ND
	A52T	2.6 $\pm$ 1.1	2640 $\pm$ 180	1015
	F118L	0.24 $\pm$ 0.1	1044 $\pm$ 285	4350
	R145W	1.77 $\pm$ 0.5	512 $\pm$ 31	293
	R171S	ND	ND	ND
	L226P	ND	ND	ND
	F229S	0.16 $\pm$ 0.1	224 $\pm$ 0.89	1400
	S245Y	0.7 $\pm$ 0.1	992 $\pm$ 44	1417
	A248V	1.39 $\pm$ 0.2	585 $\pm$ 85	421

---

---

## DISCUSIÓN

La 5 $\alpha$ -reductasa 2 desempeña un papel fundamental en la diferenciación sexual humana ya que al reducir el doble enlace de testosterona se induce la formación de DHT; un andrógeno con mayor potencia biológica que es necesario para el desarrollo de los genitales externos masculinos y la próstata.

Las mutaciones en el gen *SRD5A2* han sido asociadas con deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2, un trastorno autosómico recesivo reportado en pacientes 46,XY con DDS. Los rasgos clínicos reproductivos se caracterizan comúnmente por la presencia de genitales internos masculinos (conductos deferentes, vesículas seminales y epidídimo) y genitales externos femeninos (labios mayores y menores y una pseudovagina corta que termina en un fondo ciego), así como hipospadias, micropene y próstata hipoplásica. Hasta ahora, se han documentado aproximadamente 638 alteraciones y sólo 114 variantes genéticas son diferentes. Existen variantes recurrentes en el gen *SRD5A2* que han sido descritas en diferentes grupos étnicos y se ha observado que dichas variantes se localizan con mayor frecuencia en los codones 196, 203 y 227; mientras que en la población mexicana se ha encontrado una alta frecuencia para la mutación P212R debido al efecto fundador (Vilchis et al., 2010). En este sentido, nuestro grupo de investigación sugiere que el exón 4 es un sitio de alta incidencia mutacional en pacientes y esta región podría desempeñar un papel esencial en la formación de DHT durante el proceso de diferenciación del sexo masculino. No obstante el impacto de las alteraciones genéticas del locus *SRD5A2* sobre las propiedades catalíticas de la enzima, la cinética enzimática ha sido escasamente estudiada.

---

---

Actualmente, se han estudiado las consecuencias bioquímicas sólo en el 20% de las mutantes reportadas y aunque la estructura tridimensional de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 no ha sido dilucidada hasta la fecha, las evidencias mutacionales han sugerido la existencia de dos conjuntos de aminoácidos funcionales que podrían estar involucrados en la unión de testosterona y NADPH.

En este proyecto analizamos diez mutaciones descritas por nuestro grupo de investigación en familias mexicanas no relacionadas e incluimos una mutación nueva, la sustitución F229S. Las mutaciones analizadas se localizan a lo largo de los cinco exones del gen *SRD5A2*. Estas alteraciones fueron recreadas mediante mutagénesis dirigida y con el objetivo de determinar su efecto sobre las propiedades de la enzima, los estudios posteriores estuvieron enfocados en determinar y caracterizar las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ . Asimismo, las herramientas bioinformáticas indicaron que las alteraciones secuenciadas presentaban patogenicidad y daños en la funcionalidad de la enzima.

La primera alteración recreada fue la transición G>C en el codón 3, codificando una proteína con sustitución no sinónima (V3I). La proteína mutante presentó disminución en la actividad enzimática para testosterona en comparación con la enzima de tipo silvestre (L89). Esto indica que la enzima mutante conserva una considerable eficiencia catalítica, sin embargo hay una disminución en la síntesis de DHT. El programa MUpro señala un descenso en la estabilidad de la proteína *SRD5A2*. Los datos obtenidos sugieren que el decremento en la actividad enzimática de la mutante V3I es suficiente para generar un fenotipo clínico con deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2.

---

---

La alteración A>C en el nucleótido 40 originó una sustitución de serina por arginina en el aminoácido 14 (S14R), resultando en una enzima que pierde por completo su actividad catalítica (no se detectó formación de DHT). Este resultado concuerda con el programa PolyPhen2 el cual indicó un probable daño funcional en la enzima codificante. Los análisis de comparación de secuencia (datos no mostrados) han sugerido que el residuo S14 es crucial, ya que se encuentra altamente conservado (100%) entre las especies de vertebrados. Nosotros concluimos que la mutación p.S14R es la causante de los desórdenes en la virilización normal de los genitales externos por una completa pérdida de función de la enzima para formar DHT.

La sustitución A52T ocasionó que la enzima exhibiera un incremento en el valor de la  $K_m$ , esto sugiere que la mutante T52 reduce la afinidad de unión a testosterona; además se presentó una disminución moderada en la capacidad catalítica. Las modificaciones en los parámetros cinéticos originan que el valor de la eficiencia catalítica ( $K_m/V_{max}$ ) se afecte hasta en un 80% en comparación con la SRD5A2 silvestre. Por otra parte, los cuatro programas bioinformáticos indicaron que la mutación A52T ocasiona daño severo a la actividad de la enzima. Por lo tanto, los resultados indican que la mutación A52T altera significativamente la actividad enzimática de la  $5\alpha$ -reductasa 2 lo que conlleva al desarrollo de la ambigüedad genital.

En nuestros resultados encontramos que la variante F118L afectó la función enzimática, ya que el valor de  $K_m$  indica una mayor afinidad por testosterona. Lo anterior podría sugerir que el complejo enzima-testosterona podría estar inhibiendo la formación de DHT, esto es evidente al observar que el valor de  $V_{max}$  (261 pmol/mgP/h) de la enzima mutante disminuye

---

---

significativamente respecto a la enzima silvestre. Por otra parte, los programas de predicción de patogenicidad indican que la mutación afecta severamente la funcionalidad de la proteína. Los datos en conjunto sugieren que el residuo 118 es importante para la unión del sustrato y que una modificación en esta región podría afectar la catálisis de la 5 $\alpha$ -reductasa 2. Hasta ahora, esta mutación ha sido asociada con cáncer de próstata y se reportó una mayor actividad de 5 $\alpha$ -reductasa, mientras que la eficiencia catalítica se redujo en aproximadamente un 50% (Makridakis et al., 2004).

Los ensayos bioquímicos con la mutante R145W reflejan una disminución en la capacidad de catálisis y una eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) que sólo se alcanza el 5% de eficiencia en comparación con la enzima silvestre; en apoyo a estos resultados, nuestro análisis de predicción indica que esta alteración afecta drásticamente la función de la proteína. En la población de Nueva Guinea, Italia y el sur de China se han reportado pacientes con hipospadias que se relacionan con la presencia de la mutación W145 (Mazen et al., 2003).

El análisis mutacional del exón 3 reveló una transición c.513G>T que genera la alteración R171S, un residuo altamente conservado. Este cambio provoca la inactivación completa de la enzima, por lo que la T no sufre la reducción de su doble enlace en el carbono 5. Asimismo, los ensayos predictivos mediante los cuatro programas señalaron que esta sustitución es patogénica, lo cual es consistente con nuestros estudios. Con base en nuestros resultados, sugerimos que este residuo tiene un papel esencial en la actividad de la SRD5A2. La mutación se ha descrito en pacientes caucásicos/hispanos, mexicanos, españoles, turcos e italianos con deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2, en los últimos dos grupos étnicos se encontraron en condición heterocigota. Similar a otros reportes la actividad enzimática no fue

---

---

determinada y, a la fecha, sólo un trabajo experimental ha sugerido la importancia de las argininas 145 y 171 para unir NADPH de manera correcta.

Los resultados bioquímicos para la sustitución c.677T>C mostraron que esta mutación abate por completo la actividad enzimática. Sobre esto, nosotros especulamos que la alteración L226P genera la pérdida de función al impedir la biotransformación de testosterona. Al realizar el análisis *in silico* de L226P, el programa MUpro denotó la disminución en la estabilidad de la proteína y alta patogenicidad. A la fecha, esta mutación, así como la alteración F118L, no se han reportado o asociado en pacientes con deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2; sin embargo, en cáncer de próstata se determinó la misma sustitución sin sentido en una condición somática con un aumento de la eficiencia catalítica (Makridakis et al., 2004).

Se identificó una nueva mutación por deficiencia de esteroide 5 $\alpha$ -reductasa 2 en el exón 4 del gen *SRD5A2* (c.686T> C; F229S) y su proteína exhibió una actividad catalítica muy baja respecto a la enzima silvestre. Al igual que en la mutante F226P, el programa de predicción (MUpro) mostró que la proteína carecía de estabilidad. En estudios bioquímicos basados en líneas celulares, la mutante F229S abolió la actividad catalítica, lo que indica que las mutaciones de sentido erróneo patógenas están presentes principalmente en la región COOH-terminal, un sitio sugerido previamente como dominio de unión a testosterona y NADPH (Russell y Wilson, 1994).

Los resultados obtenidos para la mutante S245Y indican una disminución en los valores de  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  (aproximadamente del 76.3%). Interesantemente, esta mutación no modifica

---

---

la  $K_m$  lo cual indica que la unión de testosterona no se afecta aunque si su actividad o eficiencia catalítica. Existen variantes en el aminoácido 246 que han sido reportadas con una disminución en la afinidad de unión por NADPH (Thigpen y Russell, 1992; Canto et al., 1997). Estos datos pueden indicar que los residuos de Ser 245 y Arg 246 podrían ser parte del dominio de unión a NADPH de la enzima.

Los estudios bioquímicos para la mutación c.743C> T (A248V) dan como resultado una actividad enzimática significativamente reducida ( $V_{max}$  o  $V_{max}/K_m$ ) pero con un aumento en el valor de  $K_m$  para testosterona. Estos datos indican que la alteración en el aminoácido 248 disminuye la afinidad de la SRD5A2 por su ligando. Basados en estos hallazgos, nosotros sugerimos que la alanina 248 podría estar asociada al dominio de unión al sustrato testosterona. En estudios anteriores, se ha informado sobre la mutación c.743C> T en sujetos con cáncer de próstata somático y la evaluación in vitro mostró que la enzima mutante tenía una  $K_m$  y  $V_{max}$  más altas que la enzima de tipo silvestre (Makridakis et al., 2004).

En términos generales, los estudios *in silico* diseñados para las mutantes reportadas en este trabajo señalan que el programa MUpro podría presentar una mayor confiabilidad para predecir la patogenicidad que ocasionan las alteraciones génicas para la 5 $\alpha$ -reductasa 2.

---

---

## CONCLUSIONES

En conjunto, nuestros datos moleculares y bioquímicos sugieren que las mutaciones sin sentido asociadas con la deficiencia de 5 $\alpha$ -reductasa 2 afectan principalmente la eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) o resultan en una actividad enzimática disminuida; por tanto este desorden esteroidogénico abolió la expresión génica regulada por DHT. En este sentido, los efectos observados en las constantes cinéticas ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) parecen justificar la clasificación clínica de estas mutaciones y asociarlas con la diferenciación sexual anormal.

## PERSPECTIVAS

Es interesante considerar describir la estructura cristalina de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 y ofrecer una explicación estructural-dinámica de los efectos de estas mutaciones.

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW, 1991. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*, 354(6349), 159-161.

Auchus RJ, Lee TC, Miller WL, 1998. Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J Biol Chem* 273(6), 3158-65.

Bardin CW, Catterall JF, 1981. Testosterone: a major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science*, 211(4488), 1285-1294.

Bitgood MJ, McMahon AP, 1995. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, 172(1), 126-138.

Björkhem I, 1969. Mechanism and stereochemistry of the enzymatic conversion of a delta 4-3-oxosteroid into a 3-oxo-5alpha-steroid. *Eur J Biochem*, 8(3), 345-51.

Björkhem I, Holmberg I, 1973. Mechanism of enzymatic reduction of steroid double bonds. *Eur J Biochem*, 1;33(2), 364-7.

Chauhan V, Jyotsna VP, Jain V, Khadgawat R, Dada R, 2017. Novel Heterozygous Genetic Variants in Patients with 46,XY Gonadal Dysgenesis. *Horm Metab Res*, 49(1), 36-42.

Chávez B, Valdez E, Vilchis F, 2000 Uniparental disomy in steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 85(9), 3147-50.

Chávez B, Ramos L, Gómez R, Vilchis F, 2014. 46,XY disorder of sexual development resulting from a novel monoallelic mutation (p.Ser31Phe) in the steroid 5 $\alpha$ -reductase type-2 (SRD5A2) gene. *Mol Genet Gen Med* 2(4), 292-296.

---

---

Fukami M, Homma K, Hasegawa T, Ogata T, 2013. Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Dev Dyn*, 242(4), 320-329.

Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Andersson S, 1994. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 7(1),34-39

Gingras S, Simard J, 1999. Induction of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase type 1 expression by interleukin-4 in human normal prostate epithelial cells, immortalized keratinocytes, colon, and cervix cancer cell lines. *Endocrinology*. 140:4573-84.

Hanukoglu I, 1992. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43(8), 779-804.

Hiort O, 2013. The differential role of androgens in early human sex development. *BMC medicine* 11, 152.

Hiramatsu R, Harikae K, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Matsuo I, Kanai Y, 2010. FGF signaling directs a center-to-pole expansion of tubulogenesis in mouse testis differentiation. *Development* 137(2), 303-312.

Hughes IA, 2008. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22(1), 119-134.

Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, Leblanc G, Durocher F, Paquet N, 1992. Structure of human type II 5 $\alpha$ -reductase gene. *Endocrinology* 131(3), 1571-1573.

Lee-Robichaud P, Wright JN, Akhtar ME, AkhtarM 1995. Modulation of the activity of human 17-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) by cytochrome b5: endocrinological and mechanistic implications. *Biochem J* 308 (Pt 3),901-908.

---

---

Luu-The V, 2013. Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions, *J Steroid Biochem Mol Biol* 137:176-182.

Mazen I, Gad YZ, Hafez M, Sultan C, Lumbroso S, 2003. Molecular analysis of 5alpha-reductase type 2 gene in eight unrelated egyptian children with suspected 5alpha-reductase deficiency: prevalence of the G34R mutation. *Clin Endocrinol* 58 (5), 627-31.

Makridakis N, Akalu A, Reichardt JR, 2004. Identification and characterization of somatic steroid 5alpha-reductase (SRD5A2) mutations in human prostate cancer tissue. *Oncogene* 23, 7399-7405.

Miller WL, Auchus RJ, 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 32 (1), 81-151.

Miller WL, 2002. Androgen Biosynthesis from Cholesterol to Dhea. *Mol Cell Endocrinol* 198 (1-2), 7-14.

Morzycki JW, 2014. Recent advances in cholesterol chemistry. *Steroids* 83: 62-79.

Öçal G, 2011. Current concepts in disorders of sexual development. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 3(3), 105-114.

Ono M, Harley VR, 2013. Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nat Rev Endocrinol*, 9(2), 79-91.

Paliwal P, Sharma A, Birla S, Kriplani A, Khadgawat R, Sharma A, 2011. Identification of novel SRY mutations and SF1 (NR5A1) changes in patients with pure gonadal dysgenesis and 46,XY karyotype. *Mol Hum Reprod*, 17(6), 372-378.

Payne AH, Hales DB, 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25(6), 947-970.

---

---

Peltoketo H, Luu-The V, Simard J, Adamski J, 1999. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family: nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 23(1), 1–11.

Russell DW, Wilson JD, 1994. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*, 63, 25-61.

Sanderson JT, 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci* 94(1), 3-21.

Sekido R, Lovell-Badge R, 2008. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453 (7197), 930-934.

Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH, 2005. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev* 26(4), 525-82.

Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss JF, Lin D, Miller WL, Patterson D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ, Stocco DM, 1995. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(11): 4778-4782.

Vilchis F, Méndez JP, Canto P, Lieberman E, Chávez B, 2000. Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *Clin Endocrinol* 52(3), 383-387.

Vilchis F, Chávez B, 2002. Steroid Reductases. In: *Encyclopedia of molecular medicine*. John Wiley & Sons Inc, 3008-3011.

---

---

Vilchis F, Chávez B, Larrea F, Timossi C, Montiel F, 2002. The cDNA cloning and tissue expression of the cytochrome P450scc from Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Gen Comp Endocrinol* 126(3), 279-86.

Vilchis F, Valdez E, Ramos L, García R, Gómez R, Chávez B, 2008. Novel compound heterozygous mutations in the SRD5A2 gene from 46,XY infants with ambiguous external genitalia. *J Hum Genet* 53(5):401-406.

Vilchis F, Ramos L, Méndez J, Benavides S, Canto P, Chávez B, 2010. Molecular analysis of the SRD5A2 in 46,XY subjects with incomplete virilization: the P212R substitution of the steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 may constitute an ancestral founder mutation in Mexican patients. *J Androl*, 31(4), 358-364.

Wilson JD, George FW, Griffin JE, 1981. The hormonal control of sexual development. *Science* 211(4488), 1278-1284.

Wilson JD, Griffin JE, Russell DW, 1993. Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 14(5), 577-592.

Wilson JD, 1999. The role of androgens in male gender role behavior. *Endocr Rev* 20(5), 726-737.

Yao HH, Whoriskey W, Capel B, 2002. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev*, 16(11), 1433-1440.

Zhang T, Zarkower D, 2017. DMRT proteins and coordination of mammalian spermatogenesis. *Stem Cell Res*, 24, 195-202.