



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Identificación de variantes genéticas en pacientes con diagnóstico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa que acuden al Hospital Infantil de México Federico Gómez de enero 2021 a marzo de 2022

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A:

Dra. Daniela Mateo Madrigal

TUTORES:

Dra. Alejandra del Pilar Reyes de La Rosa  
Dra. Mirena Astiazarán Osornio



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2023





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.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GÓMEZ**

**AUTORIZACIONES**

---

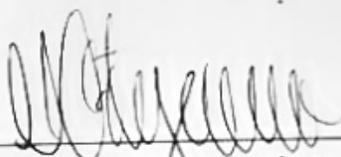
**DR SARBELIO MORENO ESPINOSA  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO HOSPITAL  
INFANTIL DE MÉXICO**

---



**DRA ALEJANDRA DEL PILAR REYES DE LA ROSA  
DIRECTORA DE TESIS  
MEDICO ADSCRITO DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA HOSPITAL  
INFANTIL DE MÉXICO**

---



**DRA. MIRENA ASTIAZARÁN OSORNIO  
ASESOR METODOLÓGICO  
MEDICO ADSCRITO DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA HOSPITAL  
INFANTIL DE MÉXICO**

## Dedicatoria

A mi madre, por ser el pilar de mi vida.

A mi padre, arriba, hasta las estrellas.

## Índice

Antecedentes	1
Marco Teórico	
Desarrollo sexual	2
Sexo cromosómico	2
Gónada bipotencial	3
Desarrollo de los testículos	3
Desarrollo ovárico	4
Desarrollo de glándulas y los conductos genitales masculinos	5
Desarrollo de glándulas y los conductos genitales femeninos	5
Desarrollo de genitales externos	6
Diferenciación sexual masculina	6
Diferenciación sexual femenina	7
Diferencias del desarrollo sexual	9
Deficiencia de 5-alfa Reductasa	11
Diagnósticos Diferenciales	12
Secuenciación de segunda generación	17
Planteamiento del problema	20
Pregunta de investigación	22
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivos	23
Métodos	23
Criterios de selección	29
Plan de análisis estadístico	31
Descripción de variables	31
Resultados	32
Discusión	39
Conclusiones	45
Cronograma de actividades	46
Referencias	47

## Antecedentes

En 1961 Nowakowski y Lenz describieron una diferencia en el desarrollo sexual masculino que nombraron “hipospadias perineoescrotal pseudovaginal”, posteriormente en 1974 se relacionó esta condición con un defecto en la transformación de testosterona en dihidrotestosterona (DHT) por la disminución o ausencia completa de la enzima 5-alfa reductasa tipo 2. (1)

La Deficiencia de 5-alfa Reductasa es una entidad autosómico recesiva producida por variantes patogénicas en el gen *SRD5A2* que codifica la enzima 5-alfa reductasa tipo 2, que tiene como consecuencia niveles bajos de DHT y un desarrollo de genitales externos alterado.(2)

Se han reportado hasta la fecha 129 variantes patogénicas relacionadas con la enfermedad en todo el mundo, siendo esta más prevalente en Turquía. En población mexicana hay un estudio publicado en 1997 en el que utilizan la secuenciación tipo Sanger para realizar el diagnóstico molecular de 8 pacientes de 6 familias, con diagnóstico clínico de Deficiencia de 5 alfa Reductasa. El diagnóstico clínico se realizó mediante exploración física detallada, así como mediciones en plasma de testosterona (T) , dihidrotestosterona (DHT) y la relación T/DHT. Se encontraron 5 variantes de sentido equivocado en los 8 pacientes, una de ellas no había sido reportada en la literatura. En todos se confirmó el diagnóstico. (3)

*Variantes reportadas en estudio de Canto P et al.*

<i>Paciente</i>	Exón	Variante	Cigosidad
1	4	p.P212R	Homocigoto
2	4	p.P212R	Homocigoto
3	4	p.P212R	Homocigoto
4	4	p.A207D	Homocigoto
5	4	p.A207D	Homocigoto
6	4	p.P212R	Homocigoto
7	1	p.G34R	Homocigoto
8	2	p.G115D	Heterocigoto

En 2022 se reportaron los casos de dos pacientes mexicanos de dos familias, con diagnóstico clínico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa, realizado mediante exploración física y relación T/DHT después de la administración de gonadotropina coriónica humana. Ambos pacientes fueron estudiados en trío (se realizó secuenciación dirigida en pacientes y padres). El primer paciente era un heterocigoto compuesto con variantes p.Glu197Asp y p.Pro212Arg y el segundo fue homocigoto para la variante p.Glu197Asp. (4)

En el año 2009, se publicó una tesis en el Hospital Infantil de México Federico Gómez sobre la correlación genotipo-fenotipo en pacientes con sospecha de Insensibilidad a Andrógenos y Deficiencia de 5-alfa Reductasa. Se estudió a 7 pacientes con la sospecha clínica de Deficiencia de 5-alfa Reductasa por medio de secuenciación tipo Sanger, y se confirmó el diagnóstico molecular en 2 pacientes. Uno presentó una delección completa del exón 4, que es considerada una variante poco frecuente, y el otro fue heterocigoto compuesto con las variantes p.E197D y p.R227\*.

Hasta el momento, no hay estudios en población mexicana en los que se realice Secuenciación de Segunda Generación en pacientes con diagnóstico clínico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa, en el que además de analizar en el *SRD5A2* se pueden revisar otros genes relacionados con el desarrollo sexual.

## Marco teórico

### Desarrollo sexual

El desarrollo sexual en mamíferos es un proceso complejo que consta de tres pasos (Figura 1):

- La fertilización, que otorga el complemento cromosómico (46,XX ó 46,XY), con la posterior formación de la gónada bipotencial.

- La determinación gonadal, o determinación sexual, en la que la gónada bipotencial se desarrolla en ovario o testículo.
- La diferenciación de genitales internos y externos por medio de influencia hormonal. (5)

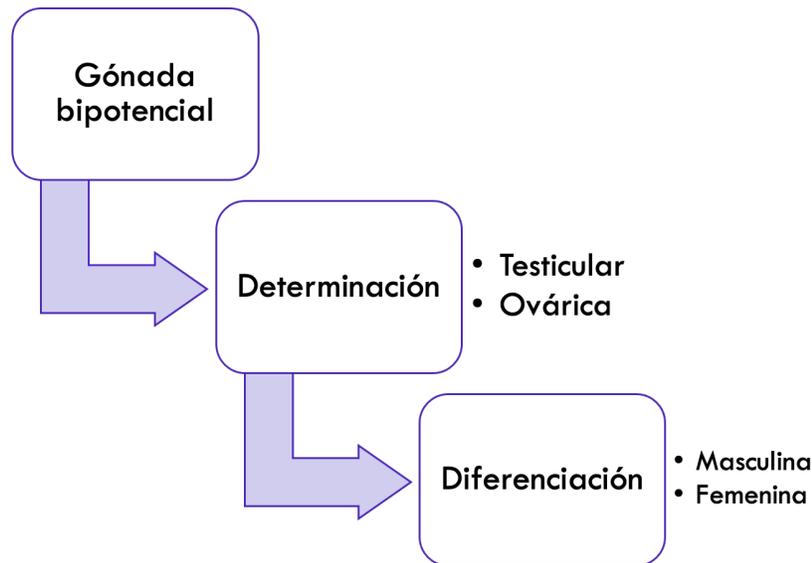


Figura 1. Etapas del Desarrollo Sexual

### *Sexo cromosómico*

El tipo de gónada que se desarrolla suele estar determinado por el complemento de cromosomas sexuales (46,XX o 46,XY) (Figura 2). En los embriones con un complejo de cromosomas sexuales 46,XX, la corteza de la gónada indiferenciada se diferencia en ovario y la médula experimenta regresión. En cambio, en los embriones con un complejo de cromosomas sexuales XY, la médula se diferencia en un testículo y la corteza degenera (agregar referencia).

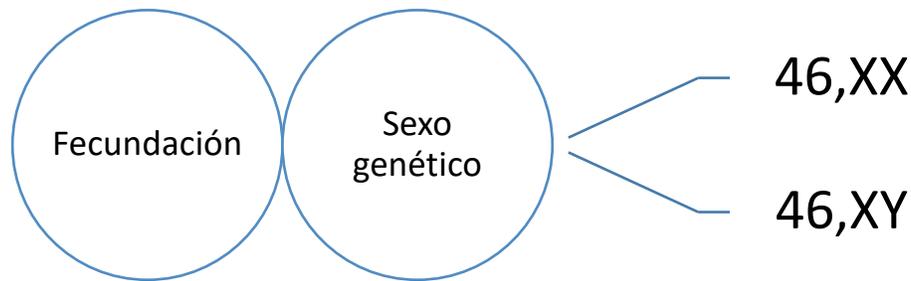


Figura 2. Etapa indeterminada/ Gónada bipotencial

### *Gónada bipotencial*

El desarrollo gonadal comienza durante la quinta semana de gestación con la formación de la cresta gonadal, mediante proliferación del epitelio y el mesénquima en la porción medial del mesonefros. Continúa con el desarrollo de los cordones sexuales primitivos en el mesénquima subyacente. Las células germinales primordiales se originan en la pared del saco vitelino y migran a lo largo del mesenterio dorsal del intestino posterior hasta las crestas gonadales. Durante la sexta semana, las células germinales primordiales se introducen en el mesénquima subyacente y se incorporan a los cordones sexuales primitivos. Antes de la séptima semana, las gónadas de ambos sexos se terminaron de formar y tienen un aspecto idéntico. Por lo que, se denominan gónadas indiferenciadas/bipotenciales (agregar referencia).

### *Desarrollo de los testículos*

Existe una secuencia coordinada de expresión de genes que induce el desarrollo de los testículos. El gen *SRY* (región determinante del sexo Y, en el brazo corto del cromosoma Y) codifica para el factor determinante del testículo (FDT), el cual actúa como un interruptor que activa el desarrollo testicular. Debido al FDT, los cordones sexuales primitivos se condensan y se extienden hasta la médula de la gónada indiferenciada, donde se ramifican y anastomosan para formar la red testicular. Los cordones seminíferos dan lugar a los túbulos seminíferos, los túbulos rectos y la red testicular.

Los túbulos seminíferos están separados por mesénquima, que origina las células intersticiales (células de Leydig). En la octava semana estas células secretan testosterona, una hormona androgénica que induce la diferenciación masculina de los conductos mesonéfricos. La producción de testosterona está estimulada por la gonadotropina coriónica humana, que alcanza su máxima cantidad entre la 8va y la 12va semana. La dihidrotestosterona es producida a partir de la testosterona, mediante la enzima 5 alfa reductasa tipo 2, esta hormona es más potente que la testosterona y ocasiona la virilización de los genitales externos

La expresión del factor de transcripción SOX9 es esencial para la diferenciación de las células de Sertoli en los testículos. Estas se encargan de la producción de la hormona antiMülleriana (AMH, por sus siglas en inglés *anti-Müllerian hormone*). La AMH suprime el desarrollo de los conductos paramesonéfricos, que originan el útero y las trompas de Falopio.

La red testicular entra en contacto con 15 o 20 túbulos mesonéfricos, que se convierten en los conductos eferentes. Estos conductos están conectados con el conducto mesonéfrico, que da lugar al conducto epididimario.

### *Desarrollo ovárico*

El desarrollo ovárico se produce unas tres semanas más tarde que el desarrollo testicular. Los cordones sexuales primitivos se extienden hasta la médula del ovario y forman una red ovárica rudimentaria de canales, que suele degenerar y desaparecer. A principios del periodo fetal, los cordones corticales se extienden desde el epitelio superficial del ovario en desarrollo hasta el mesénquima subyacente. A medida que aumentan de tamaño, se incorporan a ellos células germinales primordiales. A las 16 semanas los cordones comienzan a dividirse en agrupaciones celulares aisladas o folículos primarios, y cada uno constituye una ovogonia.

Los folículos están rodeados por una capa de células foliculares originadas a partir del epitelio superficial. La mitosis activa da lugar a millones de ovogonias durante la vida fetal.

Tras el nacimiento, ya no hay formación de ovogonias. Muchas degeneran antes de nacer, y alrededor de 2 millones aumentan de tamaño y se convierten en ovocitos primarios.

#### *Desarrollo de glándulas y los conductos genitales masculinos*

Los testículos fetales comienzan a producir testosterona en la 8va semana y esta alcanza su concentración máxima alrededor de la semana 12, y AMH entre las semanas 6 y 7. La testosterona estimula la formación de conductos genitales masculinos a partir de los conductos mesonéfricos, mientras que la AMH provoca la desaparición de los conductos paramesonéfricos mediante la transición epitelio-mesénquima.

Vesículas seminales: las excrescencias laterales del extremo caudal de cada conducto mesonéfrico se convierten en las vesículas seminales, cuyas secreciones nutren a los espermatozoides.

#### *Desarrollo de las glándulas y los conductos genitales femeninos*

Los conductos mesonéfricos de los embriones femeninos sufren una regresión a causa de la ausencia de testosterona, mientras que los conductos paramesonéfricos se desarrollan debido a la falta de AMH. Los conductos paramesonéfricos constituyen la mayor parte del aparato genital femenino, y sus porciones craneales no fusionadas originan las trompas de Falopio. Las porciones caudales y fusionadas de estos conductos forman el primordio úterovaginal, que da lugar al útero y a la parte superior de la vagina.

El epitelio vaginal deriva del endodermo del seno urogenital, y la pared fibromuscular vaginal se desarrolla a partir del mesénquima circundante. El contacto entre el primordio úterovaginal y el seno urogenital induce la formación de los bulbos sinovaginales. Estos se fusionan y dan lugar a una placa vaginal, cuyas células centrales se degradan para originar la luz de la vagina.

Hasta las últimas etapas de la vida fetal, la luz de la vagina permanece separada de la cavidad del seno urogenital por el himen. El himen surge por la invaginación de la pared posterior del seno urogenital; se rompe durante el periodo perinatal y permanece como una membrana mucosa fina justo en el orificio vaginal.

### *Desarrollo de genitales externos*

Las características sexuales distintivas comienzan a aparecer durante la semana 9, pero los genitales externos no se diferencian por completo hasta la semana 12. A principios de la 4ta semana, el mesénquima en proliferación origina en ambos sexos un tubérculo genital, el primordio del pene o el clítoris, en el extremo craneal de la membrana cloacal. Se desarrollan prominencias labio-escrotales y pliegues uretrales a ambos lados de la membrana cloacal, y el tubérculo genital se alarga y forma el falo primordial.

### *Diferenciación sexual masculina*

La masculinización de los genitales externos indiferenciados se debe a la acción inductiva de la dihidrotestosterona, producida periféricamente mediante la conversión de la testosterona de las células testiculares de Leydig, catalizada por la enzima, 5 alfa reductasa tipo 2.

A medida que el falo primordial aumenta de tamaño y se alarga para transformarse en pene, los pliegues uretrales forman las paredes laterales del surco uretral en la superficie ventral del pene.

Los pliegues uretrales se unen a lo largo de la superficie ventral del pene, y dan lugar a la uretra esponjosa. El ectodermo superficial se fusiona en el plano medio del pene, de manera que forma el rafe del pene y encierra la uretra esponjosa en este órgano. En la punta del glande, un crecimiento interno ectodérmico forma un cordón celular ectodérmico que se extiende hacia la raíz del pene y contacta con la uretra esponjosa formada previamente, se une a ella y la canaliza. Esta unión finaliza la porción terminal de la uretra, y el meato urinario se desplaza a la punta del glande, cuyo ahuecamiento da lugar al prepucio. Los cuerpos

cavernosos y el cuerpo esponjoso se desarrollan a partir del mesénquima del falo. Las prominencias labioescrotales crecen y se fusionan para dar lugar al escroto. La línea de fusión de estos pliegues se aprecia claramente en el rafe escrotal.

#### *Desarrollo de los genitales externos femeninos*

El crecimiento del falo primordial en los fetos femeninos disminuye de manera gradual para formar el clítoris. En la semana 18, el clítoris todavía tiene un tamaño relativamente grande. Se desarrolla de modo similar al pene, pero los pliegues uretrales sólo se fusionan en la región posterior, donde se unen para conformar el frenillo de los labios menores.

#### Diferencias del Desarrollo Sexual

Las diferencias del desarrollo sexual (DDS) son condiciones congénitas en las que el sexo cromosómico, gonadal o anatómico es atípico. La incidencia de pacientes con genitales atípicos, previamente conocidos como genitales ambiguos, es uno en 4,500.

Las DDS se clasifican en tres subclases según el resultado del cariotipo (Figura 3)(6):

1. DDS de cromosomas sexuales, que incluyen el síndrome de Turner y el síndrome de Klinefelter, así como individuos 45,X/46,XY y 46,XX/46,XY que cubren un amplio espectro fenotípico.
2. DDS 46,XY, que comprenden trastornos del desarrollo gonadal, trastornos de la síntesis y acción de andrógenos, síndrome de conductos de Müllerianos persistente y otros trastornos no clasificados.
3. DDS 46,XX, que consisten en trastornos del desarrollo gonadal, trastornos por exceso de andrógenos y trastornos no clasificados.

# CLASIFICACIÓN DDS

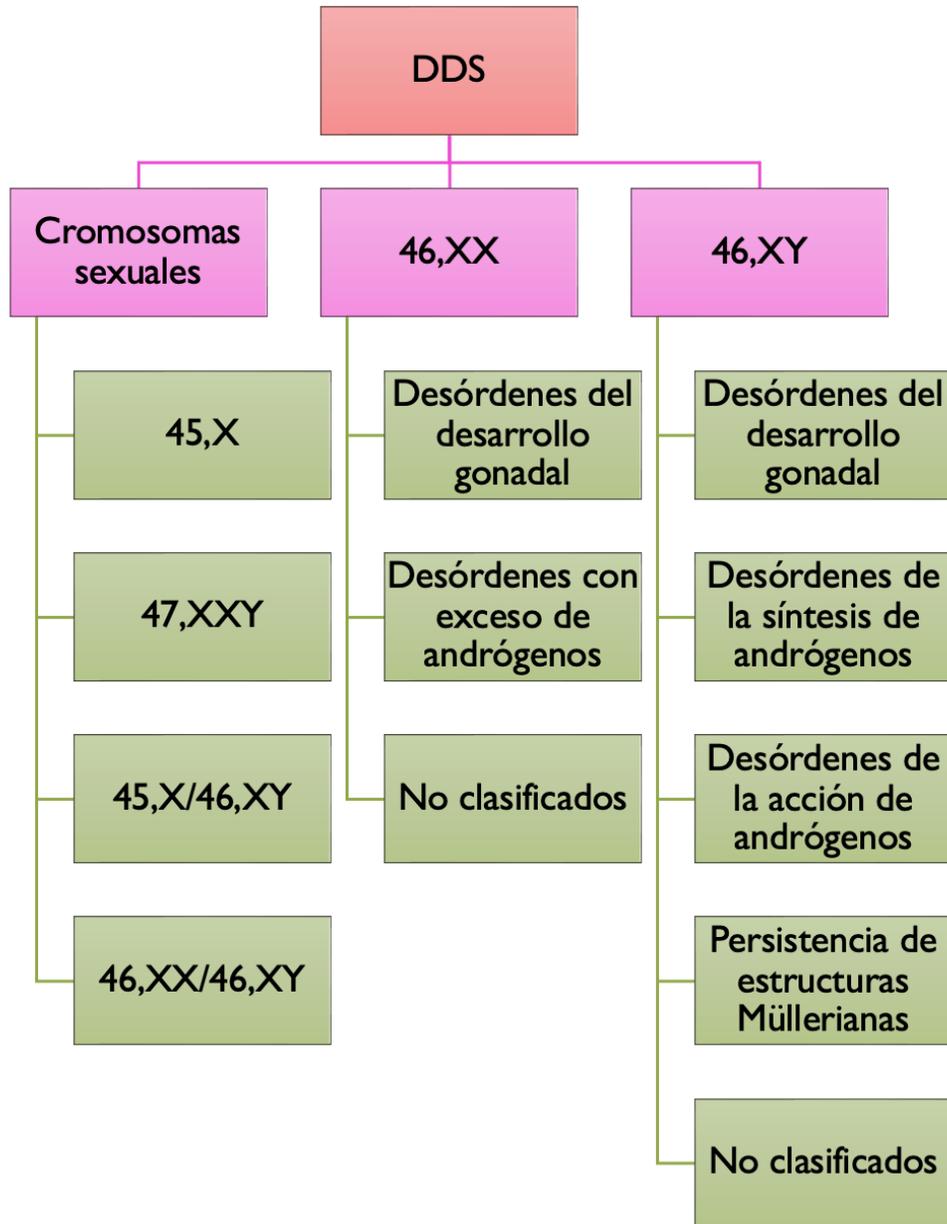


Figura 3. Clasificación de DDS

### *Deficiencia de 5-alfa-reductasa*

La deficiencia de 5-alfa-reductasa es una Diferencia del Desarrollo Sexual 46,XY con herencia autosómico recesiva, en la que hay una subvirilización de los genitales externos masculinos debido a una alteración en el gen *SRD5A2*, que codifica para la enzima 5-alfa-reductasa. (7) Su prevalencia en la población general es desconocida, pero se han visto agrupaciones en Turquía(8) y República Dominicana. En esta última se publicó en 1986 la prevalencia en un estudio de 10 años en pacientes con genitales atípicos, donde encontraron que de una población de 65 pacientes, 5 (13%) tenía la enfermedad. Cabe resaltar que ellos realizaron el diagnóstico sin estudio molecular; mediante mediciones de 5 beta/ 5 alfa C19 y C20 urinarios. (9)

El gen *SRD5A2* tiene 5 exones y 4 intrones, y está localizado en el brazo corto del cromosoma 2, en la región dos, banda 3 (2p23). Existen dos isoformas de la enzima (tipo 1 y tipo 2). La isoforma tipo 2 de la enzima 5-alfa-reductasa es la forma predominante en piel genital fetal, glándulas sexuales accesorias masculinas y en la próstata y tiene una mayor afinidad por la testosterona que la tipo 1. Está conformada por 254 aminoácidos y tiene un peso molecular de 28.4KDa. (10)

La deficiencia de 5-alfa-reductasa tipo 2 altera la transformación de la testosterona a dihidrotestosterona (DHT), que es un metabolito más activo de la primera y que se requiere para el desarrollo normal de genitales externos y uretra en fetos masculinos.(11)

El diagnóstico clínico se sospecha en un recién nacido con genitales atípicos, caracterizados por hipospadias perineoescrotales, aunque la enfermedad tiene una gran expresividad variable, que va desde micropene con diversos grados de hipospadias a genitales externos de apariencia femenina con clitoromegalia.

En un estudio multicéntrico con 55 pacientes encontraron que el 72.7% tuvo asignación de sexo femenino al nacimiento. En estos pacientes ocurre una virilización espontánea en la pubertad debido a un aumento en la concentración de testosterona y de la acción de la isoforma tipo 1. La virilización peripuberal puede ocasionar que los pacientes soliciten

cambio de género durante la adolescencia. (12) Así, la deficiencia de 5-alfa-reductasa es una de las enfermedades con una mayor tasa de disforia de género.

El diagnóstico bioquímico incluye una relación testosterona/dihidrotestosterona aumentada después de una prueba de estimulación con gonadotropina coriónica humana(hCG). Antes y después de la administración de hCG, se mide la producción de  $\Delta$ -4-androstenediona, testosterona y dihidrotestosterona. Sin embargo, no existe un protocolo estandarizado para la dosis de hCG, el número de inyecciones, las muestras de sangre necesarias y los valores de corte (agregar referencia).

En circunstancias en las que no se dispone de estudio molecular para la búsqueda de variantes patogénicas en el gen *SRD5A2*, los resultados atípicos de la prueba de hCG podrían indicar el diagnóstico. Se han recomendado valores de corte de 8.5 a 30 para la proporción de testosterona/dihidrotestosterona. Cuando la proporción de testosterona a dihidrotestosterona excede 10, la deficiencia de 5 $\alpha$  reductasa 2 se diagnostica en 72-88% de pacientes (agregar referencia).

Se han reportado 129 variantes patogénicas distribuidas a lo largo del gen *SRD5A2*, de las cuales la más frecuente es una variante de sentido equivocado en el que hay un cambio de la valina 89 por una leucina (p.V89L) en el exón 1(13). Esta disminuye la actividad de la enzima un 30%. Actualmente no hay una relación genotipo-fenotipo clara en la enfermedad.

En un estudio de revisión sobre variantes reportadas de *SRD5A2* se identificaron 434 casos en 44 países. La mayoría procedía de Turquía (23%), China (17%), Italia (9%) y Brasil (7%). El 79% fueron asignados como mujeres. Hubo un 70% de variantes alélicas homocigotas y un 30% de heterocigotos compuestos. La mayoría eran variantes sin sentido (76%). Sin embargo, se informaron pequeños indeles (11%), empalmes (5%) y grandes deleciones (4%).

Se distribuyeron junto con todos los exones con predominio del exón 1 (33%) y del exón 4 (25%). Las variantes alélicas en el exón 4 (dominio de unión a NADPH) dieron como resultado una virilización más baja. Los codones 55, 65, 196, 235 y 246 son puntos calientes que constituyen el 25% de todas las variantes alélicas. La mayoría de ellos (76%) se ubicaron

en aminoácidos conservados. Sin embargo, las variantes alélicas en los aminoácidos no conservados fueron con mayor frecuencia indeles (28% frente a 6%;  $p < 0,01$ ). La tasa general de cambio de género de mujer a hombre osciló entre el 16% y el 70%. La tasa más baja de cambio de género de mujer a hombre se produjo en Turquía y la más alta en Brasil. La virilización de los genitales externos fue similar entre los que cambiaron y los que mantuvieron su género asignado. La tasa de cambio de género fue significativamente diferente entre los países ( $V = 0,44$ ;  $p < 0,001$ ) incluso con puntuaciones de virilización similares.(11)

## Diagnósticos diferenciales

### *Insensibilidad parcial a los andrógenos*

La insensibilidad a los andrógenos es una alteración del desarrollo sexual 46,XY con herencia ligada al cromosoma X, que se caracteriza por una incapacidad celular parcial o completa para responder a los andrógenos, lo que resulta en una virilización genital incompleta o ausente del embrión 46,XY. (14)

Por su parte, la insensibilidad parcial a los andrógenos se diferencia de la completa por un grado variable de función remanente del receptor de andrógenos (AR) que permite un grado variable de acción de estos. (15)

La presentación clínica del síndrome de insensibilidad parcial a los andrógenos depende del grado de respuesta de los genitales externos a los andrógenos. El fenotipo típico es micropene, hipospadias proximal, escroto bífido, con o sin criptorquidia. (16)

A nivel molecular, esta resistencia es causada por variantes patogénicas hemicingóticas de pérdida de función en el gen del receptor de andrógenos (AR). (15) La secuenciación del gen AR es necesaria para confirmar el diagnóstico del síndrome.

### *Deficiencia de 17-β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 3*

La deficiencia de 17-β-hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 3 (17β-HSD3) es una forma rara autosómica recesiva de una diferencia del desarrollo sexual 46,XY y es el defecto de biosíntesis de testosterona más común. La enzima 17β-HSD3 se encuentra principalmente en los testículos y participa en la conversión de Δ4-androstenediona en testosterona, que es biológicamente más activa. (17) La familia de enzimas 17β-HSD3 incluye 14 isoenzimas identificadas hasta el momento que contribuyen al desarrollo de los órganos reproductivos al desempeñar un papel en los pasos finales de la síntesis de andrógenos y estrógenos.

La incidencia real de la deficiencia de 17β-HSD3 se desconoce; sin embargo, estudios previos han informado que la incidencia estimada es de 1/147 000 en recién nacidos y que la frecuencia de heterocigotos calculada es de 1/135. (18)

Los individuos 46,XY pueden presentar desde genitales externos completamente femeninos hasta genitales ligeramente virilizados, genitales atípicos y genitales predominantemente masculinos con micropene o hipospadias.

La presentación más frecuente de deficiencia de 17β-HSD3 es la de genitales externos de apariencia femenina, estructuras labioescrotales fusionadas con o sin clitoromegalia (3). La mayoría de los casos no se diagnostican al nacer ya que tienen genitales externos que parecen femeninos y se crían como mujeres y el diagnóstico de estos casos se retrasa hasta la adolescencia.(19)

Durante la pubertad, existe una virilización que se presenta como aumento del crecimiento del vello corporal, cuerdas vocales engrosadas y agrandamiento clítoris. El grado de virilización de los individuos varía según la actividad residual parcial de la isoenzima 17β-HSD3 en los testículos y la conversión de androstenediona en testosterona por otras isoenzimas que se encuentran en los tejidos extratesticulares, como la isoenzima 17β-HSD5.(20)

La deficiencia de 17  $\beta$ -HSD3 se diagnostica mediante una evaluación hormonal y el diagnóstico se confirma mediante pruebas genéticas moleculares. El gen *HSD17B3* está ubicado en el cromosoma 9q22 y hasta el momento se han reportado 29 variantes patogénicas en este gen. (21)

### Disgenesia gonadal

La disgenesia gonadal (o GD por sus siglas en inglés *gonadal dysgenesis*) es el nombre que se le da a las condiciones que pueden causar un desarrollo deficiente de las gónadas, es decir, los testículos o los ovarios.(22) En individuos 46,XY, los testículos están determinados por redes genéticas que promueven la formación de testículos y reprimen el desarrollo ovárico. La interrupción de este proceso da como resultado una falta de determinación testicular y los individuos afectados presentan disgenesia gonadal (GD) 46,XY, una parte del espectro de Diferencias de desarrollo sexual.

La disgenesia gonadal se diagnostica de forma histopatológica y podemos encontrar (Figura 4):

- Disgenesia gonadal pura
  - Presencia de estría gonadal bilateral.
- Disgenesia gonadal mixta
  - Presencia de estría gonadal y testículo o testículo disgenético.
- Disgenesia gonadal parcial
  - Presencia de dos testículos disgenéticos

## DISGENESIA GONADAL PURA

- Estroma ovárico
- Sin ovocitos

**Estría gonadal**

**Estría gonadal**

- Estroma ovárico
- Sin ovocitos

## DISGENESIA GONADAL MIXTA

- Túbulos desordenados y escasos
- Estroma abundante

**Testículo/  
Testículo disgenético**

**Estría gonadal**

- Estroma ovárico
- Sin ovocitos

## DISGENESIA GONADAL PARCIAL

- Túbulos desordenados y escasos
- Estroma abundante

**Testículo disgenético**

**Testículo disgenético**

- Túbulos desordenados y escasos
- Estroma abundante

Figura 4. Tipos de Disgenesia Gonadal

Información tomada de (23)

Una minoría de todos los casos de GD están asociados con variantes patogénicas en actores clave de la determinación testicular, *SRY*, *SOX9*, *MAP3K1* y *NR5A1*. Sin embargo, la mayoría de los casos quedan sin explicación. Recientemente, la secuenciación de segunda generación ha revelado nuevos genes y loci que pueden causar disgenesia gonadal 46,XY (Tabla 1). Sin embargo, alrededor del 50% de todos los casos quedan sin diagnóstico (24).

Gen	Total (%)	Fenotipo (pacientes)			
		CGD	PGD	NGD	Otras
<b><i>SRY</i></b>	140 (29%)	132/140	8/140	NR	1 variante adicional WT1 (Síndrome de Frasier) 1 función ovárica parcial
<b><i>WT1</i></b>	109 (22%)	44/109	61/109	4/109	69 Síndrome de Denys-Drash 24 Síndrome de Frasier
<b><i>NR5A1</i></b>	59 (12%)	21/59	31/59	7/59	1 asplenia 1 Agenesia gonadal 1 Alteración adrenal
<b><i>MAP3K1</i></b>	30 (6%)	21/30	8/30	1/30	
<b><i>SOX9</i></b>	23 (4%)	21/23	2/23	NR	*10 Displasia campomélica Todas las deleciones son corriente arriba de <i>SOX9</i>
<b><i>DMRT1</i></b>	19 (4%)	14/19	5/19	NR	1 Esquizofrenia 2 Microcefalias 1 Trigonocefalia 3 Cardiopatías congénitas 1 TEF, sindactilia
<b><i>DHX37</i></b>	18 (3%)	NR	4/18	14/18	
<b><i>DHH</i></b>	15 (3%)	10/15	3/15	2/15	6 Neuropatías
<b><i>PPP2R3C</i></b>	11 (2%)	8/11	2/11	1/11	11 Síndrome de MEGD
<b><i>DAX1</i></b>	10 (2%)	5/10	5/10	NR	1 con RCIU, hipertensión, alteración auditiva, macrocefalia
<b><i>GATA4</i></b>	9 (1%)	1/9	5/9	3/9	1 cardiopatía congénita 1 hipoplasia adrenal congénita

<b>ZFPM2 (FOG2)</b>	7 (1%)	3/7	4/7	NR	1 ASD 2 microcefalia, movimientos estereotipados 1 Cardiopatía congénita, sobrepeso
<b>ATRX</b>	4 (>1%)	NR	NR	4/4	4 Síndrome ATRX
<b>TSPYL1</b>	4 (>1%)	2/4	2/4	NR	3 Síndrome de Syndrome of sudden infant death with dysgenesis of the testes (SIDDT)
<b>EMX2</b>	3 (>1%)	NR	3/3	NR	
<b>MYRF</b>	3 (>1%)	2/3	NR	1/3	2 Cardiac-urogenital syndrome
<b>CBX2 Isoform 2</b>	2 (>1%)	1/2	1/2	NR	
<b>HHAT</b>	2 (>1%)	1/2	NR	1/2	1 Síndrome Nivelon-Mabille
<b>LHX9</b>	2 (>1%)	1/2	NR	NR	
<b>SOX8</b>	2 (>1%)	1/2	1/2	NR	
<b>ZNRF3</b>	2 (>1%)	1/2	NR	1/2	
<b>PBX1</b>	1 (>1%)	1/1	NR	NR	

Tabla 1. Genes asociados a disgenesia gonadal. CGD: disgenesia gonadal completa. PGD: disgenesia gonadal parcial. NGD: disgenesia gonadal no especificada.

## Secuenciación de Segunda Generación

La secuenciación de segunda generación o secuenciación paralela masiva, es un método de secuenciación simultánea de millones de fragmentos de DNA, que se ha adoptado rápidamente en el laboratorio clínico debido a su capacidad para analizar simultáneamente varios genes o regiones de genes con un prueba única en comparación con los métodos tradicionales (Secuenciación Sanger).

Los flujos de trabajo de NGS de Illumina incluyen cuatro pasos básicos (Figura 5 y 6):

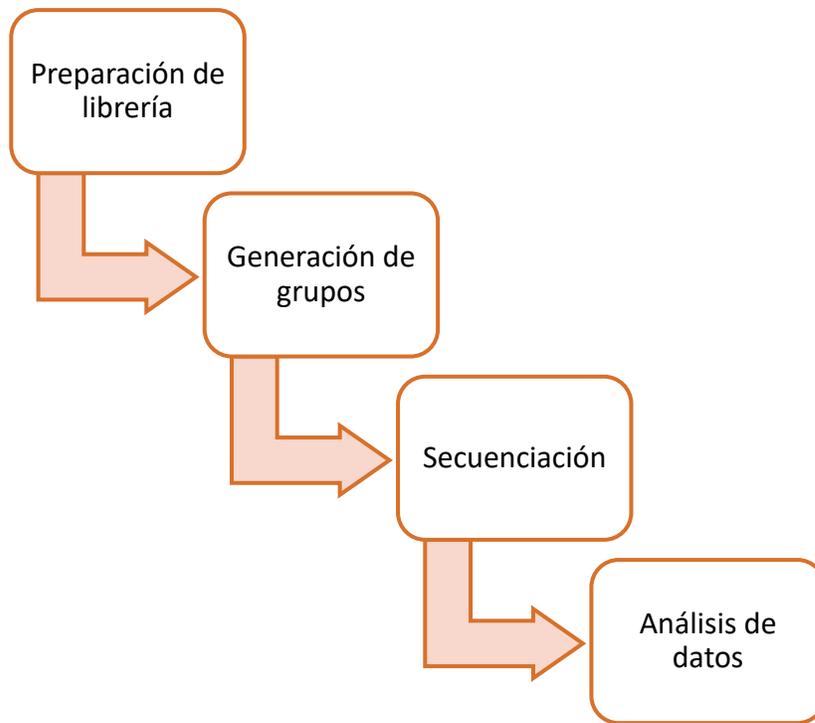


Figura 5. Flujo de trabajo NGS de Illumina (San Diego, California)

### 1. Preparación de la librería:

- a. Mediante la fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida de ligamiento de adaptadores 5' y 3'.
- b. La "tagmentación" combina las reacciones de fragmentación y ligamiento en un solo paso que aumenta en gran medida la eficacia del proceso de preparación de bibliotecas.
- c. Los fragmentos con adaptador se amplifican por PCR y se purifican con gel.

### 2. Generación de grupos:

- a. La librería se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en oligos unidos a la superficie, que son complementarios a los adaptadores de la librería.
- b. Cada fragmento se amplifica en *clusters* clonales distintos a través de amplificación en puente.

### 3. Secuenciación:

- a. Illumina utiliza un método patentado basado en un terminador reversible que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras de la plantilla de DNA.

### 4. Análisis de datos:

- a. Alineamiento de lecturas con un genoma de referencia.

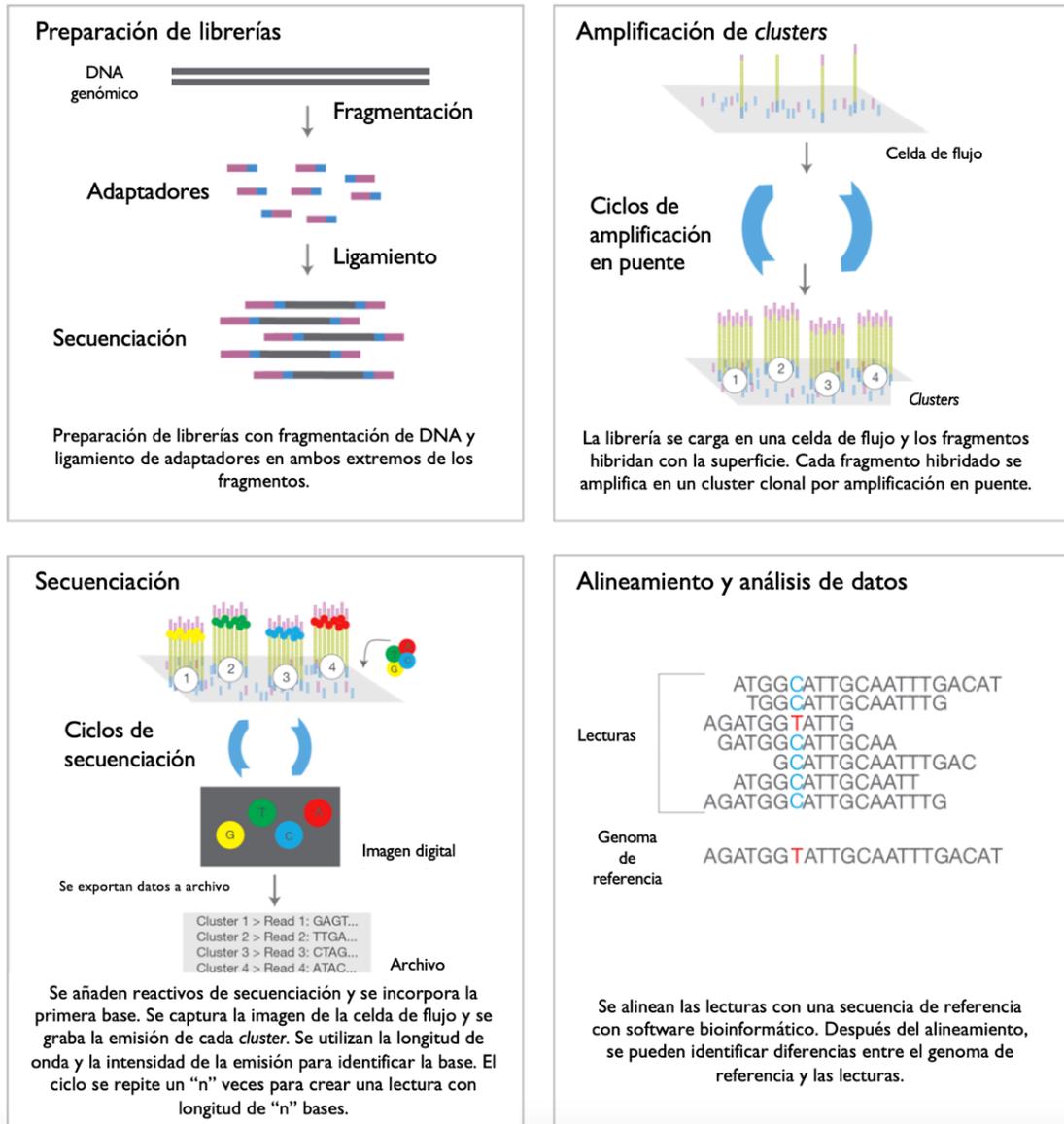


Figura 6. Modificada de "An introduction to Next-Generation Sequencing Technology"

## Planteamiento del problema:

La Deficiencia de 5-alfa reductasa (D5AR) es una enfermedad genética causada por la conversión alterada de testosterona en dihidrotestosterona por variantes patogénicas en *SRD5A2*. La dihidrotestosterona es la hormona encargada de la virilización de los genitales externos, por lo que niveles bajos de la misma causan una subvirilización en pacientes 46,XY. El fenotipo puede variar desde genitales masculinos subdesarrollados hasta un fenotipo femenino completo, por lo que el diagnóstico clínico es difícil.

En la clínica se utiliza la prueba de estimulación con gonadotropina coriónica humana para obtener la relación de niveles de testosterona/dihidrotestosterona. En caso de encontrar valores  $>20$  en un paciente con genitales atípicos, podemos orientar el diagnóstico hacia esta entidad, pero el diagnóstico sólo puede ser confirmado mediante pruebas moleculares, al encontrar variantes patogénicas en el gen *SRD5A2*.

La secuenciación se considera el “estándar de oro” para el diagnóstico definitivo, pero al ser un estudio que previamente no disponible en este Instituto, actualmente la mayoría de los pacientes de nuestro hospital con diagnóstico clínico de diferencia del desarrollo sexual 46,XY, no cuentan con un diagnóstico certero. Actualmente se da el diagnóstico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa de forma clínica, sin que este sea corroborado por medio de secuenciación.

Por otra parte, si bien existen estudios previos en poblaciones mexicanas en los que se busca el diagnóstico molecular, estos han utilizado como técnica la secuenciación tipo Sanger. La secuenciación Sanger o de primera generación es una técnica dirigida en la que se secuencía un gen, que es muy bueno con enfermedades con criterios clínicos bien definidos con alta sensibilidad y especificidad, pero en Diferencias del desarrollo sexual, con cuadros clínicos que se sobrelapan entre sí, parece no ser la mejor opción. Utilizando secuenciación de primera generación, y siendo el resultado negativo (sin variantes patogénicas), podríamos descartar la Deficiencia de 5-alfa Reductasa, pero no podríamos diagnosticar otras causas de DDS .

Con la técnica de secuenciación de segunda generación, podremos encontrar variantes patogénicas en otros genes además de *SRD5A2*, por lo que podríamos evaluar la prevalencia de otras causas de Diferencias del Desarrollo Sexual en nuestra población como disgenesia gonadal, que también es desconocida en nuestra población, ampliando el panorama de las DDS en México.

## Pregunta de investigación

¿Cuáles son las variantes genéticas identificadas en pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa mediante Secuenciación de Segunda Generación del Hospital Infantil de México Federico Gómez?

## Justificación

La Deficiencia de 5-alfa reductasa es una de las causas más frecuentes de genitales atípicos en personas 46,XY. Se debe por variantes patogénicas homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *SRD5A2*. Este es un gen pequeño de 5 exones, del que se conocen las zonas en las que se originan la mayor parte de las variantes patogénicas causantes de la enfermedad. Su diagnóstico definitivo se hace por secuenciación.

Cabe resaltar que a pesar de una clínica sugerente, no se encuentran variantes en *SRD5A2* en todos los casos, por lo que secuenciar sólo este gen podría no ser suficiente al momento de estudiar a los pacientes.

Este estudio nos permitirá:

- 1) Conocer qué tan frecuente es esta patología en la población que acude a nuestra institución.
- 2) Conocer las variantes más frecuentes en *SRD5A2*.
- 3) Conocer diagnósticos diferenciales y su frecuencia en nuestra población.

La prevalencia de la Deficiencia de 5-alfa Reductasa y otras causas de Diferencias del Desarrollo Sexual del Hospital Infantil de México Federico Gómez podría reflejar la frecuencia de estas entidades del país, ya que es un centro de referencia nacional y contamos con pacientes de todos los estados.

## Hipótesis

Se logrará la identificación de variantes genéticas en *SRD5A2* en la mayor parte de los pacientes con diagnóstico clínico probable de Deficiencia de 5-alfa Reductasa que acuden al Hospital Infantil de México Federico Gómez, encontrando una frecuencia similar a lo reportado en la literatura previa.

## Objetivo general

- Identificar variantes genéticas en pacientes con diagnóstico clínico probable de Deficiencia de 5-alfa Reductasa mediante Secuenciación de Segunda Generación.

## Objetivos específicos:

- Determinar la frecuencia de variantes genéticas del gen *SRD5A2*.
- Comparar la frecuencia de pacientes con Deficiencia de 5-alfa Reductasa con cohortes internacionales.
- Comparar las manifestaciones clínicas de pacientes con variantes genéticas identificadas en *SRD5A2* con los pacientes en los que se encontraron variantes en diferentes genes.
- Comparar las manifestaciones clínicas de pacientes con variantes genéticas identificadas en *SRD5A2* con los pacientes en los que no se encontraron variantes.

## Métodos

### *Diseño de estudio*

- A. Según el proceso de causalidad o tiempo de ocurrencia de los hechos y registro de la información: **Ambilectivo**.
- B. Según el número de una misma variable o el periodo y secuencia del estudio: **Transversal**.
- C. Según el control de las variables o el análisis y alcance de los resultados: **Descriptivo**.
- D. De acuerdo con la inferencia del investigador en el fenómeno que se analiza: **Observacional**.

### *Población de estudio*

Niños y adolescentes con diagnóstico clínico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa que acuden al Hospital Infantil de México Federico Gómez, identificados entre 2021 y 2022.

### *Tamaño de la muestra*

No probabilístico, por conveniencia, de forma consecutiva

### *Periodo de estudio*

Enero de 2021 a marzo de 2022.

### *Descripción general del estudio*

1. Se solicitó al Departamento de Bioestadística y Archivo Clínico del Hospital Infantil de México Federico Gómez los registros de los pacientes con diagnóstico de Diferencias del Desarrollo Sexual 46,XY. Además se identificaron casos en la consulta de Genética.
2. Se seleccionaron aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de selección y se citaron a la consulta de Genética para invitarlos a participar al protocolo de investigación “Caracterización molecular en pacientes con Desórdenes de la Diferenciación Sexual” No.HIM/2019/058.
3. Previa firma de consentimiento informado, se actualizaron datos clínicos y se realizó toma de muestra de sangre periférica (2ml) para extracción de DNA.
4. Extracción de DNA: Se utilizó el Dneasy Blood & Tissue kit de Qiagen (Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor.
5. Para la cuantificación y valoración de pureza del material genético obtenido se utilizó el equipo Nanodrop2000 Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts). Para observar la integridad del material genético se utilizó método de electroforesis en geles de agarosa.
6. Se realizó el estudio de Secuenciación de Segunda Generación en el Laboratorio de Biología Molecular bajo supervisión de la Dra. Mirena Astiazarán Osornio.
  - a. Se utilizó el protocolo de Illumina (San Diego, California) DNA Prep with Enrichment (Figura 7 y 8, imágenes 1-3).

- b. Las librerías enriquecidas se secuenciaron en el equipo NEXTSEQ1000 (ILLUMINA) siguiendo las instrucciones del proveedor.
7. Se analizó la información obtenida en la plataforma Franklin by Genoox (Palo Alto, CA).
- a. Se revisaron todas las variantes en genes *SRD5A2*, *AR* y *HSD17B3*, incluyendo a las variantes benignas.
  - b. Se usaron filtros en base de datos para obtener:
    - i. Variantes patogénicas o probablemente patogénicas en un panel/ grupo de genes conocidos por causar disgenesia gonadal en pacientes 46,XY (Tabla 2).
    - ii. Variantes patogénicas en cualquier gen en el estudio de exoma.

Panel de genes DDS
<i>SRY</i>
<i>WT1</i>
<i>NR5A1</i>
<i>MAP3K1</i>
<i>SOX9</i>
<i>DMRT1</i>
<i>DHX37</i>
<i>DHH</i>
<i>PPP2R3C</i>
<i>DAX1</i>
<i>GATA4</i>
<i>ZFPM2 (FOG2)</i>
<i>ATRX</i>
<i>TSPYL1</i>
<i>EMX2</i>
<i>MYRF</i>
<i>CBX2</i>
<i>Isoforma 2</i>
<i>HHAT</i>
<i>LHX9</i>
<i>SOX8</i>
<i>ZNRF3</i>
<i>PBX1</i>

Tabla 2. Panel de genes causantes de DDS utilizado en este estudio

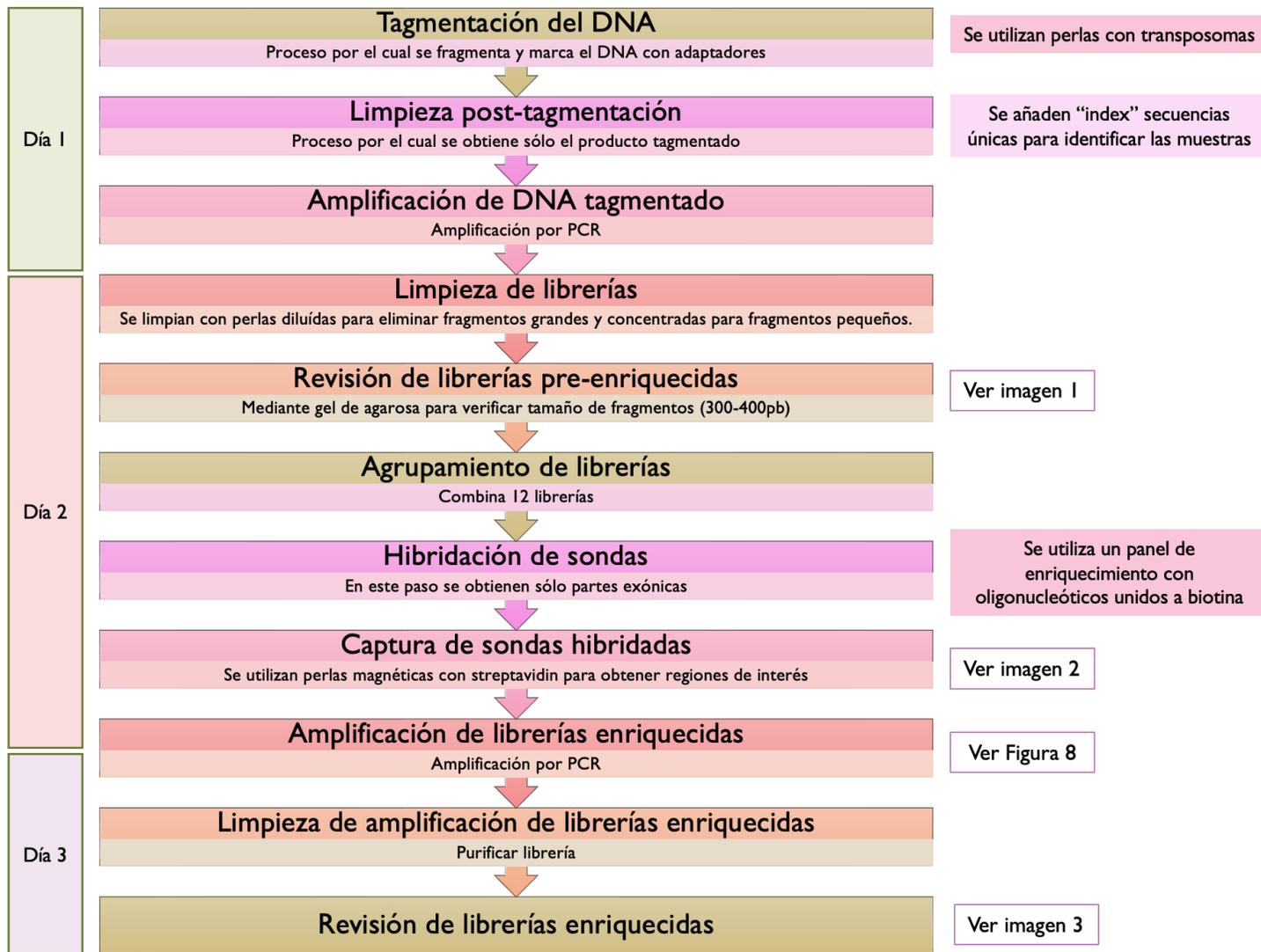


Figura 7. Protocolo DNA prep with Enrichment de Illumina

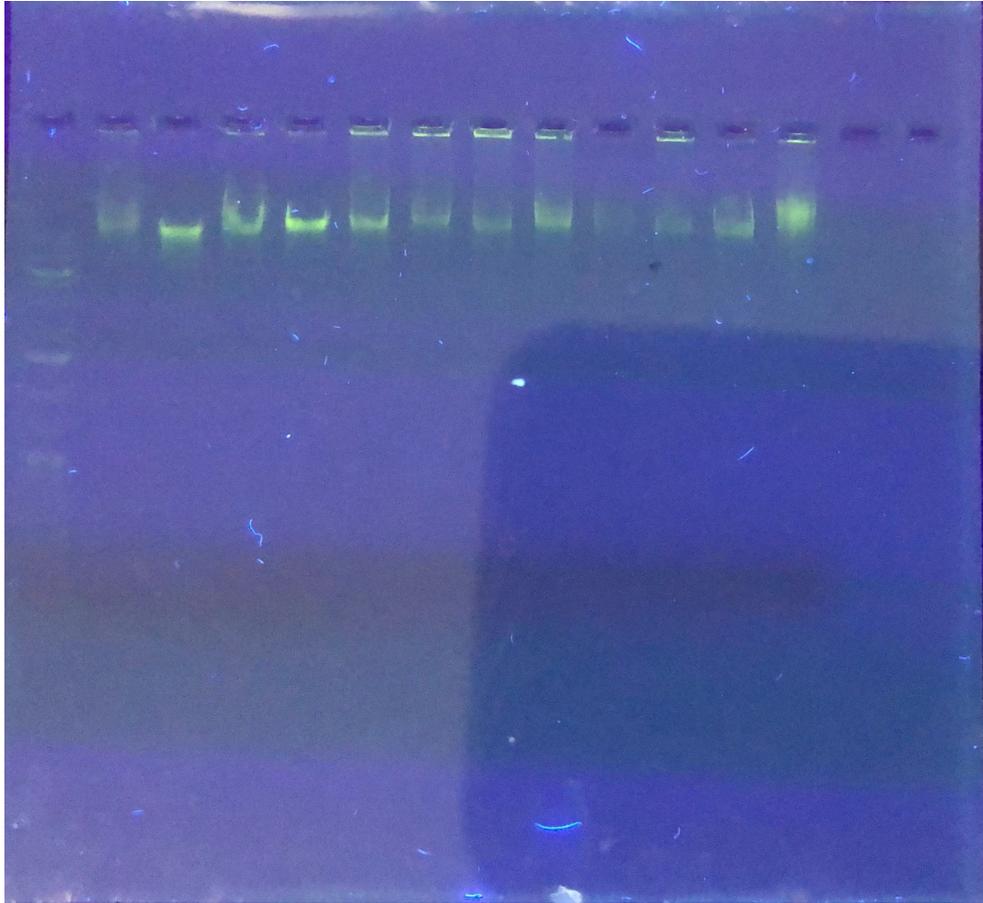


Imagen 1. Revisión de librerías pre-enriquecidas en gel de agarosa

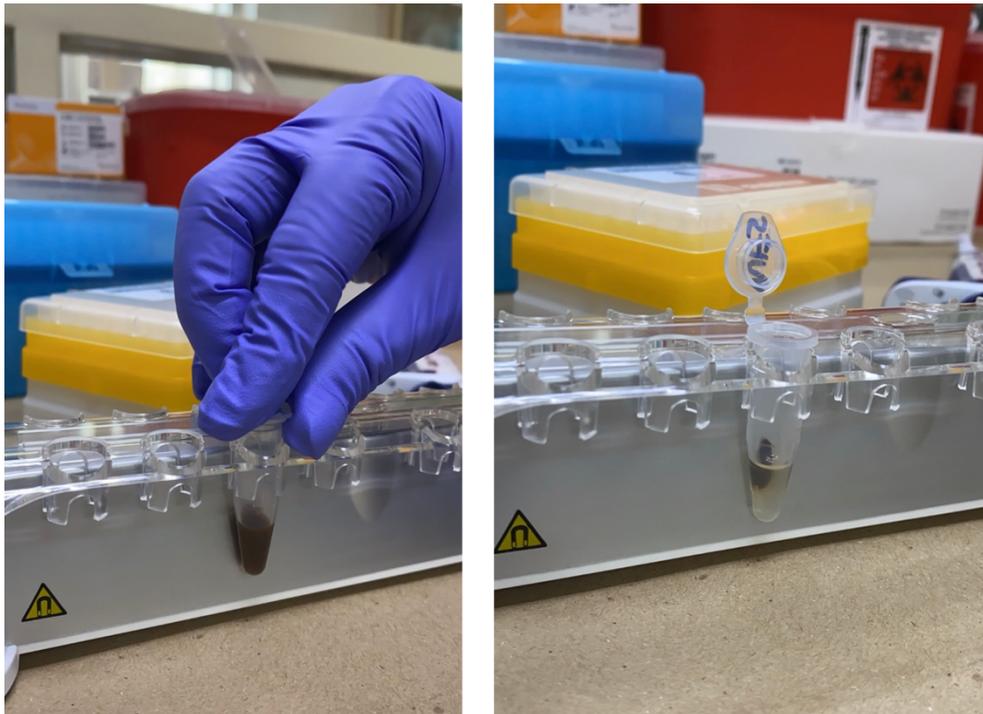


Imagen 2. Captura de sondas hibridadas mediante perlas de streptavidin

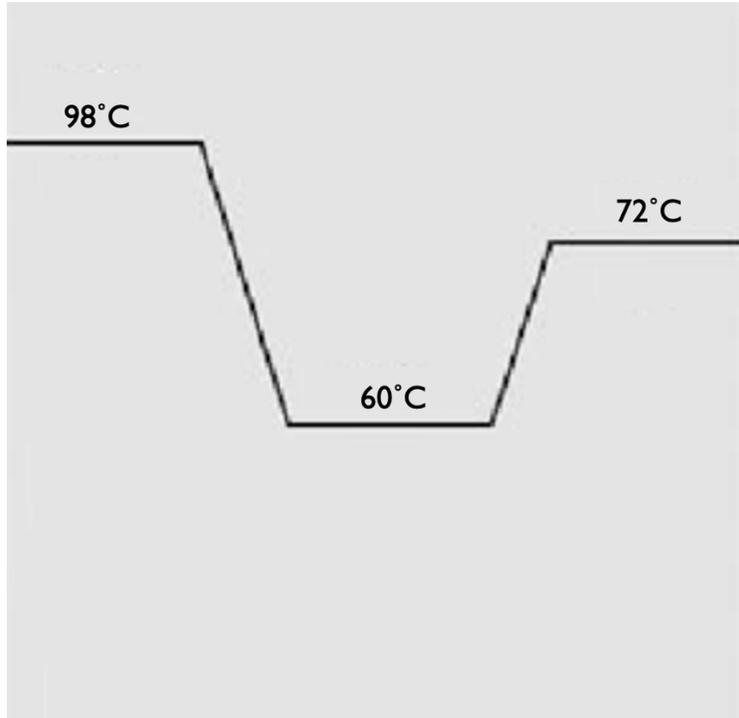


Figura 8. Amplificación de librerías enriquecidas por PCR

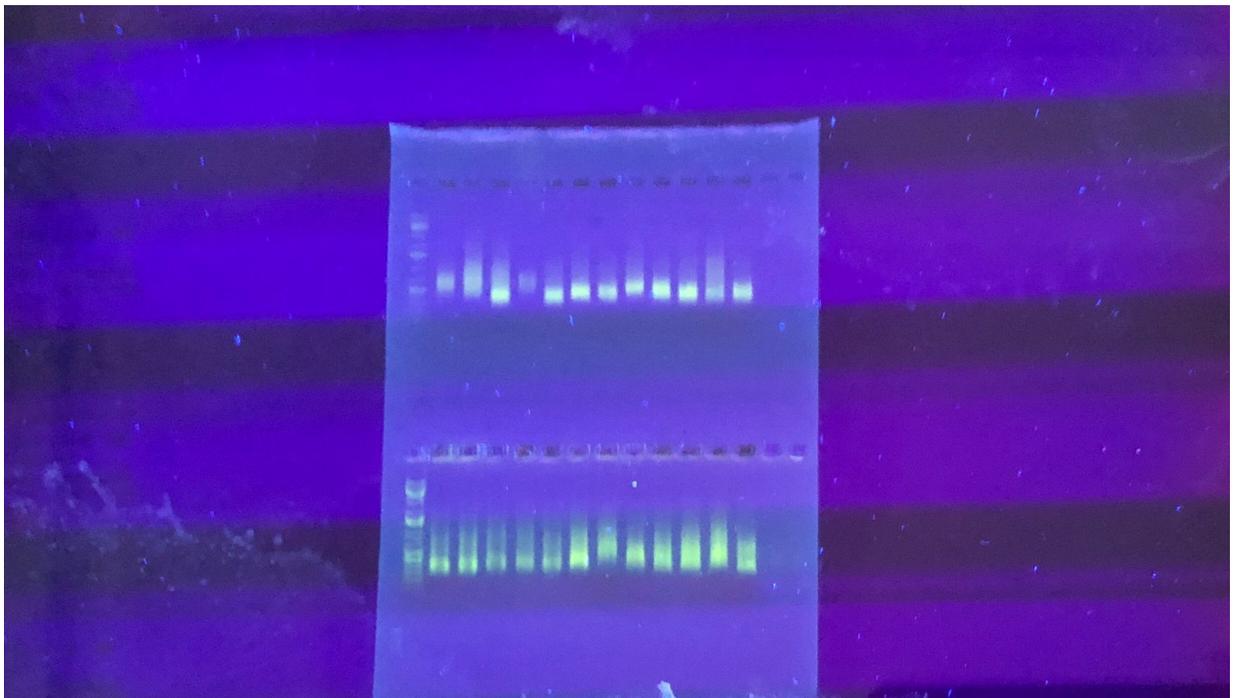


Imagen 3. Revisión de librerías enriquecidas en gel de agarosa

## Criterios de selección

### *ºCriterios de inclusión*

1. Pacientes con diagnóstico de Diferencia del Desarrollo Sexual en el Hospital Infantil de México Federico Gómez o de otras Instituciones que nos solicitaran valoración de pacientes, del 1 de enero de 2021 al 30 de marzo de 2022.
2. Pacientes con cariotipo 46,XY.
3. Pacientes con niveles de T:DHT >20 después de la prueba de estimulación con gonadotropina coriónica humana.
4. Paciente con alta sospecha clínica de Deficiencia de 5-alfa Reductasa.

### *ºCriterios de exclusión*

1. Pacientes que no puedan ser localizados por la información que se encuentra en el expediente.

### *ºCriterios de eliminación*

1. Pacientes con muestra de sangre insuficiente o DNA de calidad insuficiente.

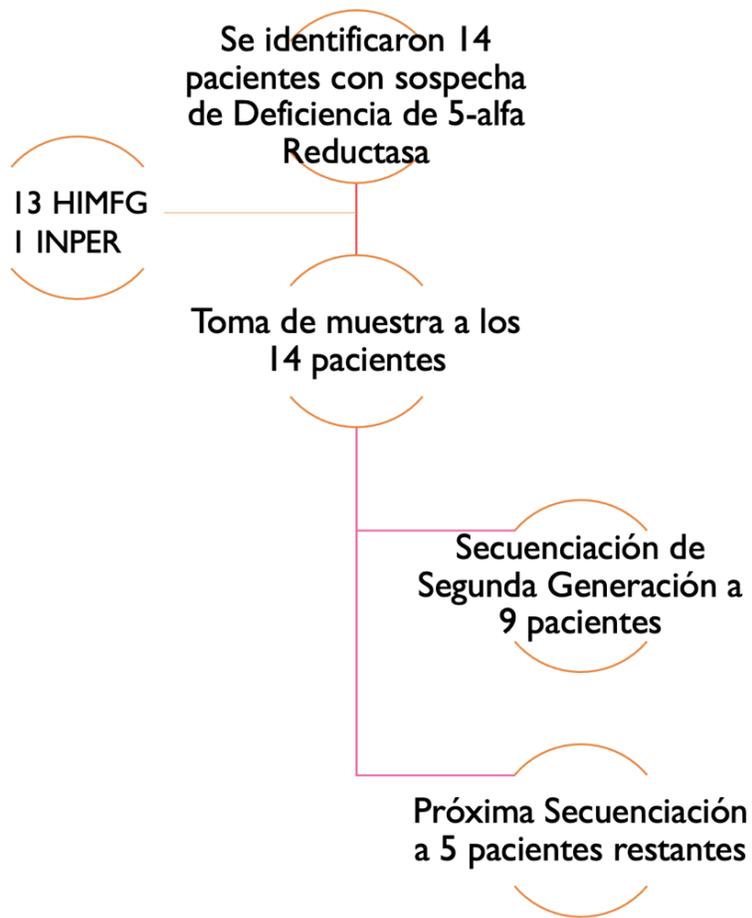


Figura 9. Algoritmo de selección de pacientes

## Análisis estadístico

Se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión. Los datos obtenidos se resumen en tablas de frecuencia, gráficos de barras, entre otros métodos estadísticos.

## Descripción de variables

<b><i>Variable</i></b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de Medición</b>
<i>Variante genética</i>	Cualitativa	Nominal, dicotómica
<i>Relación testosterona/dihidrotestoterona</i>	Cuantitativa	Ordinal, continua
<i>Genitales atípicos</i>	Cualitativa	Nominal, dicotómica
<i>Hipospadias</i>	Cualitativa	Nominal, policotómica
<i>Criptorquidia</i>	Cualitativa	Nomina, policotómica
<i>Edad</i>	Cuantitativa	Ordinal, continua

## Resultados

### *Descripción de pacientes*

Se encontraron 14 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión de este estudio, a los que se les tomó muestra de sangre periférica y se realizó extracción de DNA previo consentimiento informado. Por disponibilidad de secuenciador, se incluyeron en el estudio a 9 de los pacientes. El análisis genético de los 5 pacientes restantes se hará como una segunda parte de este proyecto de investigación.

El lugar de procedencia más común fue Estado de México, con 5 pacientes, sigue Veracruz con 2 y 2 de Ciudad de México (Figura 10).

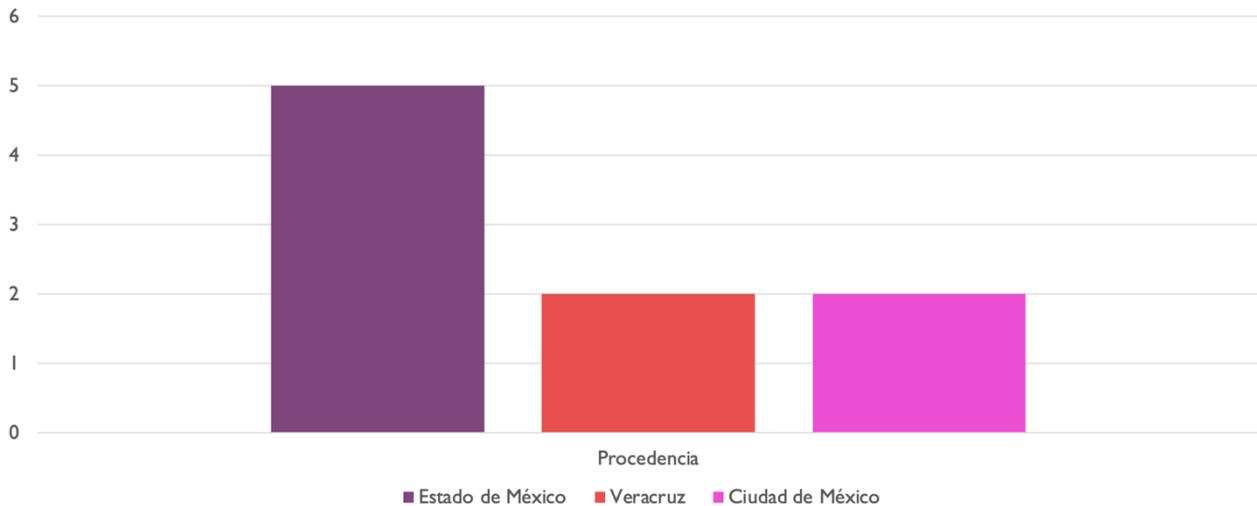


Figura 10. Procedencia de pacientes

De los 9 pacientes, 7 (78%) se encontraban en rol masculino y 2 (22%) en rol femenino (Figura 11). La media de edad fue de 7.7 años (con un rango de 8 meses a 18 años) y 8 de los 9 pacientes empezaron su abordaje diagnóstico en etapa de lactantes, mientras que 1 inició en la adolescencia por amenorrea primaria.

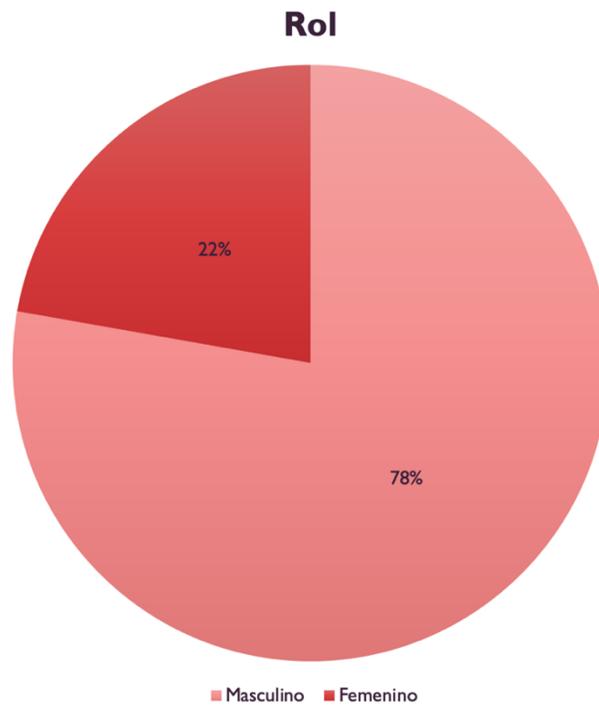


Figura 11. Rol de género de pacientes con DDS

La manifestación clínica más frecuente fue hipospadias proximal en 6 de los 9 pacientes, seguida por cuerda en 4 pacientes y de ahí escroto en chal y criptorquidia unilateral en 3 pacientes cada uno (Figura 12).

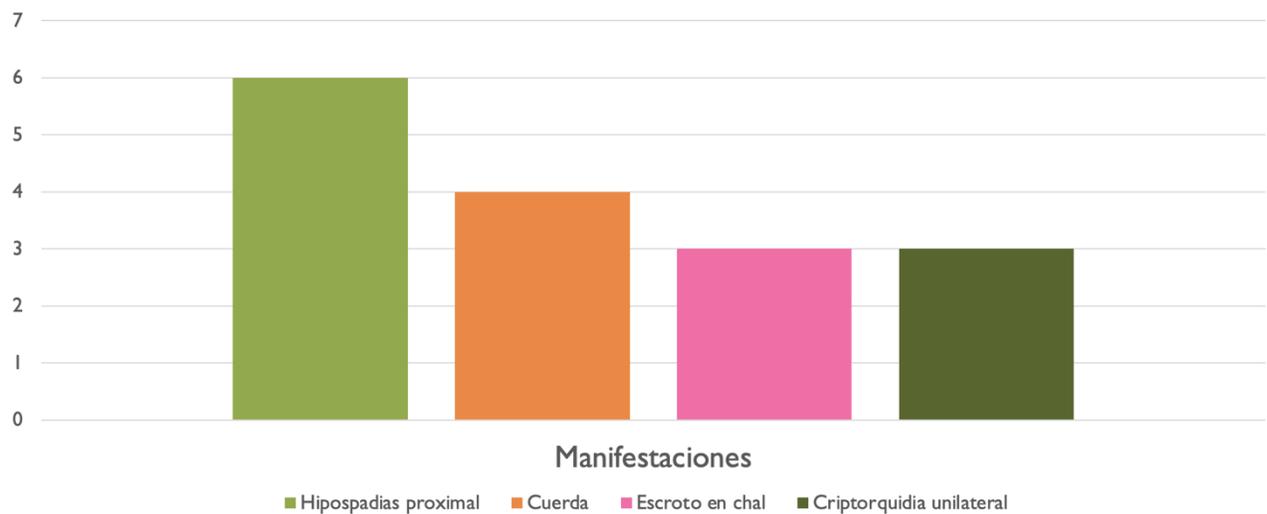


Figura 12. Manifestaciones más frecuentes

Cuatro de los 9 pacientes tenían alteraciones en otros sistemas o dismorfias, como cardiopatía compleja, persistencia del conducto arterioso, ectopia renal, retraso global del desarrollo, epilepsia, hemiagenesia tiroidea.

No todos contaban con la relación de testosterona/dihidrotestosterona ya que actualmente el Hospital Infantil de México Federico Gómez no cuenta con el reactivo DHT. Contamos con los valores de 5 pacientes en los que la media fue de 373 (rango de 21-1,600). Los niveles de T/DHT no se relacionaban con el grado de alteración de los pacientes.

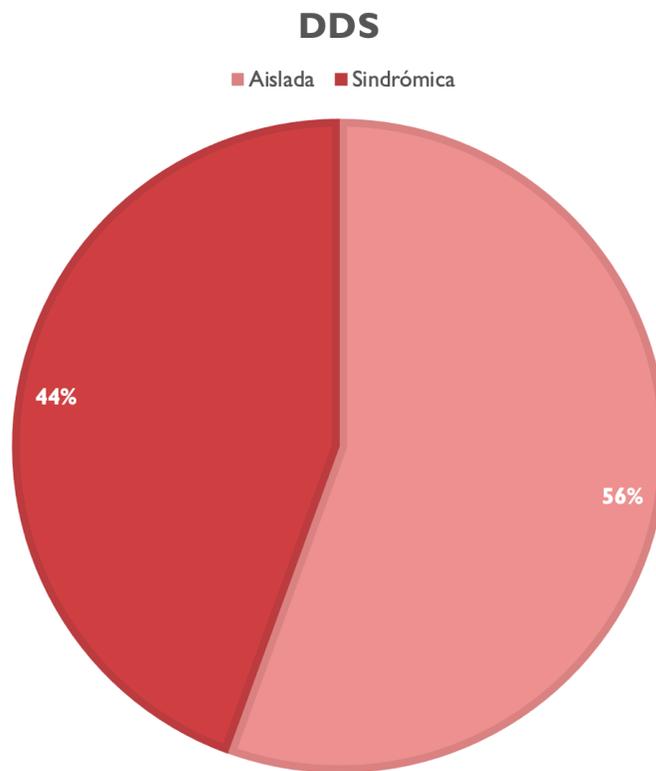


Figura 13. DDS sindrónicas versus aislada

## Resultados Secuenciación de Segunda Generación

En los 9 pacientes se encontraron un total de 804 variantes en los genes de interés *SRD5A2*, *AR*, *HSD17B3* y los genes causantes de disgenesia gonadal en pacientes XY. De las cuales, sólo en el paciente 5 se encontró una variante patogénica en estado homocigoto en *SRD5A2* (Tabla 3).

Paciente	Cuadro clínico	T/DHT	Gen	Cobertura	No. Variantes	Sitio	Predicción Franklin
1	Hipospadias proximal, cuerda	60	<i>SRD5A2</i>	80%	19	Intrónicas profundas, corriente abajo	Benignas
			<i>AR</i>	87%	15	Intrónicas profundas, repetido exón I	Benignas
			<i>HSD17B3</i>	100%	124	Intrónicas profundas	Benignas
			<i>DHX37</i>	98%	1	c.1583G>A p.Arg528Gln	Benignas
2	Hipospadias proximal, cuerda	119	<i>SRD5A2</i>	79%	7	Intrónica, I exónica	Benignas
			<i>AR</i>	91%	15		Benignas
3	Hipospadias proximal, escroto en chal, criptorquidia unilateral, epicanto	No	<i>SRD5A2</i>	76%	17	Intrónicas y exónicas	Benignas
			<i>AR</i>	81%	12	Intrónicas y exónicas	Benignas
			<i>HSD17B3</i>	100%	95	Intrónicas y exónicas	Benignas
4	Criptorquidia bilateral, escroto en chal, discapacidad intelectual, epilepsia, doble salida del ventrículo derecho, CIA, CIV	1,600	<i>SRD5A2</i>	52%	10	Intrónicas y de sitio de splicing	Benignas
			<i>AR</i>	77%	25	Intrónicas y exónicas	No valorable por baja confianza
			<i>HSD17B3</i>	95%	128	Intrónicas y exónicas	No valorable por baja confianza
5	Rol femenino. Estructuras labioescrotales no fusionadas, falo de 1.5cm, gónadas palpables.	No	<i>AR</i>	81%	26	Intrónicas y exónicas	Benignas
			<i>HSD17B3</i>	95%	131	Intrónicas y exónicas	Benignas
6	Hipospadias proximal, cuerda, escroto en chal, criptorquidia unilateral	No	<i>SRD5A2</i>	72%	17	Intrónicas profundas y en sitio aceptor	Benignas
			<i>AR</i>	89%	10	Intrónicas y exónicas	Benignas
			<i>HSD17B3</i>	100%	125	Intrónicas y exónicas	Benignas
7	Hipospadias proximal, cuerda, discapacidad intelectual, hipotonía, atrofia cortical	31.7	<i>SRD5A2</i>	79%	0		
			<i>AR</i>	89%	0		
			<i>HSD17B3</i>	100%	0		
8	Hipospadias proximal, escroto en chal, criptorquidia unilateral, ectopia renal y persistencia del conducto arterioso	21	<i>SRD5A2</i>	80%	0		
			<i>AR</i>	94%	0		
			<i>HSD17B3</i>	100%	0		
9	Rol femenino. Amenorrea primaria, crecimiento del tubérculo genital a los 15 años	35.2	<i>SRD5A2</i>	94%	3	Intrónicas y una exónica	Benignas
			<i>AR</i>	92%	6	Intrónicas y exónicas	Benignas
			<i>HSD17B3</i>	100%	18	Intrónicas profundas	Benignas

Tabla 3. Variantes benignas encontradas en genes de interés

Las variantes benignas se distribuyeron de la siguiente manera: 73 variantes en *SRD5A2*, 109 variantes en *AR* y 621 variantes en *HSD17B3* (Figura 14).

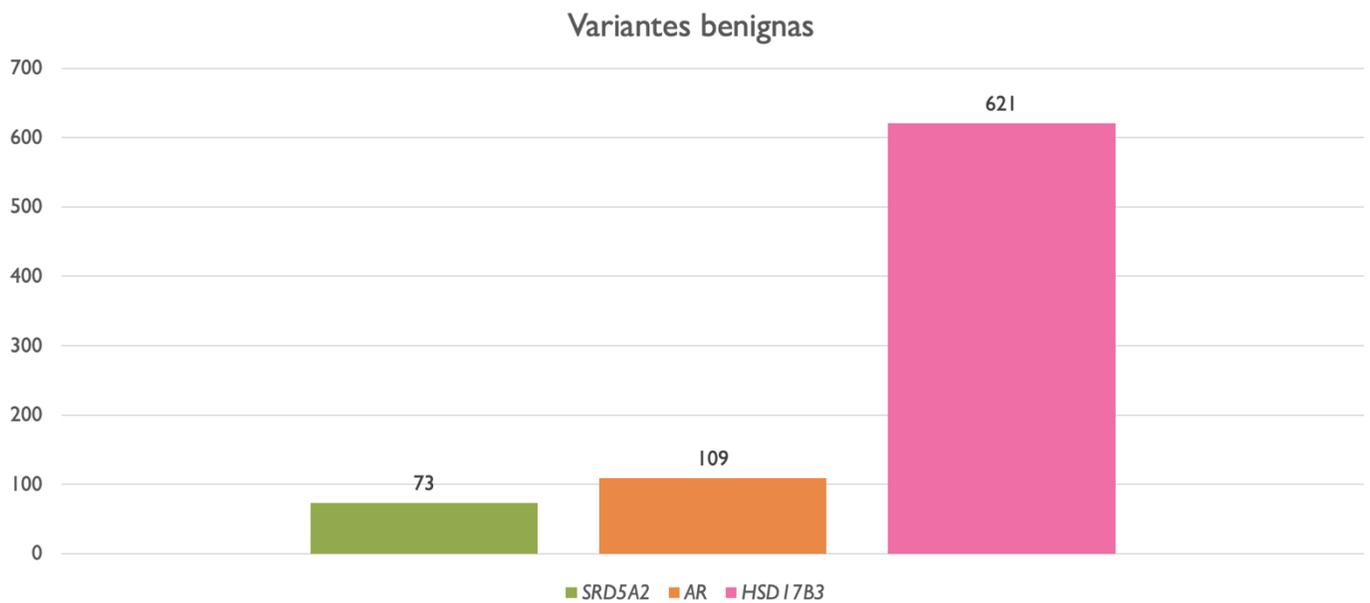


Figura 14. Variantes benignas en pacientes con DDS en genes de interés

De los 9 pacientes, se encontraron variantes probablemente causantes del cuadro clínico en cinco de ellos (Tabla 4), además del paciente 5, en quien se confirmó el diagnóstico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa.

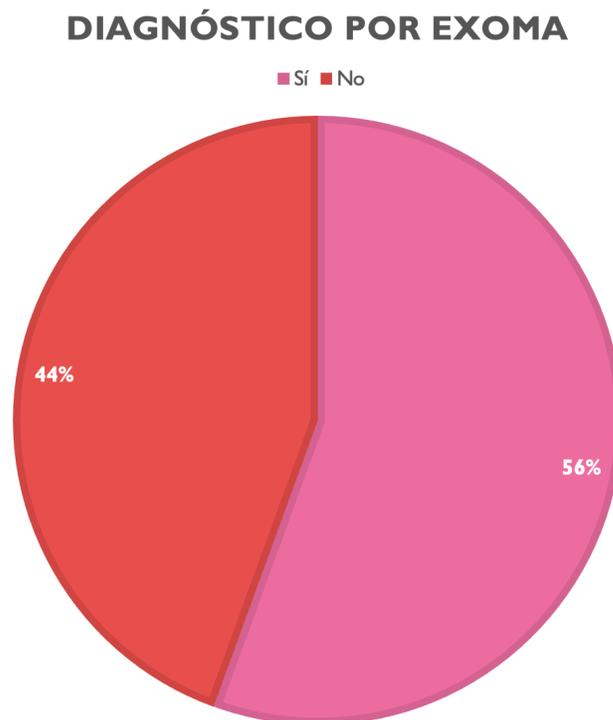


Figura 15. Porcentaje de pacientes en los que se llegó a un diagnóstico probable por exoma.

Paciente	Cuadro clínico	T/DHT	Gen	Cobertura	Variante	Predicción	Patología asociada
2	Hipospadias proximal, cuerda.	119	ZNRF3	90%	c.1265T>A p.Leu422His	VUS / Patogénica	Disgenesia gonadal
			GATA4	71%	c.542C>T p.Ala181Val	VUS / Probablemente patogénica	Disgenesia gonadal + cardiopatía
4	Criptorquidia bilateral, escroto en chal, discapacidad intelectual, epilepsia, doble salida del ventrículo derecho, CIA, CIV	1,600	ZFPM2	77%	c.1338_1339indelT p.Leu447fs	VUS / Probablemente patogénica	Disgenesia gonadal + cardiopatía
			LZTR1*	96%	c.993+1G>C	VUS / Patogénica	Síndrome de Noonan
5	Rol femenino. Estructuras labioescrotales no fusionadas, falo de 1.5cm, gónadas palpables.	NO	SRD5A2	95%	c.733C>T p.Arg245Trp (homocigota)	VUS / Patogénica	Deficiencia de 5-alfa Reductasa
6	Hipospadias proximal, cuerda, escroto en chal, criptorquidia unilateral	NO	MAP3K1	90%	c.3068G>A p.Arg1023His	VUS / Patogénica	Disgenesia gonadal
			LHX9	96%	c.20G>A p.Arg7Gln	VUS / Patogénica	
7	Hipospadias proximal, cuerda, discapacidad intelectual, hipotonía, atrofia cortical	31	GFAP*	100%	c.77C>T p.Ala26Val	VUS / Probablemente patogénica	Enfermedad de Alexander
8	Hipospadias proximal, escroto en chal, criptorquidia unilateral, ectopia renal y persistencia del conducto arterioso	21	FGFR1	93%	c.1081+7A>C	VUS	Síndrome de Kallmann
			ANOS5*	99%	c.1767C>A p.Tyr589*	Patogénica	Miopatía AD/ Displasia Gnatodiafisaria
9	Rol femenino. Amenorrea primaria, crecimiento del tubérculo genital a los 15 años	35.2	MAP3K1	92%	c.919C>T p.p.Arg307Cys.	Probablemente patogénica	Disgenesia gonadal

Tabla 4. Variantes potencialmente causantes de la enfermedad.

\* Genes que no pertenecen al panel de DDS

En el paciente 4 se identificó una variante patogénica en estado heterocigoto en el gen *LZTR1*, que causa síndrome de Noonan. A la revaloración del paciente, presentaba datos clínicos correspondientes a esta entidad, como talla baja, cardiopatía y fisuras palpebrales descendentes.. Pacientes con síndrome de Noonan pueden presentar alteraciones como cirpotorquidia y escroto en chal como en este paciente.



Fotografías clínicas del paciente 4. Se obtienen fotografías previa firma de consentimiento informado.

De los pacientes con diagnósticos probables, cabe señalar que 3 tuvieron variantes patogénicas que orientan hacia una disgenesia gonadal, mientras que sólo en un caso se corroboró la Deficiencia de 5-alfa Reductasa y que en ningún paciente se encontraron variantes patogénicas en AR.

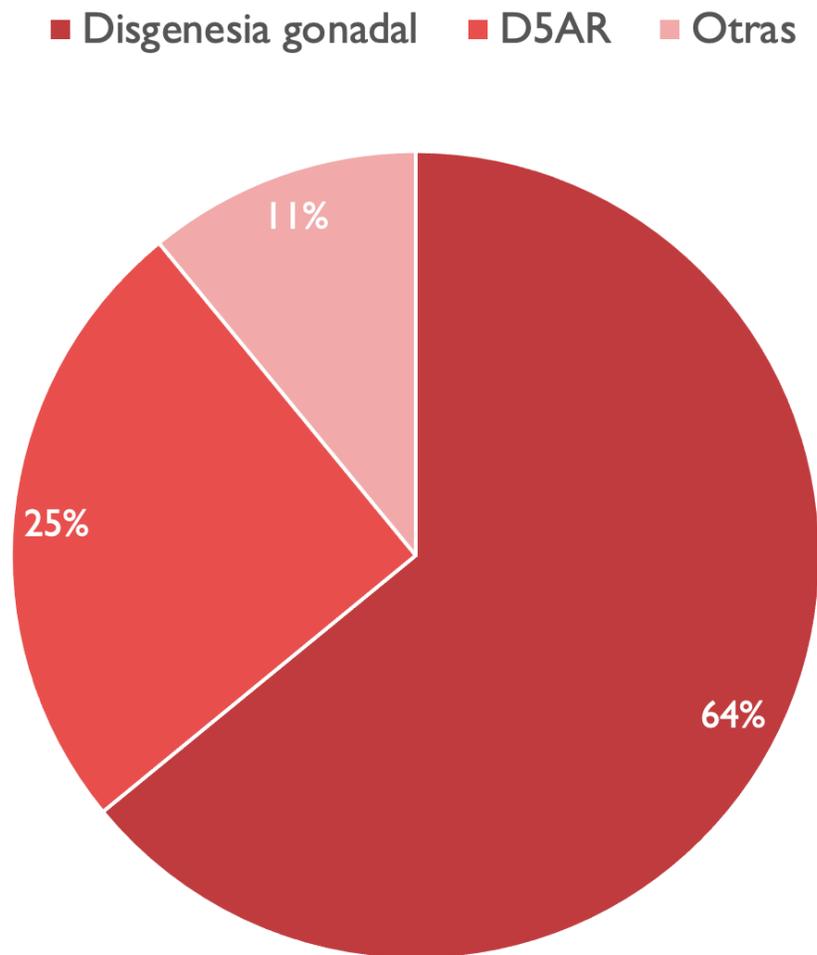


Figura 16. Porcentaje de diagnósticos en los pacientes.

## Discusión

El objetivo de este estudio fue identificar variantes genéticas en pacientes con diagnóstico clínico sugestivo de Deficiencia de 5-alfa Reductasa; una parte importante en el abordaje de esta patología es la medición de la relación de testosterona (T) /dihidrotestosterona (DHT), ya que la isoforma 2 de la 5-alfa reductasa es la única enzima que convierte T en DHT para el desarrollo de los genitales masculinos(2), biológicamente no existe otra causa que pudiera alterar esta relación.

Por falta de reactivo de DHT no se pudo realizar el estudio a todos los pacientes, pero de la cohorte de 9 pacientes, 6 contaban con valores  $>20$  por lo que el diagnóstico que se les había dado y que se encontraba en el expediente clínico era de Deficiencia de 5-alfa Reductasa. Al realizar el estudio de Secuenciación de Segunda Generación en estos pacientes esperábamos encontrar y reportar variantes del gen *SRD5A2* en nuestra población, ya que actualmente hay pocos casos reportados.(3, 4)

Se encontraron variantes en el gen *SRD5A2* en casi la totalidad de los pacientes, pero sólo una (0.7%) fue patogénica; las otras 73 variantes se clasificaron como benignas. Queremos entonces, destacar que encontrar un cambio en la secuencia de DNA en un gen no es forzosamente deletéreo o causante de enfermedad. Con estos datos consideramos que al ser un gen con múltiples variantes benignas, un estudio de tamiz tipo Análisis de Fusión de Alta Resolución (“HRM” por sus siglas en inglés) que sólo detecta de forma inespecífica que existe un cambio en la secuencia, no tendría valor diagnóstico.

Contrario a lo que esperábamos, ninguno de nuestros pacientes con una relación T/DHT tuvo variantes patogénicas en *SRD5A2*, por lo que se descarta el diagnóstico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa en ellos, cabe mencionar que todos ellos se encuentran en rol masculino. Se confirmó el diagnóstico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa en un paciente en rol femenino, con genitales atípicos. La secuenciación reveló que la paciente es homocigota para una

variante. En la historia clínica se negaron consanguinidad y endogamia, aunque valdría la pena reinterrogar y ampliar el árbol genealógico. Así mismo, debido a que los/as pacientes con esta entidad presentan virilización en la pubertad por la acción de otra isoforma de la enzima, es nuestro verer asesorar a los padres junto con el servicio de psicología para valorar cambio en el rol.

Una posible explicación del por qué encontramos sólo un paciente con esta patología es que la cobertura del gen *SRD5A2* no fue la ideal en todos los casos, siendo la más baja del 52% en el paciente 4. La falta de cobertura del gen por alteraciones en la técnica es una limitante de nuestro estudio. En los otros pacientes la cobertura es igual o mayor a 79%. Podría haber sido necesaria una nueva evaluación en el paciente 4, pero en él se encontraron variantes en otros genes que explican el fenotipo.

Se encontraron variantes patogénicas/probablemente patogénicas en genes del panel de disgenesia gonadal del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez en 3 pacientes. En el paciente 2 se encontraron variantes en *ZNRF3* y en *GATA4*. En 2018 se publicó el papel de *ZNRF3* en la determinación testicular al inhibir la vía canónica de WNT, donde reportan a un paciente con hipospadias proximal, como nuestro paciente.(25) Por su parte *GATA4* se encuentra en 8p23.1 y codifica un factor de transcripción esencial para el corazón y la determinación gonadal. (24) El paciente en el que se encontró esta variante no presenta cardiopatía, pero recientemente se ha propuesto que las alteraciones cardíacas en *GATA4* se propician al contar con variantes patogénicas en genes modificadores de la enfermedad como *LRP4* o *LHCGR*(26); por lo que la cardiopatía no siempre está presente en pacientes con variantes en este gen.

En el paciente 4 se encontraron variantes en los genes *ZFPM2* y *LZTR*. *ZFPM2*, antes conocido como *FOG2* (“Friend of GATA” por su siglas en inglés), se coexpresa con Gata4 en el corazón, el cerebro y las gónadas durante el desarrollo del ratón, con una alta expresión en las gónadas del ratón XY en el momento de la formación de células de Sertoli.(27) Se han reportado variantes en pacientes con disgenesia gonadal, tanto en rol masculino como femenino. Por otra parte, el gen *LZTRI* está implicado en el síndrome de Noonan con

herencia tanto AR como AD.(28) Las manifestaciones clínicas que presentan estos niños con frecuencia son macrocefalia relativa, facies característica con ptosis y fisuras palpebrales descendentes, cardiopatías congénitas, discapacidad intelectual y talla baja; también se han reportado alteraciones genitourinarias en la que se incluye la criptorquidia. (29) Estas manifestaciones concuerdan con las de nuestro paciente, con la diferencia en que la cardiopatía que presenta es más compleja que las que se ven comunmente en el síndrome de Noonan. Podría ser que *ZFPM2* actúe como modificador del fenotipo en el paciente en cuanto a la cardiopatía.

En el paciente 6 se encontraron variantes en los genes *MAP3K1* y *LHX9*. El gen de transducción de señales, *MAP3K1*, es parte de una red de genes responsables del desarrollo gonadal. Se han reportado casos con variación fenotípica que va desde disgenesia gonadal pura, en ocasiones con gonadoblastoma, hasta hipospadias y micropene con criptorquidia. (30) Estudios recientes sugieren que *MAP3K1* es uno de los genes con mayor frecuencia en Diferencias del Desarrollo Sexual 46,XY, reportado en el 13 a 18% de los pacientes. (31) En el año 2000 se publicó un estudio en el que *Lhx9* era esencial para la formación de gónadas en ratones. (32) Ya que el paciente presenta únicamente alteraciones en genitales, alteraciones en estos genes explican el fenotipo.

A la paciente 9 se le encontró una variante no reportada, con predicción de probablemente patogénica en el gen *MAP3K1*, que explica el fenotipo. Al tener variantes patogénicas en genes que causan disgenesia gonadal, podría ser de utilidad realizar biopsia de tejido gonadal, ya que el diagnóstico de disgenesia gonadal es histopatológico.

En el paciente 8 se encontraron variantes en los genes *FGFR1* y *ANO5*. Variantes en el gen *FGFR1* se asocian al síndrome de Kallmann 2. El síndrome de Kallmann se caracteriza por hipogonadismo hipogonadotrópico debido a la deficiencia de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y anosmia relacionada con la ausencia o hipoplasia de los bulbos olfatorios.(33). Entre otras manifestaciones clínicas se encuentran criptorquidia, micropene, mano hendida y labio/paladar hendido. (34) Esta variante no explica el fenotipo renal ni cardiológico del paciente y la variante que se encontró fue de significado incierto. Podría ser

de utilidad buscar esa variante en los padres. El gen *ANO5* se asocia a miopatía y a displasia gnatodiafisaria. Llama la atención que el paciente actualmente no presenta miopatía, ya que la enfermedad tiene una herencia autosómico dominante y la variante es patogénica. Podría ser de ayuda corroborar la variante por medio de secuenciación tipo Sanger.

Al paciente 7 se le encontró una variante en el gen *GFAP*, relacionado con la Enfermedad de Alexander. La enfermedad de Alexander es extremadamente rara, con una prevalencia de 5 años informada de 1 en 2,7 millones en el único estudio poblacional que se ha realizado. No hay reportes de Diferencias del Desarrollo Sexual en personas con esta patología. (35) Se continuará con el abordaje de este paciente.

Llama la atención que en nuestra cohorte de pacientes, aún sin tener la sospecha clínica de disgenesia gonadal, ésta es más frecuente que la Deficiencia de 5-alfa Reductasa. Dentro de las DDS 46,XY, se considera que la más frecuente es la Insensibilidad a los andrógenos. En nuestra cohorte, tal vez por el tamaño de la muestra, no encontramos variantes patogénicas en el gen *AR*. Otra razón por la falta de este diagnóstico es que la mayoría son por insensibilidad completa a los andrógenos, la cual generalmente no se diagnostica en edades pediátricas por el fenotipo femenino.

Comparando con otras cohortes con pacientes con diagnóstico de Deficiencia de 5-alfa Reductasa por el valor de la relación T/DHT, nuestra frecuencia de esta patología fue mucho menor (un paciente de los 9 secuenciados), lo que nos podría orientar a un error en la técnica de la relación T/DHT. El tener sólo un paciente con el diagnóstico es una limitante para este estudio, ya que no podemos hacer relación genotipo-fenotipo ni realizar grandes comparaciones con los fenotipos de los pacientes con otros diagnósticos como disgenesia gonadal.

El paciente con Deficiencia de 5-alfa Reductasa se encuentra en rol femenino, como una de las pacientes con disgenesia gonadal; aún así, sus genitales eran atípicos con gónadas palpables. Los otros dos pacientes con disgenesia gonadal se encontraban en rol masculino y cuadro clínico de cuerda e hipospadias proximal.

Finalmente, lo encontrado en nuestra cohorte de pacientes pudiera corresponder a lo reportado en la literatura, ya que en estudios de pacientes con diferencias del desarrollo sexual y secuenciación de segunda generación se ha observado que la Deficiencia de 5 alfa reductasa no es frecuente, generalmente ésta se encuentra ubicada después del Síndrome de Insensibilidad a Andrógenos y en algunos casos es incluso menos frecuente que la Disgenesia gonadal (33, 34).

## Conclusiones

Se estudió a los pacientes mediante Secuenciación de Segunda Generación en búsqueda de variantes en *SRD5A2* por el cuadro clínico y los estudios hormonales. Ya que no se encontró ninguna relación con los valores elevados de T/DHT y el diagnóstico molecular de Deficiencia de 5-alfa Reductasa, consideramos que, al menos en nuestra Institución no se puede realizar el diagnóstico clínico de la forma en la que las guías lo proponen. Consideramos que puede ser por un error en la técnica.

Por ende, la hipótesis no se cumplió. No se encontró el diagnóstico molecular de Deficiencia de 5-alfa Reductasa en la mayoría de los pacientes con ese diagnóstico clínico; en contraste, encontramos más casos de disgenesia gonadal, otra de las principales causas de Diferencias del Desarrollo Sexual.

La prevalencia en nuestra cohorte fue del 11% (1 de 9 pacientes), similar al 13% de la población en República Dominicana; aún así hace falta continuar con el estudio para contar con una cohorte más grande.

Por otro lado, contábamos con un grupo de pacientes con DDS 46,XY en el que por estudio de secuenciación se encontraron variantes que pueden explicar la enfermedad en un 56%, que es mayor que lo reportado (43-45%). (6) Por ende, el uso de la Secuenciación de Segunda Generación para el diagnóstico de pacientes con Diferencias del Desarrollo Sexual 46,XY en nuestra población podría aumentar la tasa de diagnóstico confirmatorio y así, disminuir los diagnósticos presuntivos erróneos. Ya que las enfermedades que encontramos tienen una herencia diferente al de la Deficiencia de 5-alfa Reductasa, nuestros pacientes se verán beneficiados con un asesoramiento genético adecuado.

Por último, con estos resultados sería relevante sospechar primero en disgenesia gonadal en pacientes con genitales atípicos 46,XY de este Instituto, ya que parece tener una mayor frecuencia en nuestra población que la Deficiencia de 5-alfa Reductasa y la Insensibilidad a Andrógenos. Esto cambiaría mucho el abordaje ya que nos hace darle un mayor peso al riesgo de cáncer en una gónada disgenética.

### Cronograma de actividades

MESES	ACTIVIDADES					
	Identificación de pacientes	Revisión clínica y toma de muestra de sangre periférica	Realización de secuenciación de segunda generación	Análisis de datos	Redacción de tesis	Preparación de Publicación
Jul-Ago	X	X				
Sept-Oct	X	X	X			
Nov-Dic	X	X	X		X	
Ene-Feb			X	X	X	
Mar-Abr				X	X	
Mayo-Jun						X
Jul-Ago						X
Sept-Oct						X

## Referencias bibliográficas

1. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*. 1974;186(4170):1213-5.
2. Kumar G, Barboza-Meca JJ. 5 Alpha Reductase Deficiency. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.
3. Canto P, Vilchis F, Chavez B, Mutchinick O, Imperato-McGinley J, Perez-Palacios G, 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. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997;46(2):155-60.
4. Maria Guadalupe OL, Katy SP, Charmina AA, Vihko P, Marta M. Molecular Characterization of Two Known SRD5A2 Gene Variants in Mexican Patients With Disorder of Sexual Development. *Front Genet*. 2021;12:794476.
5. Achermann JC, Domenice S, Bachega TA, Nishi MY, Mendonca BB. Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(8):478-88.
6. Leon NY, Reyes AP, Harley VR. A clinical algorithm to diagnose differences of sex development. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7(7):560-74.
7. Maimoun L, Philibert P, Cammas B, Audran F, Bouchard P, Fenichel P, et al. Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5alpha-reductase deficiency: an extensive international experience of 55 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(2):296-307.
8. Akgun S, Ertel NH, Imperato-McGinley J, Sayli BS, Shackleton C. Familial male pseudohermaphroditism due to 5-alpha-reductase deficiency in a Turkish village. *Am J Med*. 1986;81(2):267-74.
9. Imperato-McGinley J, Gautier T, Peterson RE, Shackleton C. The prevalence of 5 alpha-reductase deficiency in children with ambiguous genitalia in the Dominican Republic. *J Urol*. 1986;136(4):867-73.
10. Avendano A, Paradisi I, Cammarata-Scalisi F, Callea M. 5-alpha-Reductase type 2 deficiency: is there a genotype-phenotype correlation? A review. *Hormones (Athens)*. 2018;17(2):197-204.
11. Batista RL, Mendonca BB. Integrative and Analytical Review of the 5-Alpha-Reductase Type 2 Deficiency Worldwide. *Appl Clin Genet*. 2020;13:83-96.
12. Deeb A, Al Suwaidi H, Ibukunoluwa F, Attia S. Phenotype, Sex of Rearing, Gender Re-Assignment, and Response to Medical Treatment in Extended Family Members with a Novel Mutation in the SRD5A2 Gene. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2016;8(2):236-40.
13. Sasaki G, Ogata T, Ishii T, Kosaki K, Sato S, Homma K, et al. Micropenis and the 5alpha-reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(7):3431-6.

14. Hage M, Drui D, Francou B, Mercier S, Guiochon-Mantel A, Belaisch-Allart J, et al. Structural analysis of the impact of a novel androgen receptor gene mutation in two adult patients with mild androgen insensitivity syndrome. *Andrologia*. 2021;53(1):e13865.
15. Hornig NC, Holterhus PM. Molecular basis of androgen insensitivity syndromes. *Mol Cell Endocrinol*. 2021;523:111146.
16. Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, Pasterski V, Mastroiannopoulou K, MacDougall J. Androgen insensitivity syndrome. *Lancet*. 2012;380(9851):1419-28.
17. Alikasifoglu A, Vuralli D, Hiort O, Gonc N, Ozon A, Kandemir N. Severe Undervirilisation in a 46,XY Case Due to a Novel Mutation in HSD17B3 Gene. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2015;7(3):249-52.
18. Boehmer AL, Brinkmann AO, Sandkuijl LA, Halley DJ, Niermeijer MF, Andersson S, et al. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(12):4713-21.
19. Lee YS, Kirk JM, Stanhope RG, Johnston DI, Harland S, Auchus RJ, et al. Phenotypic variability in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency and diagnostic pitfalls. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67(1):20-8.
20. Qiu W, Zhou M, Labrie F, Lin SX. Crystal structures of the multispecific 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5: critical androgen regulation in human peripheral tissues. *Mol Endocrinol*. 2004;18(7):1798-807.
21. Castro CC, Guaragna-Filho G, Calais FL, Coeli FB, Leal IR, Cavalcante-Junior EF, et al. Clinical and molecular spectrum of patients with 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (17-beta-HSD3) deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(8):533-9.
22. Rocha VB, Guerra-Junior G, Marques-de-Faria AP, de Mello MP, Maciel-Guerra AT. Complete gonadal dysgenesis in clinical practice: the 46,XY karyotype accounts for more than one third of cases. *Fertil Steril*. 2011;96(6):1431-4.
23. El-Sherbiny M. Disorders of sexual differentiation: I. Genetics and pathology. *Arab J Urol*. 2013;11(1):19-26.
24. Elzaiat M, McElreavey K, Bashamboo A. Genetics of 46,XY gonadal dysgenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2022;36(1):101633.
25. Harris A, Siggers P, Corrochano S, Warr N, Sagar D, Grimes DT, et al. ZNRF3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(21):5474-9.
26. Martinez de LaPiscina I, de Mingo C, Riedl S, Rodriguez A, Pandey AV, Fernandez-Cancio M, et al. GATA4 Variants in Individuals With a 46,XY Disorder of Sex Development (DSD) May or May Not Be Associated With Cardiac Defects Depending on Second Hits in Other DSD Genes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:142.
27. Bashamboo A, Brauner R, Bignon-Topalovic J, Lortat-Jacob S, Karageorgou V, Lourenco D, et al. Mutations in the FOG2/ZFPM2 gene are associated with anomalies of human testis determination. *Hum Mol Genet*. 2014;23(14):3657-65.
28. Yamamoto GL, Aguená M, Gos M, Hung C, Pilch J, Fahiminiya S, et al. Rare variants in SOS2 and LZTR1 are associated with Noonan syndrome. *J Med Genet*. 2015;52(6):413-21.

29. Umeki I, Niihori T, Abe T, Kanno SI, Okamoto N, Mizuno S, et al. Delineation of LZTR1 mutation-positive patients with Noonan syndrome and identification of LZTR1 binding to RAF1-PPP1CB complexes. *Hum Genet.* 2019;138(1):21-35.
30. Granados A, Alaniz VI, Mohnach L, Barseghyan H, Vilain E, Ostrer H, et al. MAP3K1-related gonadal dysgenesis: Six new cases and review of the literature. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2017;175(2):253-9.
31. Ostrer H. Disorders of sex development (DSDs): an update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):1503-9.
32. Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, et al. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature.* 2000;403(6772):909-13.
33. Villanueva C, de Roux N. FGFR1 mutations in Kallmann syndrome. *Front Horm Res.* 2010;39:51-61.
34. Hu Y, Bouloux PM. Novel insights in FGFR1 regulation: lessons from Kallmann syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(6):385-93.
35. Messing A. Alexander disease. *Handb Clin Neurol.* 2018;148:693-700.

#### Limitaciones del estudio

- Dificultad para contactar pacientes.
- No todos los pacientes contraron con la medición de dihidrotestosterona, por lo que no se pudo obtener la relación testosterona/dihidrotestosterona.
- La cobertura de la secuenciación de segunda generación que en algunas regiones fue baja, por lo que no se pueden descartar variantes en dichas regiones