

00544 2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

UTILIDAD CLINICA DE LA DETERMINACION DE LA GLOBULINA
FIJADORA DE HORMONAS SEXUALES POSTERIOR A LA
ADMINISTRACION DE GONADOTROPINA CORIONICA EN
NIÑOS PREPUBERES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIZACION EN BIOQUIMICA CLINICA

P R E S E N T A :

Q.F.B. BLANCA JIMENA CALVARIO GOMEZ

ASESOR: DR. RAUL CALZADA LEON



INP

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



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 NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN

BIOL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE.
Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.
P r e s e n t e.

Me es grato informarle que la alumna **BLANCA JIMENA CALVARIO GÓMEZ** presentará próximamente su examen para obtener el diploma de Especialización en Bioquímica Clínica (Clave 341) ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dra. Rebecca Franco Bourland (FQ)
Primer Vocal	Dra. María de la Luz Ruiz Reyes (I.N.Ped.)
Secretario:	Dr. Fernando Montiel Aguirre (FQ)
Primer Suplente:	Dra. Martha Menjivar Iraheta (FQ)
Segundo Suplente:	Esp.B.C. Romelia Velasco Ortiz (I.N.Ped.)

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., 26 de octubre de 2001.

El Director

M. EN C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAÍNO

C.c.p. Integrantes del Jurado
C.c.p. Coordinador de Área
C.c.p. Departamento de Control Escolar
C.c.p. Interesado
*ggm.



A mi preciosa niña

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme una vida plena.

A mi amado papá Francisco Javier, porque siempre has sido mi fuerza.

A mi preciosa mamá, Alma Leticia, porque admiro muchísimo la fuerza con la que luchas por lo que quieres.

Al tesoro más valioso que tengo, mi familia.

A quienes representan la bendición más grande de mi vida, y a quienes quiero muchísimo mis amigos Elloy, Javier, Neri, Iván y especialmente a: Norma, porque es un privilegio tenerte conmigo; a Adriana, porque eres como mi ángel de la guarda y a Paty, porque eres un ejemplo de vida.

Al Dr. Raúl Calzada León, por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

A la M. en C. María Antonia González Zavala, porque sin su ayuda este trabajo difícilmente hubiese llegado a finalizarse.

Al personal que labora en el Instituto Nacional de Pediatría, por compartir sus conocimientos y su experiencia con nosotros.

A mis maestros, sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer su vida de lucha, sacrificio y superación constante.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
CAPITULO 1: GENERALIDADES	
1.1 Anatomía y biología celular de la diferenciación sexual	6
1.2 Diferenciación testicular	7
1.3 Desarrollo de los genitales internos y externos	7
1.4 Regulación de la diferenciación sexual masculina	9
1.5 Alteraciones en la diferenciación sexual masculina	13
1.5.1 Disgenesia gonadal	15
1.5.2 Defectos en la biosíntesis de testosterona	16
1.5.3 Insensibilidad a andrógenos	17
1.5.4 Deficiencia de 5- α reductasa	19
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES	22
OBJETIVO	25
HIPÓTESIS	26
CAPÍTULO 3: DESARROLLO EXPERIMENTAL	
3.1 Población por estudiar	27
3.1.1 Criterios diagnósticos de los pacientes estudiados	28
3.1.2 Criterios de inclusión	30
3.1.3 Criterios de exclusión	30
3.1.4 Criterios de eliminación	30
3.2 Experimentación	
3.2.1 Obtención de muestras	31
3.2.2 Mediciones hormonales	31
3.2.2.1 Medición de testosterona	32
3.2.2.2 Medición de SHBG	33
3.2.2.3 Medición de dihidrotestosterona	35

CAPÍTULO 4: ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN**4.1 Resultados**

4.1.1 Prueba de estimulación	38
4.1.2 Pacientes con diagnóstico de orquidopexia unilateral	40
4.1.3 Paciente con diagnóstico de panhipopituitarismo	42
4.1.4 Paciente con disgenesia gonadal mixta	43
4.1.5 Pacientes con deficiencia de 5 α -reductasa	45
4.1.6 Pacientes con Síndrome de resistencia a andrógenos	49

4.2 Discusión	53
---------------	----

CONCLUSIONES	56
--------------	----

REFERENCIAS	57
-------------	----

RESUMEN

La determinación y diferenciación sexual son procesos secuenciales que involucran factores genéticos y hormonales, que comienzan con el establecimiento del sexo genético en el momento de la concepción, seguido de la diferenciación gonadal y terminan en la pubertad con la maduración sexual y la capacidad de procrear.

Por tanto, cualquier alteración genética durante esta secuencia ordenada de eventos, traerá como consecuencia alteraciones en la diferenciación gonadal que se manifiestan por ambigüedad de genitales, discordancia entre el fenotipo y el sexo genético al nacimiento, o por alteraciones en la edad de presentación y calidad del desarrollo puberal. Una de las consecuencias de esto es una entidad conocida como pseudohermafroditismo masculino (PHM), que se define como masculinización incompleta de los genitales externos en sujetos en cariotipo 46 XY y testículos histológicamente normales o con gónadas en estría. La apariencia de los genitales externos varía desde ser femeninos con un saco vaginal ciego, hasta ambigüedad mínima e hipospadias. Entre las causas de PHM se encuentran: la disgenesia gonadal, defectos en la biosíntesis de testosterona o de la dihidrotestosterona, anomalías en la respuesta de los tejidos a andrógenos, síndrome de conductos de Muller persistentes y otros síndromes dismórficos asociados a disgenesia gonadal.

En el estudio inicial de estos pacientes, se realiza una prueba de estimulación con gonadotropina coriónica (hCG) para evaluar la capacidad esteroidogénica de los testículos. De tal manera que varios autores han reportado que en niños prepúberes se puede encontrar una relación inversamente proporcional entre las concentraciones y actividad biológica de la testosterona y la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG, de sus siglas en inglés: sex hormone binding globulin) durante la estimulación con hCG, testosterona exógena u otros andrógenos sintéticos. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten definir si esta relación depende de la capacidad máxima de producción de testosterona independiente de la producción de dihidrotestosterona, o si la

respuesta depende de ambas hormonas. Por otro lado, los resultados son contradictorios con respecto a la respuesta a la estimulación con hCG.

Por tanto el objetivo de este trabajo fue determinar si existe una relación entre la producción inducida de testosterona y dihidrotestosterona mediante estimulación con hCG y las concentraciones séricas de la SHBG que permitiera evaluar la respuesta a los andrógenos in vivo.

Se estudiaron en total 12 pacientes con edades comprendidas entre 2 y 9 años, con cariotipo 46 XY (excepto un paciente con cariotipo 45 XO/46 XY) con diagnóstico de: disgenesia gonadal mixta, deficiencia de 5 α -reductasa, insensibilidad a andrógenos; y como controles niños con orquidopexia unilateral o gonadectomía bilateral. La prueba de estimulación consistió en administrar 2,500 UI diarias de hCG IM (Gonadotropil C) durante cuatro días. Se obtuvo una muestra de sangre basal y 4 muestras 24 horas después de cada dosis, para la medición de testosterona, dihidrotestosterona y SHBG. En dos pacientes gonadectomizados la estimulación se realizó con testosterona con una dosis de 2 mg/kg de peso por vía intramuscular. Se analizó una muestra basal y posteriormente una muestra a los 2, 4 y 6 días.

Las determinaciones hormonales se realizaron por quimioluminiscencia, radioinmunoanálisis y ensayo radioinmunométrico.

Se observó una respuesta positiva de testosterona (>100 ng/dl) a la estimulación con hCG en todos los pacientes, con excepción de un niño con panhipopituitarismo. Los niveles de dihidrotestosterona aumentaron también en todos los pacientes excepto en un paciente con gonadectomía. No se observaron diferencias en el comportamiento ó en el cociente testosterona/dihidrotestosterona entre los pacientes con deficiencia de 5 α -reductasa y los pacientes con insensibilidad a andrógenos, disgenesia gonadal mixta, gonadectomía bilateral u orquidopexia unilateral.

Ninguno de los pacientes a quienes se les administró hCG mostró un cambio significativo en los niveles de SHBG. Sólo en un paciente con deficiencia de 5 α -reductasa a quien se le administró testosterona se observó una disminución significativa de los niveles de SHBG.

En este trabajo concluimos que no existe una relación entre la producción inducida de testosterona y dihidrotestosterona mediante estimulación con gonadotropina coriónica humana y las concentraciones séricas de la globulina fijadora de hormonas sexuales que sea útil como indicador de la respuesta biológica de los tejidos a andrógenos in vivo.

INTRODUCCIÓN

La diferenciación y desarrollo sexual masculinos requieren una serie de eventos que comprenden la activación del gen SRY localizado en el cromosoma Y y otros genes autosómicos; la producción testicular de la Hormona anti-Mulleriana y testosterona; la conversión de testosterona en dihidrotestosterona por la 5 α -reductasa; la respuesta de los tejidos a los andrógenos y la producción normal de gonadotropinas por el eje hipotálamo-hipofisiario durante el segundo y tercer trimestres de gestación. Por tanto, los defectos en cualquiera de estos eventos traerá como consecuencia entre otras alteraciones, la masculinización incompleta de los genitales en individuos con cariotipo 46 XY y testículos normales, una condición conocida como pseudohermafroditismo masculino (PHM)¹.

Las alteraciones del desarrollo sexual generalmente se manifiestan desde el nacimiento, y representan un problema diagnóstico y terapéutico para el médico. Dicho abordaje diagnóstico y terapéutico requiere un plan de estudios de acuerdo a la edad y características del paciente que permitan determinar la causa de la anormalidad, establecer un tratamiento, y finalmente decidir la asignación social del sexo del paciente en base a las posibilidades de reconstrucción quirúrgica, la función sexual en la vida adulta, la capacidad de reproducción y otros factores como la adaptación psicológica, social y cultural del paciente y su familia.

Para definir lo anterior, es necesario contar con un equipo multidisciplinario integrado por especialistas en diversas áreas como cirugía, endocrinología, genética, ginecología, patología, pediatría, psicología, radiología, trabajo social y urología; así como la realización de estudios de laboratorio y gabinete que incluyan el cariotipo, determinaciones hormonales y de sus precursores, determinación de receptores hormonales, actividad enzimática, pruebas especiales de genética molecular; ultrasonido abdominal y cisterourografía².

La prueba de estimulación con gonadotropina coriónica se utiliza en la evaluación inicial del paciente con PHM. Cuando la respuesta es positiva sugiere la presencia de testículos con células de Leydig funcionales con capacidad esteroideogénica para sintetizar andrógenos. Al mismo tiempo, esta prueba permite observar la respuesta clínica de la elevación de testosterona y dihidrotestosterona en función del aumento del volumen del pene y testículos. Sin embargo, entre los 2 y 9 años de edad, la capacidad de respuesta gonadal es limitada por encontrarse el organismo en la fase de capacidad reproductiva latente, dificultándose así el estudio de niños de este grupo de edad.

Recientemente se reportó que a estas edades se puede encontrar una relación inversamente proporcional entre las concentraciones de testosterona y SHBG (de sus siglas en inglés: sex hormone binding globulin), pero los análisis realizados no permiten definir si existe una relación entre la capacidad máxima de producción de testosterona independiente de la producción de dihidrotestosterona, o si la respuesta depende de ambas hormonas^{10 - 11}.

Definir lo anterior, permitirá ampliar el arsenal diagnóstico con el que se cuenta en la actualidad para el estudio de pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual.

GENERALIDADES

1.1 Anatomía y biología celular de la diferenciación sexual

La adquisición de un fenotipo sexual dimórfico es un elemento esencial para el desarrollo del ser humano. Aún cuando la maduración de la función sexual y la reproducción ocurren después del nacimiento, esencialmente todos los eventos críticos para llegar a éste ocurren durante la embriogénesis.

Estos eventos pueden ser divididos en dos procesos secuenciales, la determinación y diferenciación sexual. La primera, se establece por el complemento cromosómico XX o XY y otros genes contenidos en los autosomas en el momento de la fecundación, y es el inicio de una cascada de eventos genéticos que determina si la gónada indiferenciada se convertirá en ovario o testículo. Así mismo, la diferenciación sexual se refiere a los eventos subsecuentes que producirán finalmente un fenotipo sexual masculino o femenino, así como la maduración sexual durante la pubertad a través de la acción de hormonas específicas³.

Hasta los 42 días de gestación, los ovarios y los testículos son indistinguibles y por tanto son llamadas gónadas bipotenciales o indiferenciadas. Estas gónadas bipotenciales se desarrollan a partir de la cresta urogenital, una estructura derivada del mesodermo intermedio en la pared posterior de la cavidad abdominal que se forma aproximadamente a los 28 días de gestación. Esta estructura también contiene precursores celulares de la corteza adrenal y riñones. La porción gonadal de esta cresta resulta de la proliferación rápida del epitelio celómico y la condensación del mesénquima adyacente en el lado medial del mesonefros.

El evento central en la diferenciación sexual del feto es el desarrollo de la gónada indiferenciada en testículo u ovario.

1.2 Diferenciación testicular

En los mamíferos en general, la determinación sexual masculina es iniciada por la activación de un gene, el SRY (de sus siglas en inglés: sex determining region Y chromosome), en las células somáticas del puente genital alrededor de la sexta semana de gestación, activando una serie de genes, que a su vez median la conversión de la gónada bipotencial en testículo. En ausencia de estos genes testículo-determinantes, la gónada indiferenciada se desarrolla inherentemente hacia ovario⁴.

Independientemente del sexo genético, las células germinales primordiales aparecen entre las células del endodermo en la pared del saco vitelino a los 24 días de gestación. Estas células germinales migran a lo largo del alantoides, la pared del intestino posterior, y el mesenterio dorsal para entrar en la cresta gonadal primitiva alrededor de la sexta semana de gestación. Posteriormente, inicia la diferenciación de las células de Sertoli y la formación de los cordones sexuales primarios (cordones seminíferos) a las 6.5 semanas de gestación, estos cordones sexuales primarios provienen de células epiteliales que se extienden dentro del mesénquima subyacente. Finalmente se forma una capa de tejido conectivo fibroso (túnica albugínea) alrededor de la gónada, separando los cordones testiculares del epitelio superficial alrededor del día 42. Estos cordones medulares sólidos, que poseen células de Sertoli y células germinales primordiales, se convierten en túbulos seminíferos poco antes de la pubertad. Las células de Leydig aparecen en el intersticio testicular durante la octava semana de gestación, e inician la producción de testosterona por la estimulación de la gonadotropina coriónica placentaria, y posteriormente por la hormona luteinizante fetal⁵.

1.3 Desarrollo de los genitales internos y externos

Inicialmente, el tracto urogenital también es indistinguible en los embriones femeninos o masculinos. Durante la fase indiferenciada, ambos embriones poseen dos pares de ductos genitales: los ductos de Wolf o mesonefricos, y los ductos de Muller o paramesonefricos. Ambos pares de ductos se desarrollan dentro de la cresta urogenital alrededor de la sexta semana de gestación, de una región del mesonefros que no participa en la formación de la

gonada fetal; y terminan en el seno urogenital que se abre en el perineum a nivel del orificio urogenital, localizado en la base del tubérculo genital. Los conductos de Wolff se originan en la región posteromedial de la cresta y en su extremo inferior alcanzan la pared lateral de la cloaca, formando así el seno urogenital primitivo. La parte frontal de este seno da origen al primordio vesicoureteral, mientras que la porción caudal forma el seno urogenital definitivo. En el feto masculino, la parte anterior de los ductos de Wolff forman el epidídimo, mientras que la parte posterior da origen al conducto deferente y la vesícula seminal; este proceso ocurre entre la novena y treceava semanas de gestación, y es dependiente de una concentración local alta de testosterona. Por otro lado, los ductos Mullerianos se desarrollan como invaginaciones longitudinales del epitelio celómico a lo largo de la región anterolateral de la cresta urogenital. El extremo celómico de éstos da lugar al ostium de las trompas de Falopio y la porción terminal inferior los ductos se fusiona para formar el conducto uterovaginal, que se une a la pared posterior del seno urogenital y forma el tubérculo Mulleriano. En presencia la hormona anti-Mulleriana (HAM), secretada por las células de Sertoli alrededor de la séptima a octava semana de gestación comienza la regresión de los ductos de Muller alrededor del día 51 posterior a la ovulación y desaparecen en el día 64⁶.

Durante las primeras 6 semanas del desarrollo fetal, los genitales externos son también idénticos en ambos sexos. Estas estructuras bipotenciales están formadas por los pliegues urogenitales, que se desarrollan lateralmente a la membrana urogenital; los cojinetes labioescrotales que se encuentran adyacentes a los pliegues urogenitales y el tubérculo genital, que se forma por fusión de los pliegues urogenitales.

La masculinización de los genitales externos comienza a partir del día 65 de la concepción: la distancia anogenital aumenta; el seno urogenital aumenta de tamaño y forma la uretra prostática y perineal; los cojinetes labioescrotales se fusionan, de tal manera que cada uno forma la mitad ipsilateral del escroto; los pliegues urogenitales se fusionan para formar la uretra y el rafe medio del pene. El proceso de masculinización se completa a la 14va. semana de gestación, sin embargo, no se observan diferencia entre el tamaño del pene y el clítoris hasta después de la semana 16, aunque el crecimiento más importante ocurre entre la semana 20 y el término de la gestación⁵. Tanto la

masculinización de los genitales externos, como el desarrollo de la próstata y la uretra prostática dependen de un andrógeno más potente, la dihidrotestosterona (DHT). Esta última hormona se deriva de la reducción de la testosterona por la enzima llamada 5 α -reductasa tipo 2, codificada por el gen SRD5A2 localizado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p23). Se expresa en el seno y tubérculo genitales, así como en los pliegues urogenitales antes del inicio de la diferenciación sexual. También se expresa en la piel genital fetal, folículos pilosos en el adulto, corteza cerebral, hígado, próstata, vesículas seminales, epidídimo y células adiposas. La tipo 1 se expresa transitoriamente en la piel del recién nacido y postnatalmente también en el hígado. Ambas, la testosterona y la DHT se unen al receptor de andrógenos, sin embargo la DHT se une con mayor afinidad y su tasa de disociación es menor^{6,31}.

1.4 Regulación de la diferenciación sexual masculina

El papel crítico del cromosoma Y en la regulación de la morfogénesis del testículo fue elucidada a finales de la década de los 50s por Ford y Jacobs⁶ quienes demostraron que el cromosoma Y está asociado con la diferenciación testicular en gónadas humanas con diferenciación anormal.

Posteriormente, mediante el análisis de translocaciones cromosómicas en varones XX y de delección en mujeres XY, Page⁶ y col. definieron una región crítica para la determinación testicular en el brazo corto de cromosoma Y, cerca de la región pseudoautosómica de apareamiento X-Y. Dentro de esta región identificaron un segmento de 140 kb que estaba presente en un varón XX y ausente en una mujer XY. Inicialmente se pensó que este gen, llamado ZFY (de sus siglas en inglés: zinc finger Y), altamente conservado que codifica una proteína de unión al ADN que contiene un dedo de zinc podría ser el componente cromosómico que determinara el sexo, esto es el factor determinante del testículo (TDF, de sus siglas en inglés: testicular determining factor). Sin embargo, después se demostró que este gen estaba ausente en varios varones XX⁶.

El análisis posterior de estos varones reveló que poseen un segmento cromosómico entre el gen ZFY y la región pseudoautosómica de apareamiento X-Y. Fue entonces cuando

Sinclair y col. delimitaron la región crítica de este segmento a 35 kb. Esta región contiene una sola copia de un gen que codifica a una proteína que pertenece a la familia de factores de transcripción HMG (Grupo de alta movilidad)⁶.

La proteína SRY tiene un dominio de unión al ADN de 80 aminoácidos denominado "caja HMG" (de sus siglas en inglés: high mobility group) altamente conservado a través de la evolución. La expresión de éstas proteínas es regulada durante el desarrollo en tejidos específicos. Estudios multidimensionales de resonancia magnética nuclear indican que SRY interactúa con el surco menor de ADN e induce un plegamiento en la doble hélice. De hecho, ciertas mutaciones del SRY alteran el plegamiento y no su unión al ADN, por alteración de la conformación de la caja HMG o el contacto directo entre ambos. Lo anterior sugiere que el SRY, como otras proteínas HMG pueden regular la expresión génica mediante efectos "arquitectónicos" que modifican regiones promotoras facilitando así la acción de otros reguladores transcripcionales. Sin embargo, aún no se han identificado los genes sobre los que el SRY actúa directamente⁷.

Existe evidencia de que el SRY controla la expresión de enzimas esteroideogénicas y que se une a la región promotora del gen de la hormona anti-Mülleriana (HAM)⁹.

La HAM es glicoproteína compuesta por dos subunidades idénticas de 70 kDa que en el feto masculino causa la regresión del ducto de Muller que formaría el útero, las trompas uterinas y el tercio superior de la vagina en el embrión femenino alrededor del día 64 de vida fetal. También inhibe otros procesos como la meiosis del oocito, la producción de aromatasa en el ovario fetal, los niveles del receptor de la hormona luteinizante y la aromatasa y la síntesis de progesterona inducida por el factor de crecimiento epidérmico en el ovario después del nacimiento. El gen de la HAM se localiza en el brazo corto del cromosoma 19, y pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento transformante- β^4 .

Sin embargo, para el desarrollo gonadal se requieren otros genes autosómicos o ligados a X, que conforman una cascada genética responsable de dirigir la morfogénesis y diferenciación adecuadas para crear un testículo o un ovario.

SOX

Se han descrito otros genes autosómicos relacionados estructuralmente con el SRY, que están involucrados en el desarrollo testicular. Uno de ellos es el SOX9, que comparte un 71% de similitud con la caja HMG. Este gen está involucrado en la condrogénesis y la diferenciación gonadal. Se expresa en las células somáticas de la gónada masculina antes de la expresión de la HAM y la formación del cordón sexual. Aunado a esto, SOX9 presenta una translocación subcelular sexo-específica desde el citoplasma hacia el núcleo en las células somáticas de la cresta urogenital masculina en el momento de la diferenciación testicular y la secreción de la HAM. A las 6.5 semanas de gestación, cuando comienza la diferenciación de las células de Sertoli y la formación del cordón sexual, la expresión de SOX9 se restringe al núcleo de las células de Sertoli mientras que permanece citosólico en el embrión femenino en la etapa correspondiente⁸.

SOX9 es también un activador del gen del colágeno tipo II, que a su vez es esencial para la formación de la matriz extracelular del cartílago. Por lo tanto, las mutaciones de éste gen ocasionan reversión sexual en individuos XY así como malformaciones esqueléticas (displasia campomélica)⁹.

SF-1

Las mutaciones que alteran genes esenciales para eventos tempranos en el desarrollo gonadal causan agenesia del testículo o el ovario. Uno de estos genes es el SF-1 (de sus siglas en inglés, steroidogenic factor), localizado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q33). SF-1 es factor de transcripción que pertenece a la familia de receptores hormonales nucleares. Regula la expresión adrenal y gonadal de enzimas involucradas en la esteroidogénesis como las P-450 hidroxilasas, la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y el receptor de ACTH¹⁰. El SF-1 se une directamente con la región promotora del gen de la HAM y activa su transcripción en las células de Sertoli⁹. Al igual que SOX9, se expresa en las células somáticas gonadales y del epitelio celómico, cuando la gónada indiferenciada comienza a desarrollarse en la superficie mediolateral del mesonefros a las 6 semanas de gestación. Con el comienzo de la diferenciación testicular, se expresa en las células de Sertoli y otras células intersticiales que parecen ser precursores de las células de Leydig.

Por otro lado, su expresión en los ovarios disminuye durante el desarrollo embrionario y se reactiva hasta que la diferenciación del folículo primario se completa⁷.

DAX-1

Un gen que está involucrado también en el desarrollo gonadal y adrenal es DAX1 (de sus siglas en inglés dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congénita, X-linked). Este gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma X (Xp21), y durante la embriogénesis se expresa junto con el SF-1 en las células somáticas de la cresta urogenital que formará a las glándulas adrenales, gonadotropos y núcleo ventromedial del hipotálamo. Por el contrario de lo que sucede con el gen SOX9, su expresión cesa en el testículo al momento en que se expresa el gen SRY, pero continúa en el ovario durante todo su proceso de diferenciación⁵.

DAX1 codifica a un miembro de la familia de receptores hormonales nucleares que posee el dominio de unión al ligando pero carece del característico dominio de unión al ADN de "dedo de Zinc", lo que sugiere que DAX1 regula la expresión génica a través de interacciones proteína-proteína. La duplicación de este locus en individuos 46 XY, causa reversión sexual, este fenómeno es llamado reversión sexual sensible a la dosis. Las mutaciones o deleciones de este mismo locus causan hipoplasia adrenal congénita, una enfermedad asociada a insuficiencia adrenal debida a la falta de desarrollo de la corteza suprarrenal definitiva; estos pacientes, desarrollan también hipogonadismo hipogonadotrófico debido a defectos pituitario-hipotalámicos⁷.

LIM-1

El gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 (11p12-13) y codifica para la síntesis de una proteína de 384 aminoácidos que contiene dos dominios ricos en cisteína unidos por zinc y un dominio de caja necesarios para la regulación de la transcripción de ADN. Está involucrado en la diferenciación inicial del tejido mesonéfrico que dará origen a las gónadas y se expresa en el mesodermo intermedio y en los cordones mesonéfricos, para limitarse posteriormente a estructuras encefálicas, al conducto mesonéfrico y los túbulos renales. La deleción homocigota produce una falla total para el desarrollo de riñones y gónadas⁵.

WT-1

Se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 (11p13). Se generan al menos 8 isomorfos de una proteína que contiene "dedos de zinc" por sitios de inicio de transcripción y empalme alternativos, que regulan la expresión génica a través de su interacción con secuencias específicas en un gran número de genes, que codifican factores de crecimiento y sus receptores, generalmente reprimiendo su transcripción. Se expresa en el epitelio germinal y en los cordones sexuales (células de Sertolli en el varón y células de la granulosa en la mujer) y es indispensable para el desarrollo inicial de las gónadas y los riñones. Su nombre deriva de la asociación con individuos que desarrollan tumor de Wilms, Síndrome de WAGR (tumor de Wilms, aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental), Síndrome de Denys-Drash (síndrome nefrótico congénito, anomalías genitales y tumor de Wilms) y síndrome de Frasier (disgenesia gonadal, PHM y esclerosis glomerular focal). Existe evidencia de que el WT-1 forma heterodímeros con el SF-1 y aumenta su actividad transcripcional sobre el promotor de la HAM¹⁰.

Se han asociado deleciones de los cromosomas 9p y 10q con reversión sexual en individuos 46 XY. En el cromosoma 9p24.3 se identificaron 2 genes llamados DMRT1 y DMRT2, lo que sugiere que la disgenesia gonadal puede ser debida a hemicigocidad combinada de ambos genes. De la misma manera deleciones terminales del cromosoma 10q se han asociada con malformaciones genitales en asociación con otras anomalías fenotípicas y retardo mental⁹.

1.5 Alteraciones en la diferenciación sexual masculina

El desarrollo de un fenotipo sexual determinado y funcional, requiere una complicada serie de eventos durante periodos críticos de la vida fetal, que involucran factores genéticos y hormonales que conducen al dimorfismo sexual observado al nacimiento. Por tanto, si existen anomalías la fórmula cromosómica, particularmente en los cromosomas X y Y o en los genes involucrados en la diferenciación gonadal, se producen cambios funcionales en las gónadas que ocasionan cambios cualitativos y cuantitativos en su producción

hormonal, con la consecuente alteración en el crecimiento y diferenciación de los genitales internos y externos.

Las alteraciones de la diferenciación gonadal se manifiestan por ambigüedad de genitales, discordancia entre el fenotipo y el sexo genético o por alteraciones en la edad de presentación y calidad del desarrollo puberal.

El pseudohermafroditismo masculino (PHM) se define como masculinización incompleta de los genitales externos en sujetos en cariotipo 46 XY y testículos histológicamente normales o con gónadas en estría. La apariencia de los genitales externos varía desde ser femeninos con un saco vaginal ciego, hasta ambigüedad mínima e hipospadias^{11, 12}. Se conocen muchas causas de PHM (Tabla 1).

Tabla 1. Causas de PHM

Disgenesia gonadal
Completa (Síndrome de Swyer)
Parcial
Mixta
Defectos en la biosíntesis de testosterona
Deficiencia de 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
Deficiencia de 20-22 liasa (desmolasa)
Deficiencia de 17-β-hidroxiesteroide-oxidoreductasa
Hipoplasia de células de Leydig o resistencia a hCG
Defectos en la respuesta de los tejidos a andrógenos
Insensibilidad a andrógenos
Deficiencia de la 5-α-reductasa
Síndrome de conductos de Muller persistentes
Síndromes dismórficos asociados a disgenesia gonadal
Síndrome de WAGR

Síndrome de Denys-Drash
Síndrome de Frasier
Displasia campomélica
Testículos evanescentes

1.5.1 Disgenesia gonadal

Bajo esta entidad se encuentran un grupo heterogéneo de condiciones en las que existen defectos en la diferenciación testicular, en individuos con cariotipo 46 XY o, en la mayoría de los casos, mosaicismo cromosómico (presencia de dos o más líneas celulares del mismo cigoto con diferentes cariotipos). En el 10 al 15% de los casos la disgenesia gonadal completa es causada por una mutación en el SRY o por una delección de la región pseudoautosómica del brazo corto del cromosoma Y en la que se encuentra el SRY. De igual manera, la mutación de los genes que codifican para las proteínas WT-1, el locus DSS y/o SOX-9 pueden ocasionar alteraciones en la diferenciación gonadal. También se ha reportado una delección en la posición 9p23.3-p24.1 como causa de disgenesia gonadal¹³.

La disgenesia gonadal completa se caracteriza por la presencia de estrías gonadales, generalmente constituidas por estroma ovárico laxo y ausencia de folículos con grados variables de fibrosis, derivados Mullerianos normales y genitales externos femeninos. La mayoría de los individuos afectados se identifican alrededor de los 10 a 14 años por presentar pubertad retrasada o amenorrea primaria, proporción esquelética eunucoide en algunos casos y edad ósea atrasada. La insuficiencia gonadal primaria se manifiesta por niveles elevados de LH y FSH y bajos de estradiol.

En la disgenesia gonadal parcial los genitales son habitualmente ambiguos, en general se observa microfalo, criptorquidia uni o bilateral, labios mayores escrotalizados y parcialmente fusionados e hipospadias escrotal. Sin embargo, algunos pacientes presentan sólo micropene. El diagnóstico se establece mediante el análisis histológico de las gónadas, mientras algunos pacientes muestran estría gonadal de un lado del abdomen y

un testículo disgenético en otro lado, en otros ambos testículos se encuentran disgenéticos¹⁵.

La disgenesia gonadal mixta generalmente está asociada con la fórmula cromosómica 45X/46XY, causada por la pérdida del cromosoma Y por no disyunción después de una fertilización disómica normal. Frecuentemente se han asociado anomalías en el cromosoma Y asociadas con el mosaicismo 45X/46XY¹⁴. El 90 a 95% de los pacientes presentan genitales externos ambiguos aunque también puede existir ambigüedad genital caracterizada por microfalo, criptorquidia uni o bilateral e hipospadias severa o pseudo-vagina. De igual manera, puede encontrarse una marcada asimetría de los genitales externos, con criptorquidia y labio mayor de un lado, y gónada palpable con escrotalización del pliegue lateral en el otro. Muchos pacientes presentan talla baja y un fenotipo similar al síndrome de Turner. Histológicamente, ambas gónadas pueden mostrar disgenesia o bien puede encontrarse un testículo de un lado y una estría en el otro¹⁵.

1.5.2 Defectos en la biosíntesis de testosterona

En general, los defectos en la formación de andrógenos se deben a mutaciones autosómicas recesivas que alteran la actividad enzimática de cualquiera de las enzimas involucradas en la conversión de colesterol a testosterona: 20-22-desmolasa, 3-β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa, 17-α-hidroxilasa/17-20-liasa y 17-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

La deficiencia más común es de la 17-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, que cataliza la conversión de androstenediona en testosterona. Se han detectado al menos 14 mutaciones en el gen de esta enzima. Los individuos afectados 46 XY generalmente tienen testículos, epidídimo, vasos deferentes, vesículas seminales y ductos eyaculadores, con genitales externos ambiguos o femeninos. En la pubertad, los niveles de testosterona aumentan como resultado de la conversión de androstenediona por otras isoenzimas no afectadas, trayendo como consecuencia la virilización de los individuos afectados¹⁶.

La aplasia o hipoplasia de células de Leydig es una causa rara de pseudohermafroditismo masculino que resulta de la diferenciación inadecuada de dichas células durante la vida fetal. El fenotipo de los individuos afectados varía desde ser genitales externos completamente femeninos, hasta genitales masculinos con micropene. No presentan derivados Mullerianos, mientras que el epidídimo y los vasos deferentes se encuentran ocasionalmente. El perfil hormonal de estos pacientes se caracteriza por niveles bajos de testosterona (basales o posteriores a la estimulación con hCG) y niveles elevados de LH. Entre las causas de esta condición se encuentran mutaciones recesivas en el gen del receptor de la LH, la mayoría de las cuales son mutaciones puntuales en el exón 11 del gen. La mayoría de estas mutaciones son homocigotas, aunque también se han descrito heterocigotos compuestos. Los estudios de expresión in vitro de los receptores mutados muestran alteración o ausencia de unión ligando receptor y en la producción de AMPc en respuesta a la estimulación con hCG, lo que confirma el efecto deletéreo de estas mutaciones en la actividad del receptor de LH¹⁷.

1.5.3 Insensibilidad a andrógenos

El síndrome de insensibilidad a andrógenos (SIA) es una enfermedad heterogénea, ligada a X. Los individuos con SIA tienen un cariotipo 46 XY y testículos bilaterales bien diferenciados, regresión normal de los ductos de Muller y secreción normal de testosterona¹⁸. El SIA es causado por mutaciones en el gen del receptor de andrógenos (RA), que resultan en la disminución de la unión de los andrógenos al receptor con la consecuente disminución de la actividad transcripcional del complejo andrógeno-receptor y por tanto alteraciones en la virilización genital¹⁹. El gen del RA pertenece a la familia de receptores de esteroides nucleares, que al formar un complejo con la hormona, interactúa directamente con determinados genes para regular su transcripción. Está localizado en el cromosoma Xq11-12, consta de 90 kpb y se divide en 8 exones. La proteína está constituida por 910 a 919 aminoácidos y su peso molecular es de 110 kDa. Posee diferentes dominios funcionales: la región N-terminal, codificada por el exón 1, compuesta por 529 aminoácidos que está involucrada en la activación de la transcripción; una región interna de 66 aminoácidos codificada por los exones 2 y 3, que es un dominio altamente conservado de unión al ADN que contiene 2 "dedos de zinc"; la región "bisagra" codificada

por regiones de los exones 3 y 4, que media la translocación del receptor activado del citoplasma al núcleo y la región C terminal, formada por 252 aminoácidos codificados por los exones 4 a 8, que es el dominio de unión al ligando y está involucrado también en la dimerización del receptor, la regulación de la activación transcripcional y la unión a proteínas de choque térmico^{20,21}.

Los defectos en la función del receptor se clasifican en 2 categorías:

1. Alteración de la secuencia primaria del receptor, debida a mutaciones que son consecuencia de la introducción de codones de terminación prematuros, cambios en el marco de lectura, deleciones, inserciones o alteraciones en el procesamiento del ARNm. Estas alteraciones genéticas, están invariablemente asociadas a insensibilidad completa a andrógenos.
2. Mutaciones causadas por la sustitución de un solo aminoácido en la proteína del RA. Son las mutaciones más comunes y al contrario de la categoría anterior, resultan en una amplia variedad de fenotipos. Estas mutaciones se localizan en dos dominios de la proteína: los dominios de unión a la hormona y al ADN. Las sustituciones en la unión al ADN alteran la capacidad de RA para reconocer la secuencias blanco dentro o adyacentes a los elementos de respuesta a andrógenos. De la misma forma, los cambios de aminoácidos en el dominio de unión al ligando pueden abolir por completo la unión a la hormona, o causar anormalidades cualitativas en dicha unión, de manera que la habilidad de formar complejos hormona-receptor estables es lo que determina la funcionalidad del receptor²².

Se han descrito más de 300 mutaciones en este gen²³. La complejidad de la presentación fenotípica del SIA probablemente es reflejo la heterogeneidad del gen del RA y otros factores necesarios para su función normal, en consecuencia, hasta la fecha ha sido difícil establecer una relación entre el genotipo y el fenotipo, con la misma mutación puntual asociada con diferente expresión fenotípica.

Clínicamente, podemos distinguir insensibilidad completa, parcial, o casos raros de hombres fenotípicamente normales con azoospermia o alteraciones en la virilización puberal, dependiendo del grado de resistencia hormonal.

-
- a) Insensibilidad a andrógenos completa: fenotipo femenino con un saco vaginal ciego al nacimiento, testículos abdominales, inguinales, o presentes en los labios, ductos Wolfianos ausentes o hipoplásicos. En la pubertad, los caracteres sexuales secundarios femeninos se desarrollan normalmente, aunque el vello púbico y axilar es escaso o ausente.
- b) Insensibilidad parcial: los sujetos afectados tienen ambigüedad genital variable, algunos tienen fenotipo femenino con clitoromegalia, fusión parcial de los labios menores y seno urogenital o aperturas independientes para la vagina y uretra; en otros casos, existe ambigüedad de genitales con micropene y labios mayores rugosos o semiescrotalizados, orificio uretral localizado a nivel perineal o formando parte de un seno urogenital asociado con una vagina corta que termina en forma de saco; también puede presentarse un fenotipo predominantemente masculino con hipospadias aislada o asociada a micropene y escroto bifido. En la pubertad los sujetos afectados generalmente desarrollan ginecomastia sin un aumento significativo de tamaño del falo. Los testículos tienen un número reducido de células germinales con azoospermia.

Durante los primeros 3 meses de edad, los niveles séricos de testosterona y hormona luteinizante (LH) están por encima o en los niveles altos del intervalo normal, y en los pacientes prepúberes los niveles de estas dos hormonas están en el intervalo normal para la edad. En los adultos con testículos in situ, los niveles de LH están generalmente incrementados, mientras que los de testosterona y FSH son normales o elevados, y los niveles de estradiol se encuentran en el límite superior normal^{24,25,26}.

1.5.4 Deficiencia de 5-alfa reductasa

Una causa rara de pseudohermafroditismo masculino es una enfermedad autosómica recesiva causada por deficiencia de una de las isoenzimas necesarias para la conversión de testosterona en dihidrotestosterona. Andersson y col, aislaron y clonaron 2 genes que codifican las isoenzimas de la 5- α reductasa. El gen tipo 1 se localiza en el cromosoma

5p15. No se conocen mutaciones en este gen en familias con deficiencia de 5- α reductasa. El gen tipo 2 (SRD5A2) se localiza en el cromosoma 2p23 y está formado por 5 exones y 4 intrones. Codifica para una enzima microsomal que cataliza la reducción de la doble unión entre las posiciones 4 y 5 de una gran variedad de esteroides de 19 y 21 carbonos, aunque su principal función biológica es convertir la testosterona en dihidrotestosterona (DHT), y es la isoforma predominante en la próstata y otros tejidos andrógeno-dependientes²⁷. Se han descrito mutaciones puntuales, que originan sustituciones de aminoácidos, cambios en los sitios de empalme del RNAm y codones sin sentido; así como deleciones y codones de terminación prematura. Estas mutaciones en el SRD5A2, al igual que las mutaciones del receptor de andrógenos, resultan en una gran variedad de fenotipos, que van desde genitales externos femeninos casi normales (hipospadias pseudovaginal perineoescrotal), hasta un fenotipo masculino con hipospadias²⁸, algunos individuos tienen orificios uretral y vaginal separados, mientras que otros tienen un seno urogenital común; algunos sujetos tienen azoospermia, mientras que otros tienen espermatogénesis casi normal; la virilización en la pubertad es también variable. La deficiencia en la actividad enzimática es resultado de mutaciones que alteran la unión de la testosterona o el NADPH a la enzima, mutaciones que impiden la formación de una enzima funcional, mutaciones que resultan en una enzima inestable o bien, mutaciones fuera de la secuencia codificadora que aún no se han caracterizado y que alteran la expresión de la enzima²⁹.

Al nacer, los sujetos afectados generalmente tienen un falo semejante al clítoris e hipospadias perineoescrotal, con menos frecuencia, la hipospadias es la única alteración. Los derivados Wolfianos son normales, pero la vesícula seminal y los vasos deferentes terminan en un saco vaginal ciego de tamaño variable que generalmente se abre en el seno urogenital; hay ausencia o hipoplasia de la próstata; los testículos tienen localización abdominal, inguinal, en los labios mayores o en el escroto. Durante la pubertad, los pacientes sufren diferentes grados de virilización sin ginecomastia. La virilización podría estar mediada por cantidades pequeñas de DHT circulante, sintetizada por la 5 alfa-reductasa 1 o por actividad residual de la tipo 2, o por los niveles altos de testosterona.

El diagnóstico se basa en alguna o todas de las siguientes características: niveles basales de testosterona normales, niveles de DHT normales o bajas, cociente testosterona/DHT alto, cociente alto entre Eticolanolona/androsterona en orina, disminución de la conversión de testosterona en DHT in vivo, disminución de 5 alfa-reductasa 2 en tejidos u homogenados de piel genital, actividad baja o cinéticamente anormal de la enzima en fibroblastos obtenidos de la piel genital y la demostración de un defecto molecular en el SRD5A2³⁰. Se han identificado 31 mutaciones diferentes, sin que exista una correlación adecuada entre el fenotipo y el genotipo³¹.

ANTECEDENTES

La determinación de la capacidad del organismo para responder a concentraciones adecuadas de testosterona y dihidrotestosterona se ha basado hasta el momento en producir una elevación de éstas mediante estimulación con LH o hCG, y observar la respuesta clínica en función de aumento de volumen del pene y testículos. Sin embargo, entre los 2 y los 9 años de edad, la capacidad de respuesta gonadal es limitada por encontrarse el organismo en la fase de capacidad reproductiva latente, dificultándose así el estudio de niños de este grupo de edad.

Como los andrógenos disminuyen los niveles séricos de la SHBG (de sus siglas en inglés: sexual hormone binding globulin), varios investigadores han propuesto la medición de las variaciones de la SHBG bajo estimulación androgénica como una prueba para evaluar sensibilidad a andrógenos in vivo. Sin embargo, parece que esta variación en los niveles de SHBG dependen de un metabolito más activo, la dihidrotestosterona⁴⁵.

Definir lo anterior, puede ampliar el arsenal diagnóstico con el que se cuenta en la actualidad para el estudio de pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual.

La SHBG es una proteína glicosilada de 46 kD codificada en el brazo corto del cromosoma 17, en las bandas p12-13³², secretada por el hígado, que se une con gran afinidad a DHT, testosterona y estradiol³³. Circula como un homodímero, y cada monómero posee dos dominios similares a laminina (dominios G)³⁴. Además de regular la fracción biodisponible de estos esteroides y su entrega a tejidos específicos, interactúa con un receptor de membrana específico con gran afinidad³⁵. Una vez unidos, la SHBG puede unir esteroides y de esta manera se integra un sistema de transducción de señales a través de la adenilil ciclasa y el AMPc, que se ha asociado a los efectos de los andrógenos y el estradiol^{36,37}. Es concebible que el sistema SHBG/R-SHBG funcione como un mecanismo de control adicional que inhiba o amplifique los efectos de la DHT y estradiol en las células³⁸. La concentración sérica de SHBG está regulada por varios factores: los estrógenos y las hormonas tiroideas la aumentan, mientras que los andrógenos, la insulina, el factor de

crecimiento similar a insulina-1 y el factor de crecimiento epidérmico la disminuyen. Se ha argumentado que la secreción variable de SHBG es debida a los diferentes efectos de las hormonas y factores de crecimiento sobre la glicosilación de la proteína o por expresión de transcritos con sitios de empalme alternativo^{33,37,39}. Como consecuencia de los efectos de las hormonas sexuales, sus niveles séricos son más altos en mujeres que en hombres y son extremadamente altos en el embarazo, aumentan en niños prepúberes y disminuyen a los niveles del varón adulto durante la maduración sexual. Otros factores como la ingesta de calorías y el balance de energía pueden estar involucrados también en la regulación de sus concentraciones séricas⁴⁰.

En 1982, Belgorosky⁴¹ y cols. reportaron la utilidad clínica de la disminución de la SHBG posterior a la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) en niños con criptorquidia, anorquía, pseudohermafroditismo y micropene, concluyendo que el cambio en la SHBG después de la administración de hCG es un parámetro útil para la evaluación de la respuesta biológica a andrógenos, basados en la disminución de los niveles de la SHBG en niños con criptorquidia y la falta de cambio en niños con anorquia en quienes los niveles de la concentración de andrógenos no aumentaron. Sin embargo, en 5 niños con micropene en quienes los niveles de andrógenos se incrementaron, los niveles de la SHBG no disminuyeron.

Posteriormente Ciaccio⁴² y cols. evaluaron el porcentaje de disminución de la SHBG posterior a la administración de testosterona y la respuesta clínica a la misma, en niños con genitales ambiguos y micropene y encontraron que la concentración media de la SHBG post-testosterona era significativamente diferente del valor basal sólo en pacientes mayores a tres meses que mostraron una respuesta clínica positiva a andrógenos (alargamiento del pene y enrojecimiento de la piel genital), concluyendo que ambos estudios son útiles para evaluar la sensibilidad a andrógenos en niños prepúberes mayores a 3 meses.

Sin embargo, Belgorosky⁴³ y cols. al comparar la respuesta de la SHBG posterior a la estimulación con hCG y a la administración de testosterona exógena en niños con diferentes alteraciones en la diferenciación sexual, concluyeron que la prueba de

estimulación con hCG no es confiable para evaluar la sensibilidad a andrógenos debido a la alta incidencia de falsos negativos, mientras que la disminución de la SHBG después de la administración de testosterona sí es útil en el diagnóstico de insensibilidad a andrógenos.

En 1997 Bertelloni⁴⁴ y cols. examinaron niños prepúberes con síndrome de insensibilidad a andrógenos (completa y parcial), pacientes con pseudohermafroditismo masculino no debido a insensibilidad a andrógenos y niños sanos como controles; observaron que los niveles de SHBG disminuyeron en los controles, pero no en los pacientes con SIA, mientras que en pacientes con otras causas de PHM los niveles medios de SHBG eran significativamente menores que en los sujetos con SIA pero significativamente mayores que los controles. Concluyeron así que la disminución de la SHBG tras la administración de hCG puede utilizarse como una prueba de primera elección para el estudio de la respuesta biológica a andrógenos in vivo en varones prepúberes, permitiendo la selección de pacientes que requieran investigaciones de segundo nivel (ensayos de capacidad de unión del receptor o análisis molecular del gen).

En 1989 Amady⁴⁵ y cols. hicieron estudios mediante estimulación con hCG en niños prepúberes con deficiencia de 5α -reductasa y niños prepúberes normales para determinar si la testosterona reducía el nivel de SHBG directamente o por su conversión a dihidrotestosterona. Encontraron que los niveles basales de SHBG son más altos en los niños con deficiencia de 5α -reductasa que en niños sanos, y que los niveles de SHBG no disminuyeron en niños con deficiencia de la enzima a pesar del aumento en la testosterona sérica, en tanto que en niños sanos la magnitud de la respuesta de la SHBG correlaciona mejor con la respuesta de dihidrotestosterona a la hCG que con la de testosterona, concluyendo que la primera es el principal regulador de la secreción de la SHBG.

OBJETIVO

Determinar si existe una relación entre la producción inducida de testosterona y dihidrotestosterona mediante estimulación con gonadotropina coriónica humana (hCG) y las concentraciones séricas de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) que permita evaluar la respuesta a andrógenos in vivo en niños prepúberes.

HIPÓTESIS

Existe una relación entre la producción inducida de testosterona y dihidrotestosterona mediante la estimulación con gonadotropina coriónica humana y las concentraciones séricas de la globulina fijadora de hormonas sexuales que permitirá evaluar la respuesta de los tejidos a andrógenos in vivo en niños prepúberes.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Población por estudiar

Se estudiaron 12 pacientes (Tabla 2), con cariotipo 46,XY (excepto paciente 7, cariotipo 45 X0/46XY) con diagnóstico definitivo en algunos casos de:

1. Pacientes con gonadectomía bilateral.
2. Pacientes con ambos testículos descendidos, con antecedente de criptorquidia unilateral por hernia inguinal a quienes se les realizó la orquidopexia antes de los 2 años de edad (grupo control positivo).
3. Pacientes con disgenesia gonadal mixta que tengan una o ambas gónadas descendidas (grupo con respuesta parcial para producción de testosterona), pacientes con un testículo macroscópicamente normal aunque funcionalmente anormal en un lado y una gónada rudimentaria o ausente en el lado opuesto, característicamente, genitales externos ambiguos, asimétricos, y persistencia de conductos Mullerianos, el cariotipo más común es 45,XO/46,XY.
4. Pacientes con deficiencia probada en algunos casos de 5 α -reductasa (grupo con incapacidad para formar dihidrotestosterona pero con capacidad normal para sintetizar testosterona), sus características fenotípicas son: genitales ambiguos, con pequeño falo hipospádico, bolsa vaginal ciega, derivados wolffianos normales, ductos Mullerianos ausentes y testículos normales.
5. Pacientes con diagnóstico de insensibilidad a andrógenos (grupo con capacidad para sintetizar testosterona e dihidrotestosterona, pero con incapacidad para responder funcionalmente a éstas). Son individuos cuyos genitales externos pueden ser femeninos normales, ambiguos, o en formas menos severas de resistencia a la testosterona masculinos aunque con azoospermia e infertilidad.

Tabla 2. Datos clínicos de los pacientes estudiados.

No. de paciente	Edad	Fenotipo	Diagnóstico
1	2	Masculino	Orquidopexia unilateral
2	2	Masculino	Orquidopexia unilateral
3	3	Masculino	Orquidopexia unilateral
4	3	Masculino	Orquidopexia unilateral
5	4	Masculino	Panhipopituitarismo

No. de paciente	Edad	Fenotipo	Diagnóstico
6	7	Masculino: HPE, testículo derecho en escroto, testículo izquierdo ausente en escroto poco rugoso, remanente mulleriano izquierdo.	Disgenesia gonadal mixta
7	2	Masculino: HPE, post-operado de criptorquidia bilateral, pseudovagina.	Probable deficiencia de 5 α -reductasa
8	2	Masculino: HPE	Deficiencia de 5 α -reductasa*
9	3	Femenino: LME, vagina, ausencia de Mullerianos, uretra femenina normal.	Deficiencia de 5 α -reductasa♦
10	5	Masculino: HPE, post-operado de criptorquidia bilateral	SIA parcial*
11	9	Femenino. Gonadectomizada	SIA completo
12	8	Femenino: CI, LMR Gonadectomizada	SIA completo

LMR: labios mayores rugosos; CI: clitoromegalia; HPE: hipospadias peneoescretal; LME: labios mayores escrotalizados.

* Referido en el expediente No. 398545 del INP. Los estudios moleculares se realizaron en el laboratorio de Biología de la Reproducción del INCMNSZ. No publicados.

♦ Referido en el expediente No. 392698 del INP, Estudios moleculares realizados por Cerbón y cols. Referido en el artículo enviado a la revista Journal of Steroid Biochem Mol Biol para su publicación posterior.

♦ Referido en el expediente No. 399678 del INP. Los estudios moleculares se realizaron en el laboratorio de Biología de la Reproducción del INCMNSZ. No publicados.

3.1.1 Criterios diagnósticos de los pacientes estudiados

En los pacientes incluidos en el grupo control positivo (1 – 4), el diagnóstico de criptorquidia unilateral fue realizado por el personal médico del servicio de endocrinología del INP y la realización de la orquidopexia en el servicio de cirugía del mismo Instituto por lo menos 6 meses antes de la realización del estudio.

En el paciente no. 6, con disgenesia gonadal mixta, el diagnóstico se hizo por sus características fenotípicas y su cariotipo 45 X0/46 XY en 36% de las metafases estudiadas. En el examen físico se encontraron bolsas escrotales asimétricas la derecha rugosa con testículo palpable y la izquierda levemente rugosa sin gónada palpable. El genitograma mostró uretra masculina normal y por ultrasonido se encontraron restos de trompa uterina en el lado izquierdo. La prueba de estimulación con hCG fue positiva y la prueba de estimulación con pergonal negativa.

El paciente no. 7 se incluyó en el estudio por sus características fenotípicas: hipospadias peneoescretal, criptorquidia bilateral, escroto no rugoso ni hiperpigmentado y

pseudovagina. Se observó un incremento del 138% del volumen del pene durante la prueba de estimulación con hCG. No se continuaron los estudios moleculares para confirmar el diagnóstico al momento de realizar este trabajo.

En el paciente no. 8 se estableció el diagnóstico al encontrarse dos mutaciones en el exón 4 del SRD5A2 (datos no publicados). Nació con hipospadias peneoescrotal, escroto bífido y micropene, gónadas en bolsas escrotales y ausencia de derivados mullerianos.

Al paciente no. 9 se le asignó sexo femenino por sus características fenotípicas predominantemente femeninas: labios mayores escrotalizados, vagina, uretra femenina normal, y gónadas inguinales. El estudio del gen SRD5A2 reveló una mutación puntual homocigota en la posición 212 del exón 4, que cambia una prolina por una arginina con la consecuente anulación de la actividad enzimática.

El paciente no. 10 tenía un cuadro compatible con SIA parcial: criptorquidia bilateral, hipospadias peneoescrotal y escroto bífido. El diagnóstico definitivo se estableció por estudios moleculares realizados en el INCMNSZ (datos no publicados) en los cuales se encontró una mutación en el exón 5 del RA que produjo una sustitución de alanina por serina en el codón 765.

El paciente no. 11 al nacimiento presentó genitales externos femeninos: labios mayores sin hiperpigmentación ni escrotalización, introito vaginal normal y gónadas inguinales; a través del ultrasonido no se visualizaron útero ni ovarios; no se encontró una deficiencia en la síntesis de testosterona durante la prueba de estimulación con hCG y no tuvo respuesta clínica a la administración de testosterona por lo que se hizo el diagnóstico de insensibilidad a andrógenos completa compatible con lo antes mencionado y un cariotipo 46 XY, por lo que se le reasignó el sexo y se le removieron las gónadas. En el estudio histopatológico de las mismas se determinó que eran testículos con edema y congestión focal, y conductos deferentes sin alteraciones histológicas significativas.

En el paciente no. 12 el diagnóstico definitivo se concluyó por los resultados de los niveles del RA en cultivo de fibroblastos de piel genital (6.77 fmol/mg de proteína, valor de

referencia 15 a 20) y por sus niveles de captación nuclear de andrógenos (1.01 fmol/100 µg de ADN, valor de referencia > 90); por la ausencia de respuesta clínica a la administración de testosterona y por sus características fenotípicas: labios escrotalizados, clitoromegalia, vagina, gónadas inguinales, uretra masculina, vesículas seminales, ausencia de útero y ovarios y cariotipo 46 XY.

3.1.2 Criterios de inclusión

1. Edades comprendidas entre 2 y 9 años de edad con fenotipo sugestivo de cada una de las entidades anteriores, o bien pacientes en los que se haya confirmado el diagnóstico por historia clínica y estudios de laboratorio e imagen.
2. Cuyos padres acepten la participación en el estudio, mediante consentimiento informado.

3.1.3 Criterios de exclusión

1. Haber recibido en los 90 días previos, uno o más de los siguientes: andrógenos, estrógenos, L-tiroxina sola o asociada con triyodotironina, hormona de crecimiento, glucocorticoides, anabólicos o anticonvulsivantes como la fenitoína.
2. Aquellos que padezcan hipertiroidismo, hipotiroidismo, hiperprolactinemia o cualquier enfermedad crónica, aún cuando ésta se encuentre controlada.
3. Pacientes que hayan sido sometidos a cirugía abdominal o cirugía mayor o hayan sido transfundidos con sangre total o plasma durante los 90 días previos al estudio.
4. Aquellos que hayan padecido una infección aguda 15 días antes o que hayan tenido un estado catabólico con o sin pérdida de peso durante los 2 a 3 meses previos al estudio.

3.1.4 Criterios de eliminación

1. Pacientes que durante el curso del estudio cursen con enfermedades catabólicas o infecciones agudas.

2. Pacientes que durante el estudio reciban uno o más de los medicamentos señalados en el inciso 1 de los criterios de exclusión.
3. Pacientes que durante el estudio sean transfundidos o requieran una intervención quirúrgica.

3.2 Experimentación

3.2.1 Obtención de muestras

Los elementos de estudio fueron pacientes prepúberes que acuden a la clínica de intersexo del Instituto Nacional de Pediatría. Se estudiaron en total 12 niños con diagnóstico confirmado en la mayoría de los casos de: disgenesia gonadal mixta, síndrome de insensibilidad a andrógenos, deficiencia de 5α -reductasa, panhipopituitarismo, además de 4 niños post-operados por criptorquidia unilateral (habitualmente debida a hernia inguinal).

La prueba de estimulación consistió en administrar 2,500 UI diarias de hCG IM (Gonadotropil C) durante cuatro días. Se obtuvo una muestra de sangre basal y una muestra 24 horas después de cada dosis, para la medición de testosterona, dihidrotestosterona y SHBG.

En la estimulación con testosterona exógena se administró una dosis de 2 mg/kg de peso por vía intramuscular. Se analizó una muestra basal y posteriormente a los 2, 4 y 6 días.

La obtención de las muestras se llevó a cabo por punción venosa con un ayuno previo de 8 horas, las muestras fueron centrifugadas a 4°C para separar el suero dentro de la primer hora después de su obtención y almacenadas por lo menos a -20°C hasta su análisis.

3.2.2 Mediciones hormonales

La cuantificación de las hormonas y de la SHBG se realizó por radioinmunoanálisis (RIA), ensayo inmunoradiométrico (IRMA) y quimioluminiscencia (QML) en el laboratorio de hormonas del mismo Instituto. Todas las determinaciones hormonales se realizaron por duplicado y en un mismo ensayo para evitar variaciones interensayo.

Los reactivos utilizados fueron provistos por la empresa DPC. Las mediciones de testosterona y SHBG fueron realizadas por QML en el analizador automático IMMULITE (No. de catálogo LKTT1 y LKSH1 respectivamente). La determinación de dihidrotestosterona se realizó por RIA (No. de catálogo DSL-9600) tras su extracción con una mezcla de hexano-etanol. Para validar los resultados de SHBG obtenidos por QML, las muestras se analizaron también por IRMA (No. de catálogo RKSH1).

Las mediciones se repitieron si el coeficiente de variación intraensayo obtenido era $>10\%$ para las hormonas o $>5\%$ para la SHBG.

3.2.2.1 Medición de testosterona

La medición de testosterona se llevó a cabo en el analizador automático IMMULITE, un instrumento continuo de acceso aleatorio que realiza ensayos quimioluminiscentes.

Utiliza un análisis enzimoinmunométrico competitivo en fase sólida. La fase sólida, es una perla de poliestireno dentro de una Unidad de reacción que está recubierta con un anticuerpo policlonal de conejo específico para testosterona.

El suero del paciente y la testosterona marcada con ligando se introducen simultáneamente en la Unidad de reacción, incubándose durante aproximadamente 30 minutos a 37°C con agitación intermitente. Durante este tiempo la testosterona presente en la muestra compete con la testosterona marcada con ligando por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo de la fase sólida. El material no ligado se elimina por centrifugación.

Se introduce un anti-ligando marcado con fosfatasa alcalina y la unidad de reacción es incubada durante un nuevo ciclo de 30 minutos. El conjugado no ligado se elimina por un lavado con centrifugación. Se añade entonces el sustrato y la unidad de reacción se incuba durante 10 minutos más.

El sustrato quimioluminiscente, un éster fosfato de adamantil dioxetano, sufre hidrólisis en presencia de fosfatasa alcalina para generar un producto intermedio inestable. La producción continua de este producto intermedio resulta en una emisión mantenida de

luz. El complejo ligado, y por tanto también la liberación de fotones, tal como los mide el luminómetro es inversamente proporcional a la concentración de testosterona en la muestra.

Antes de analizar las muestras, se ajustó la curva maestra de calibración con dos calibradores alto y bajo y se validó mediante el uso de 2 niveles de control de testosterona (alto y bajo).

3.2.2.2 Medición de SHBG

La medición de la SHBG se realizó por dos métodos: QML e IRMA. El motivo por el cual se emplearon 2 métodos diferentes fue porque en estudios previos al inicio del trabajo de tesis a un grupo de pacientes del mismo Instituto se les determinó la concentración de SHBG durante la prueba de estimulación con hCG y no se observó ningún cambio significativo. En este grupo de pacientes no se consideró el diagnóstico, solamente se observó si había un aumento en la concentración de testosterona. Basados en lo anterior decidimos hacer la medición de la SHBG por dos metodologías diferentes con el fin de validar los resultados con una metodología diferente.

Quimioluminiscencia

La QML utiliza un análisis enzimoinmunométrico en fase sólida. La fase sólida es una perla de poliestireno dentro de la unidad de reacción que está recubierta con un anticuerpo monoclonal específico para la SHBG. Mientras el suero del paciente diluido (1:21) y el anticuerpo policlonal anti SHBG conjugado con fosfatasa alcalina se incuban durante aproximadamente 30 minutos a 37°C en la unidad de reacción con agitación intermitente, la SHBG presente en la muestra queda ligada, formando un complejo "sándwich" con los anticuerpos. El conjugado no ligado se elimina por un lavado con centrifugación, después del cual se añade el sustrato y la unidad de reacción se incuba durante 10 minutos más.

El complejo ligado y por tanto también la liberación de fotones, tal como los mide el luminómetro es proporcional a la concentración de la SHBG en la muestra.

Se ajustó la curva maestra de calibración con dos calibradores de SHBG y se verificó el estado de la calibración con dos niveles de control de SHBG.

Ensayo inmunorradiométrico

En el IRMA se utilizan tubos recubiertos con un ligando, y anticuerpos monoclonales, uno (SHR1) que fija por una lado a la SHBG presente en las muestras y por otro lado a una molécula (SHILB) que sirve de unión entre este anticuerpo y el ligando del tubo y otro marcado con I^{125} (SHR2). La SHBG del paciente es capturada por el anticuerpo monoclonal SHR1 en una reacción con cinética de fase líquida. La separación se realiza por el método tubo cubierto con ligando/anti-ligando (SHILB). Finalmente, la fracción unida reacciona con el anticuerpo radiomarcado (SHR2), y el tubo se lava para remover el exceso del marcador radiactivo. La radioactividad emitida por el I^{125} es cuantificada en un contador gamma.

La radioactividad es la propiedad de un isótopo inestable de emitir partículas energéticas desde su núcleo. La cantidad de material radioactivo es medido por cuántos núcleos se desintegran por segundo. A esto se le llama actividad y la unidad de medición es el Curie (Ci). 1 microcurie es igual a 37 000 desintegraciones por segundo. El I^{125} es utilizado como marcador radioactivo acoplado a un antígeno o a un anticuerpo, emite rayos gamma (fotones) que son absorbidos por un cristal de Yoduro de sodio, que forma parte de un contador gamma. Estos cristales, emiten pulsos (centelleos) de luz amarilla cuando absorben radiación gama que son captados entonces por un fotomultiplicador. La función de éste es producir un pulso cada vez que detecta un centelleo, este pulso es amplificado y medido para ver si es de suficiente intensidad y de un cierto nivel de energía característicos del isótopo a ser medido. Las medidas obtenidas en el contador gamma se llaman cuentas por minuto (CPM).

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se permitió que los componentes del kit estuvieran a temperatura ambiente y se marcaron 14 tubos cubiertos con ligando con las letras A (unión no específica) hasta la G (unión máxima) por duplicado, y tubos adicionales para las muestras de los pacientes y los controles.
2. Se agregaron 10 μL de cada calibrador, control y muestras de pacientes en cada tubo.
3. Se adicionaron 200 μL del SHR1. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos.
4. A continuación se dispensaron 50 μL del SHILB. Los tubos se incubaron con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. La reacción se decantó y se adicionaron 2.0 ml de solución de lavado, después de 2 minutos se decantó nuevamente y el exceso de líquido se removió con papel absorbente.
6. Se agregaron 200 μL del SHR2 y se incubó la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación.
7. Se decantaron los tubos y se lavaron con 2 mL de solución de lavado 2 veces, esperando 2 minutos entre cada lavado. Se removió el exceso de líquido con papel absorbente.
8. La radioactividad se midió con un contador gamma que tiene incluido un software que da automáticamente los resultados.

3.2.2.3 Medición de dihidrotestosterona

El procedimiento siguió el principio básico del RIA: una concentración fija de un antígeno marcado con un elemento radioactivo se incuba con una cantidad constante de anticuerpos de tal manera que el número de sitios de unión del anticuerpo para el antígeno es limitada. Si se agrega antígeno no marcado a este sistema, hay una competición entre el antígeno marcado y el no marcado por un número constante y limitado de sitios de unión en el anticuerpo, de tal manera que la cantidad de antígeno marcado unido al anticuerpo disminuirá conforme la concentración del antígeno no marcado se incrementa. La cantidad de antígeno marcado unido puede medirse después de separar la cantidad de éste de la del antígeno marcado libre.

Procedimiento :

a) Extracción

1. Se transfirieron 400 μ L del suero del paciente y de los controles en tubo de vidrio y se adicionaron 500 μ L de la solución oxidante. Se mezclaron con vórtex y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Para extraer la muestra oxidada se adicionaron 4 mL de una mezcla de n-hexano:etanol (98% hexano:2% etanol). Cada muestra se mezcló en vortex durante 1 minuto.
3. Se adicionaron 50 μ L del buffer de muestra para dihidrotestosterona (DHT), y se mezclaron por inversión 3 a 4 veces.
4. Las muestras se centrifugaron a 1500 g por 15 minutos a 4°C para separar la capa orgánica de la acuosa.
5. Se transfirieron 2.5 ml de la capa orgánica en un tubo de vidrio y se secaron con aire.
6. Las muestras y los controles se reconstituyeron con 250 μ L del diluyente para muestras (estándar A).

b) RIA

1. Se rotularon 2 tubos no recubiertos para las cuentas totales, y tubos recubiertos con anti-DHT para estándares, controles y muestras por duplicado.
2. Se agregaron 100 μ L de estándares, controles y muestras extraídas.
3. Se adicionaron 500 μ L de DHT- I^{125} a todos los tubos y se mezclaron con vórtex.
4. Se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación mecánica.

5. Transcurrido este tiempo se decantaron por inversión simultánea en una gradilla de esponja y se removió el exceso de líquido con papel absorbente, excepto los tubos de cuentas totales.
6. Se adicionaron 3 mL de agua deionizada en todos los tubos, excepto los de cuentas totales.
7. Nuevamente se decantaron los tubos excepto los de cuentas totales y se eliminó todo el exceso de líquido manteniéndolos durante 2 minutos sobre papel absorbente.
8. Se contaron las CPM en un contador gamma, en el que se obtuvo directamente la concentración de las muestras.

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Prueba de estimulación

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos durante la prueba de estimulación con 2500 UI por 4 días consecutivos de hCG, a excepción de los pacientes 9 y 11 a quienes se les administró 2 mg/kg de peso de testosterona (Primotestón) por vía intramuscular.

Los coeficientes de variación entre cada muestra determinada por duplicado fueron: < 8% para testosterona, <10 % para DHT y < 4% para SHBG medida por quimioluminiscencia (SHBG 1). La medición de la SHBG por ensayo inmunorradiométrico (SHBG 2) no se realizó por duplicado.

En la tabla 4 se muestran los cambios en los niveles de la testosterona, dihidrotestosterona y SHBG durante las pruebas de estimulación.

Tabla 3. Resultados de la prueba de estimulación con hCG

No. de paciente	Testosterona ng/dl	Dihidrotestosterona pg/ml	SHBG 1 nmol/L	SHBG 2 nmol/L
1	20	25.8	45.5	93.8
	41	96.8	52.7	80.4
	74.1	113	57.5	79.6
	117	152	59	68.9
	173	96.4	42.4	60.2
2	20	12.3	102	117
	20	33.5	97.6	92.9
	52.8	70.2	88.8	107
	113	117	87.7	100
	183	115	84.3	94.5
3	20	53.1	94.4	66
	20	78.3	127	83.8
	143	146	113	68.9
	269	195	132	68.7
	254	180	119	78.6
4	20	26.9	74.5	118
	20	80.1	80.2	105
	80.5	107.1	80	111
	103	133	95.3	134
	113	92.8	80.1	104

No. de paciente	Testosterona ng/dl	Dihidrotestosterona pg/ml	SHBG 1 nmol/L	SHBG 2 nmol/L
5	20	29.8	144	57.4
	20	54.8	151	73.9
	20	48.5	136	68.8
	20	30.8	161	77.8
	20	42.4	163	69
6	20	21.8	91.7	96.5
	20	72.9	94.4	79.8
	93.7	133	91.3	108
	170	155	84.2	95.1
	198	164	80.2	107
7	20	20.1	109	83
	35.5	55	132	74
	93	61	104	71.4
	142	137	118	90.6
	204	127	105	87.3
8	20	19.4	82.3	33
	20	16.8	84.6	41.6
	223	151	77.3	35.9
	334	237	85.6	32.2
	478	287	93.1	87.1
9*	20	19.8	51.4	M.I.
	986	472	51.5	82.8
	713	291	44.7	67.1
	507	89	38.1	80.9
10	20	29.3	103	61.3
	89	43	108	66.1
	108	56	104	57.8
	147	68	97	68.8
	177	98	95	139
11*	20	95.5	66.5	79.4
	1069	323	77.5	71.8
	967	735	69.6	68
	486	370	73.5	77.6
12	108	256	118	33.6
	127	102	108	36.6
	128	94.3	108	42.6
	132	114	96.8	46.8
	140	54.8	103	48.8

* Testosterona intramuscular

4.1.2 Pacientes con diagnostico de orquidopexia unilateral

Los resultados de los pacientes con orquidopexia unilateral se muestran en las figuras 1, 2 y 3. En los cuatro casos se observó una respuesta positiva a la estimulación con hCG definida como una concentración de testosterona superior a los 100 ng/dl en el 4to. día de estimulación. Los valores basales en estos pacientes se encontraban dentro de los límites normales en pacientes prepúberes, por debajo del límite de detección del método (<20 ng/dl). Al cuarto día de estimulación los valores aumentaron en promedio $\pm 1SD$, 180 ± 57 ng/dl (Fig.1).

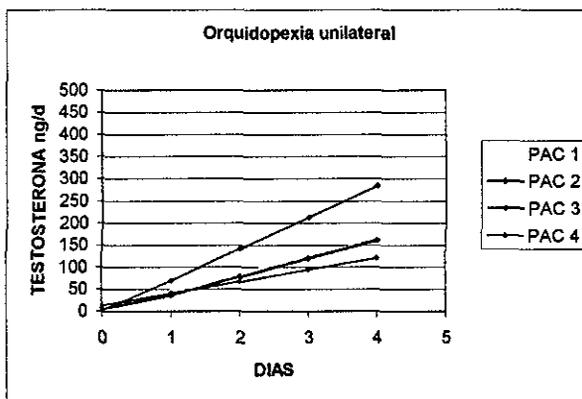


Figura 1. Niveles de testosterona durante la prueba de estimulación con hCG

Los valores iniciales de dihidrotestosterona fueron 29.5 ± 17.0 pg/ml y los valores en el 4to. día posterior a la estimulación aumentaron a 91.7 ± 21.6 pg/ml (Fig. 2).

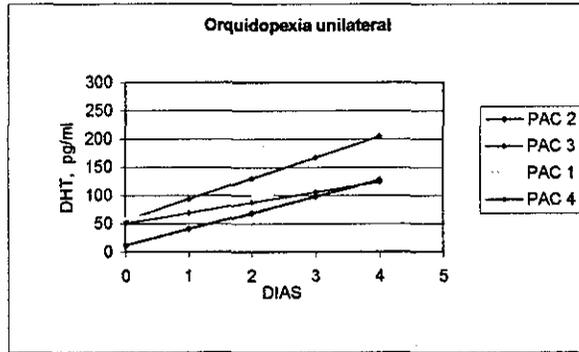


Figura 2. Comportamiento de los niveles de DHT durante la prueba de estimulación con hCG.

Sin embargo, no se encontró un cambio significativo en los niveles de la SHBG. Los niveles basales de la proteína fueron 79.1 ± 25.0 nmol/L y los valores en el 4to. día de estimulación fueron de 81.4 ± 31.3 nmol/L. El máximo porcentaje de disminución encontrado fue del 17% del valor basal en el paciente 2 (Fig. 3).

Según un estudio realizado por Belgorosky y cols,⁴³ en un grupo de pacientes con genitales externos masculinos o ambiguos los niveles de SHBG no cambiaron a pesar del aumento en los niveles de testosterona después de la estimulación con hCG, y si mostraron una disminución en los niveles de SHBG cuando se les administró testosterona.

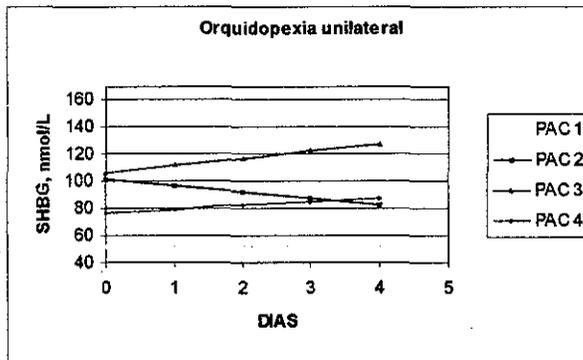


Figura 3. Cambio en los niveles de la SHBG durante la prueba de estimulación con hCG

4.1.3 Paciente con diagnóstico de panhipopituitarismo

En el paciente 5 no se observó un incremento en los niveles de testosterona durante la prueba de estimulación con hCG (Fig. 4). Esto puede explicarse porque en un paciente con panhipopituitarismo, no hay una secreción basal normal de LH, por tanto las células de Leydig pueden no responder a la estimulación con hCG si no hay una sensibilización previa.

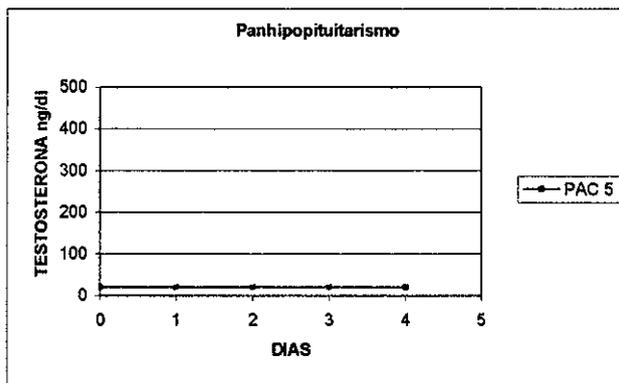


Figura 4. Comportamiento de los niveles de testosterona en un paciente con panhipopituitarismo

Los niveles de dihidrotestosterona en este paciente tampoco mostraron un aumento (Fig. 5).

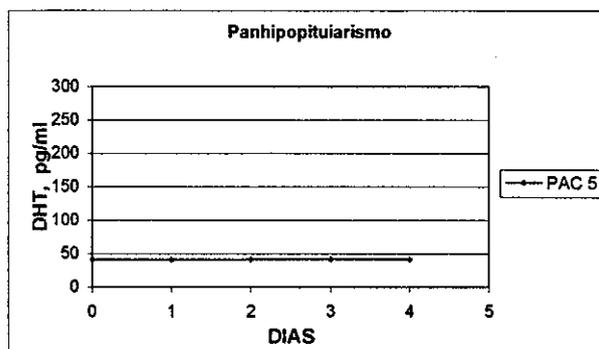


Figura 5. Valores de DHT durante la prueba de estimulación

En este paciente no esperábamos un cambio en los niveles de la SHBG, sin embargo, este comportamiento también se observó en pacientes que tuvieron una respuesta gonadal positiva (Fig. 6).

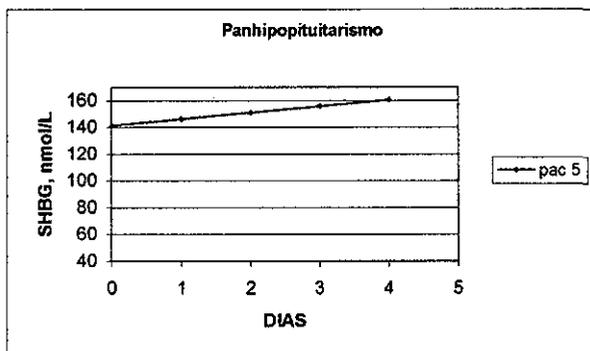


Figura 6. Cambio en los niveles de SHBG

4.1.4 Paciente con disgenesia gonadal mixta

En este paciente se observó un incremento en los niveles de testosterona desde un valor basal inferior al límite de detección del método hasta 164 ng/dl en el 4to. día de estimulación (Fig. 7).

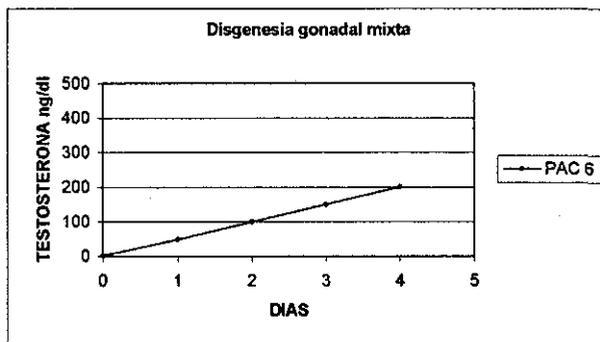


Figura 7. Respuesta de testosterona durante la prueba de estimulación con hCG

Los valores de dihidrotestosterona aumentaron también de 21.8 a 164 pg/ml como se muestra en la figura 8.

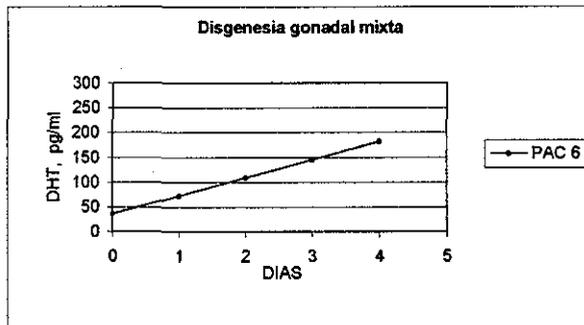


Figura 8. Aumento de los niveles de DHT durante la prueba de estimulación con hCG.

Los niveles de SHBG descendieron de 91.7 a 80.2 nmol/L, lo que representa una disminución del 13% con respecto al valor basal (Fig. 9).

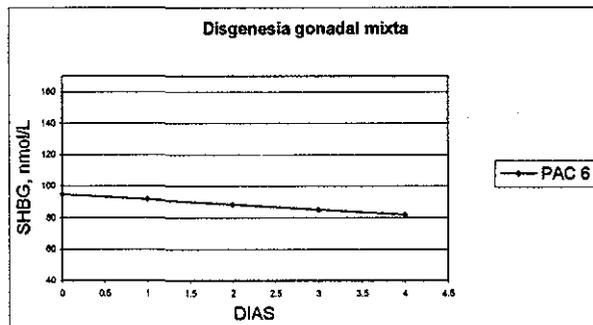


Figura 9. Cambio en los niveles de SHBG durante la prueba de estimulación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.1.5 Pacientes con deficiencia de 5 α -reductasa

En los dos pacientes con deficiencia de 5 α -reductasa (uno de ellos con diagnóstico comprobado por anomalías en el gen SRD5A23), se observó un incremento en los niveles de testosterona durante la prueba de estimulación con hCG desde niveles basales prepuberales hasta 204 y 478 ng/dl en el paciente no. 7 y no. 8 respectivamente (Fig 10).

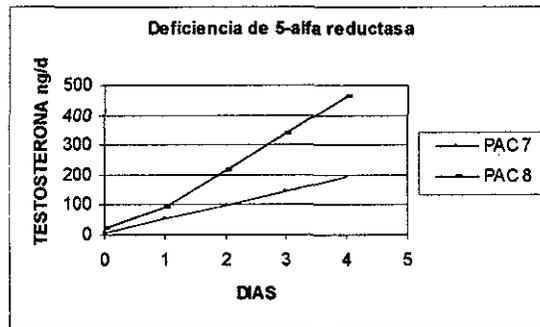


Figura 10. Respuesta de testosterona durante la administración de hCG

En el paciente en quien se administró testosterona, el valor máximo alcanzado fue de 986 ng/dl (Fig 11).

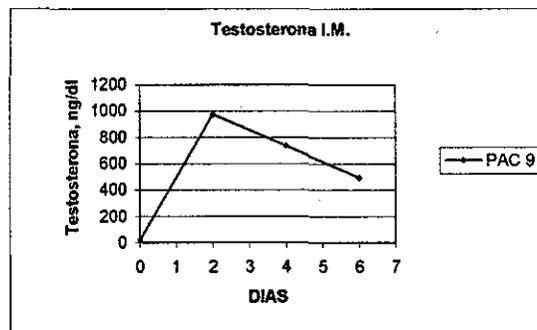


Figura 11. Niveles posteriores a la administración de testosterona I.M.

En este paciente la prueba de estimulación se hizo según lo descrito por los mismos autores^{42,43}, (estimulación con una dosis de 2 mg/kg de testosterona por vía intramuscular y medición de la SHBG 7 días después del estímulo) porque debido a la feminización casi normal de sus genitales externos, se decidió remover las gónadas y reasignar el sexo como femenino antes de la realización de este trabajo.

Los niveles de dihidrotestosterona aumentaron en 3 los casos (fig 12 y 13), y no observamos una diferencia en el cociente testosterona /dihidrotestosterona entre estos niños y los pacientes de otros grupos quienes tienen una actividad enzimática normal. En el paciente no. 7 el diagnóstico de deficiencia de 5 α reductasa es probable debido a las características fenotípicas del paciente: hipospadias perineal, pseudovagina y pliegues escrotales no rugosos y en el paciente no. 8 que es heterocigoto compuesto para dos mutaciones diferentes en el exón 4, los niveles de DHT aumentan en la misma proporción que en niños con actividad enzimática normal. En la deficiencia de 5 α -reductasa aunque los niveles de DHT son bajos, nunca son indetectables y pueden estar dentro del intervalo normal bajo. Los niveles de DHT circulante pueden tener 2 orígenes: síntesis por la actividad residual de la enzima mutante o por acción de la isoenzima 1, que se expresa en hígado y en piel no genital. Debe tenerse en cuenta también, por un lado que los niveles de DHT pueden alcanzar niveles supra fisiológicos cuando los pacientes reciben una cantidad muy grande de testosterona²⁹ y en segundo lugar que aunque uno de los criterios diagnósticos para deficiencia de 5 α reductasa es el cociente testosterona/dihidrotestosterona, se requiere la confirmación de la actividad de la enzima en extractos de fibroblastos de piel genital y que este cociente es variable en pacientes menos afectados (fenotipo predominantemente femenino, ambiguo, predominantemente masculino y completamente masculino con signos francos de subvirilización³¹).

Incluso pacientes con una delección de toda la secuencia codificadora del gen SRD5A23 quienes en consecuencia no poseen una enzima funcional tienen niveles detectables de DHT.

Otra consideración importante es que pudo haber errores metodológicos en la determinación de DHT, sobre todo en pacientes en los que los niveles de testosterona aumentaron mucho, porque en la cuantificación de la DHT por el método que empleamos sólo se realizó un proceso de oxidación y extracción del producto oxidado con una mezcla de hexano-etanol, y no un proceso de separación cromatográfica previa al RIA, como se haría idealmente.

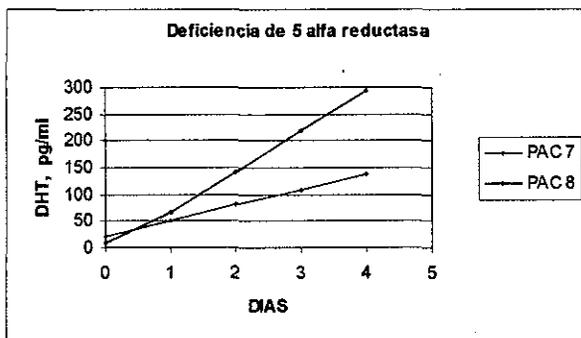


Figura 12. Comportamiento de la DHT durante la estimulación con hCG

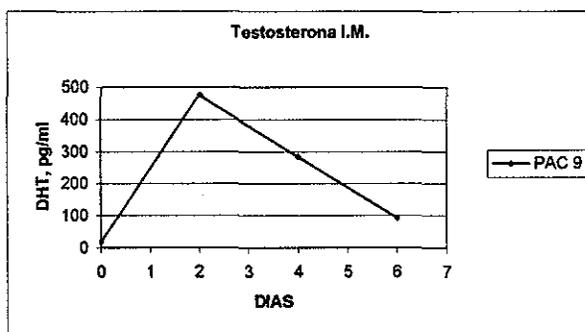


Figura 13. Aumento en los niveles de DHT posteriores a la administración de testosterona

En los pacientes en quienes la estimulación se hizo con hCG tampoco se encontró un cambio significativo en los niveles de la SHBG, con una disminución del 13% en el paciente 7 y del 5% en el paciente 8 con respecto al valor basal (Fig. 14).

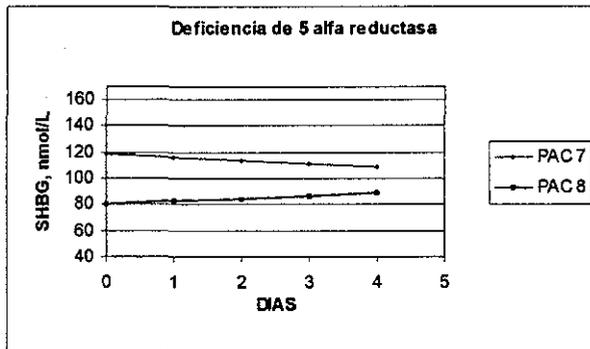


Figura 14. Niveles de la SHBG durante la prueba de estimulación con hCG

De todos los pacientes estudiados, la máxima disminución de la SHBG se observó en el paciente no. 9, con un valor inicial de 51.4 nmol/L hasta un valor al 6º. día de 38.1 nmol/L (fig 15), que implica una disminución del 26% del valor basal, que ya consideramos como una respuesta positiva según los estudios realizados por Belgorovsky y cols⁴³.

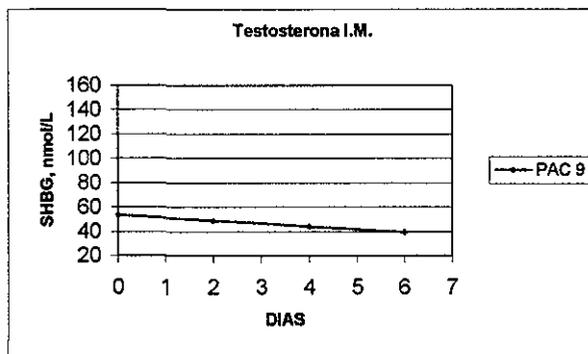


Figura 15. Descenso en los niveles de la SHBG posterior a la administración de testosterona

4.1.6 Pacientes con Síndrome de resistencia a andrógenos

En el paciente no. 10 observamos un incremento en los niveles de testosterona desde un valor prepuberal menor a 20 ng/dl hasta un valor de 177 ng/dl en el 4º. día de estimulación. En el paciente no. 12 los niveles de testosterona no aumentaron porque se le realizó la gonadectomía una vez que se estableció el diagnóstico de resistencia a andrógenos completa y se decidió reasignar el sexo como femenino (Fig. 16).

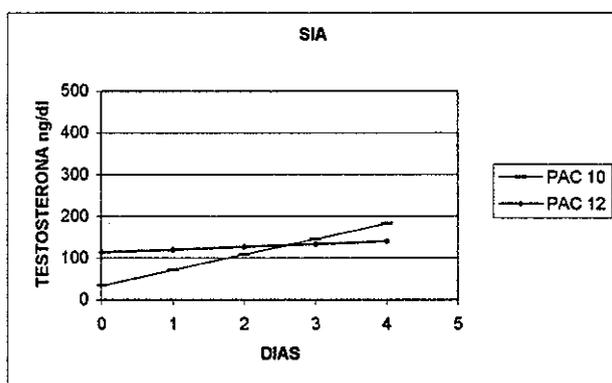


Figura 16. Aumento en los niveles de testosterona durante la prueba de estimulación con hCG

El nivel basal de testosterona más alto en el paciente no. 12 puede ser de origen adrenal, la secreción de andrógenos suprarrenales se incrementa entre los 6 y 8 años de edad y es independiente de la secreción de gonadotropinas, este proceso llamado adrenarca, es responsable de la aparición del vello púbico en los niños prepúberes.

En el paciente no. 11 se administró testosterona por las mismas razones que el paciente no. 9 (Fig. 17).

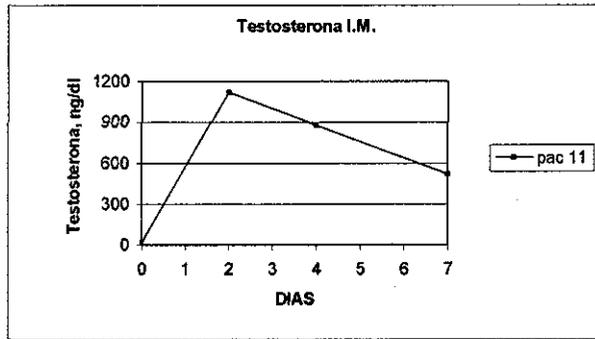


Figura 17. Administración de testosterona

Los cambios en los niveles de DHT se muestran en la figura 18, en el paciente no. 10 aumentan de 29.3 a 98.0 pg/ml, mientras que en el paciente no. 12 se observa una disminución de los mismos desde 256 hasta 54.8 pg/ml. Los valores basales de DHT también son superiores en este paciente en comparación con el resto de los pacientes estudiados.

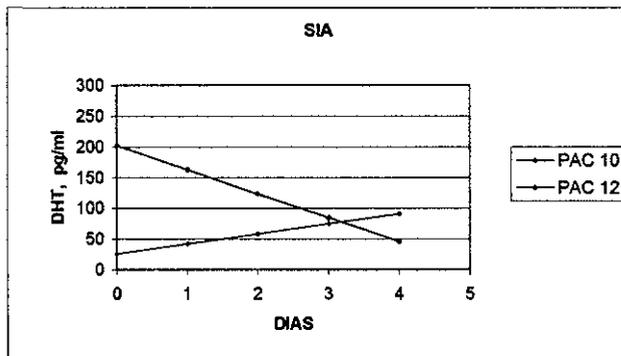


Figura 18. Cambio en los niveles de DHT durante la estimulación con hCG

El comportamiento de los niveles de DHT posteriores a la administración de testosterona en el paciente no. 11 se muestra en la figura 19. Los valores aumentaron desde 95.5 hasta 735 pg/ml.

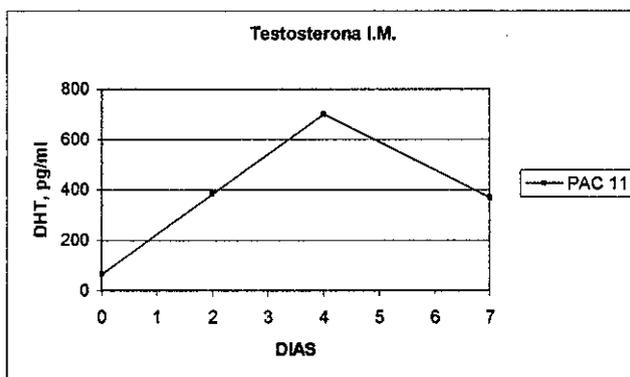


Figura 19. Comportamiento de la DHT posterior a la administración de testosterona

En los pacientes a quienes se administró hCG se observó una disminución de la SHBG del 8% en el paciente no. 10, y del 18% en el paciente no. 12 (Fig. 20)

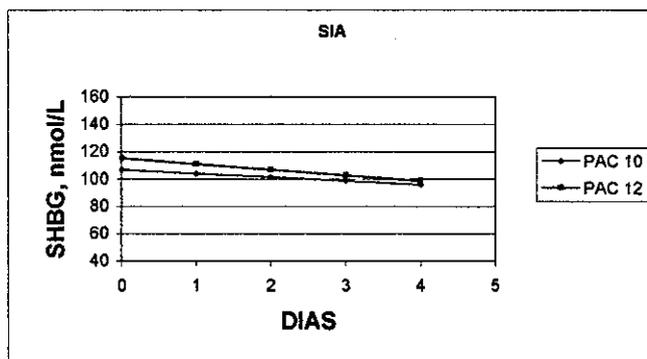


Figura 20. Cambio en los niveles de SHBG durante la estimulación con hCG

No se observó un cambio en los niveles de SHBG en el paciente no. 11 en quien se utilizó testosterona como estímulo (Fig. 21)

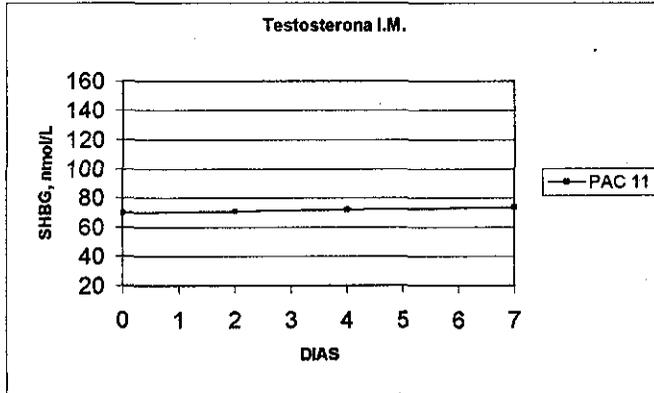


Figura 21. Cambio en los niveles de SHBG posteriores a la administración de testosterona

Tabla 4. Porcentaje de cambio con respecto al valor basal.

No de paciente	Testosterona	Dihidrotestosterona	SHBG
1	765	489	-7
2	815	851	-17
3	1245	267	20
4	465	298	7
5	0	84	-6
6	890	652	-13
7	920	34	-5
8	2290	1379	-6
9	2435	349	-26
10	785	234	-8
11	2330	287	5
12	30	-79	-18

El signo (-) indica disminución con respecto al valor basal.

4.2 DISCUSION

En el estudio de las alteraciones en la diferenciación sexual masculina, la determinación de la capacidad de los testículos para secretar testosterona es tan importante como la evaluación de la respuesta de los tejidos a andrógenos.

La capacidad potencial para responder a los andrógenos puede ser estimada mediante la determinación de los niveles del receptor de andrógenos en cultivo de fibroblastos de piel genital y de su capacidad de unión a los mismos.

En estos pacientes, también puede necesitarse la determinación de la actividad de enzimas necesarias para que el proceso de diferenciación sexual suceda de manera normal, como por ejemplo la determinación de la actividad de la 5α -reductasa en cultivos de fibroblastos de piel genital para el diagnóstico de deficiencia de la misma como causa de pseudohermafroditismo masculino.

Generalmente el diagnóstico definitivo en estos pacientes se hace mediante el análisis molecular del gen del receptor de andrógenos o de la 5α -reductasa.

Sin embargo estos estudios son costosos, largos, y requieren laboratorios especializados. Y pueden no detectar defectos post-receptor, o alteraciones en otros factores necesarios para la acción de los andrógenos.

Bajo estas consideraciones se han buscado pruebas bioquímicas más sencillas para evaluar la sensibilidad a los andrógenos in vivo en pacientes prepúberes con pseudohermafroditismo masculino.

Como la concentración sérica de la SHBG es regulada por andrógenos, y sus niveles pueden ser medidos por métodos de laboratorio rápidos y confiables, Belgorosky y

Raviola⁴¹, propusieron el descenso de la SHBG inducido por testosterona durante la prueba de estimulación con hCG para evaluar la sensibilidad de los tejidos a andrógenos in vivo. Aunque estos autores concluyeron que la respuesta de la SHBG puede ser un parámetro de la respuesta biológica a andrógenos, no determinaron la utilidad de la prueba en el diagnóstico de insensibilidad a andrógenos debido al número de pacientes y a la falta de diagnóstico etiológico de los mismos.

El número de pacientes estudiados por nosotros hasta ahora no nos permite hacer pruebas estadísticas para evaluar la utilidad clínica de la determinación de la SHBG posterior a la administración con hCG, sin embargo, el análisis de resultados individuales, sienta las bases para la realización de estudios posteriores en los que la prueba de estimulación debe realizarse con testosterona exógena y la determinación de la SHBG durante o 7 días después de la aplicación de esta hormona. En primera instancia, porque nosotros utilizamos testosterona en dos pacientes, uno con deficiencia de 5 α -reductasa, en quien se observó una disminución mayor al 20%, (respuesta positiva) y otro con resistencia completa a andrógenos, en quien no hubo cambio. En segundo lugar, porque aún cuando Bertelloni y cols.⁴⁴ concluyeron que los cambios de la SHBG durante la prueba de estimulación con hCG pueden utilizarse para evaluar la respuesta a los andrógenos *in vivo* en pacientes prepúberes, en estudios realizados por otros autores los resultados son contradictorios: Belgorosky y cols.⁴³, encontraron que la estimulación con hCG no es confiable cuando la respuesta es negativa y concluyeron que la estimulación con testosterona sí es útil como prueba de sensibilidad a los andrógenos; Willemse y cols.⁴⁷, no encontraron un cambio en la concentración de SHBG después de la estimulación con 5000 UI de hCG durante 4 días consecutivos. Y, por otro lado, otros estudios en los que se ha encontrado una correlación entre la disminución de la SHBG, y la respuesta clínica de los tejidos a andrógenos⁴² o la severidad del defecto del RA in vivo⁴⁸ se ha utilizado la administración de testosterona u otro esteroide androgénico.

La razón por la que utilizamos hCG es porque esta es una prueba de primera línea en el estudio de pacientes de la clínica de intersexo en el INP, de esta manera, de haberse encontrado una relación entre la respuesta de la SHBG y la testosterona y

dihidrotestosterona, esta prueba tendría la ventaja práctica de estudiar la respuesta gonadal y periférica simultáneamente.

CONCLUSIONES

1. En este trabajo no se encontró una relación clara entre la producción inducida de testosterona y dihidrotestosterona mediante estimulación con gonadotropina coriónica humana y las concentraciones séricas de la globulina fijadora de hormonas sexuales que sea útil como indicador de la respuesta biológica in vivo de los tejidos a andrógenos. Por lo que no podemos concluir que la prueba de estimulación con hCG sea una prueba inicial confiable para la evaluación del grado de insensibilidad a andrógenos.
2. Con base a los resultados obtenidos es recomendable que la determinación de la SHBG durante la estimulación con hCG sea una prueba de rutina en todos los niños con alteraciones en la diferenciación sexual con el fin de establecer una base de datos estadísticamente representativa y realizar un estudio retrospectivo que permita evaluar la utilidad de la prueba en un mayor número de pacientes que nos permita confirmar los resultados obtenidos en este trabajo.
3. De acuerdo a lo reportado en la literatura sería conveniente realizar la estimulación con testosterona exógena en los pacientes en los que no se encuentre una respuesta positiva de la SHBG durante la prueba de estimulación con hCG, y se evalúe la respuesta de la SHBG 7 días después, junto con la respuesta clínica de los genitales externos a la administración de este andrógeno.

REFERENCIAS

1. American Academy of Pediatrics. *Pediatrics* 2000; 106(1): 138:142.
2. Esmer M, del Castillo V, Calzada R. Clasificación y abordaje de la ambigüedad de genitales. *Acta Pediatr Mex* 2000; 21(3):76-81.
3. Moore C, Grumbach M. Sex determination and gonadogenesis: a transcription cascade of sex chromosome and autosome genes. *Semin Perinatol* 1992; 16(5):266-78
4. Haqq C, Danahoe P. Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiol Rev* 1998; 78(1):1-32.
5. Calzada R, Ruiz M, García M, Altamirano N, del Castillo V. Diferenciación sexual normal. *Acta Pediatr Méx* 2000; 21(2):34-45.
6. Gustafson M, Donahoe P. Male sexual determination: current concepts of male sexual differentiation. *Annu Rev Med* 1994; 45:505-24.
7. Parker K, Scheld A, Schimmer B. Gene interactions in gonadal development. 1999;61:417-33.
8. Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, Berta P. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn* 2000;217: 293-298.
9. Hiort O, Holterhus P. The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endoc* 2000; 142:101-110.
10. Parker L, Schimmer B, Schedl A. Genes essential for early events in gonadal development. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 831-838
11. Anhalt H, Neely K, Hintz R. Ambiguous genitalia. *Pediatr Rev* 1996; 17(6):213-222
12. Berkovitz G, Lee P, Brown T, Migeon C. Etiologic evaluation of male pseudohermaphroditism in infancy and childhood. *AJDC* 1984; 138: 755- 759.
13. Warne G, Zajac J. Disorders of sexual differentiation. *Endoc Metab Clin N Am* 1998; 27(4): 945-966.
14. Telvi L, Lebbar A, del Pino O, Barbet J, Chaussain J. 45X/46XY mosaicism: Report of 27 cases.
15. Calzada R, Altamirano B, Ruiz M, García M. Alteraciones en la diferenciación gonadal. *Acta Pediatr Mex* 2000; 21(5):160-7.
16. Mendoca B, Inacio M, Arnhold I, Costa E, Bloise W. Male pseudohermaphroditism due to 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. *Medicine* 2000; 79(5):
17. Zenteno C, Canto P, Kofman S, Mendez J. Evidence for genetic Heterogeneity in males pseudohermaphroditism due to Leydig cell hypoplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84(10) :3803-3806.
18. Griffin J. Androgen resistance, the clinical and molecular spectrum. *N Eng J Med* 1992; 326(9): 611-618.
19. Adachi M, Takayanagi R, Tomura A, Imasaki K, Kato S, Goto K, Yanase T, Ikuyama S, Nawata H. Androgen insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N Eng J Med* 2000; 343(12):856 – 862.
20. Sammarco I, Grimaldi P, Pellegrino R, Cappa M, Moretti C, Frajese G, Geremia R. Novel point mutation in the splice donor site of exon-intron junction 6 of the androgen receptor gene in a patient with partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endoc Metab* 2000; 85(9):3256-3261.
21. Ahmed S, Cheng A, Dovey L, Hawkins H, Martin H, Rowland J, Shimura N, Tait A, Hughes I. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational

- analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endoc Metab* 2000; 85(2): 658-665.
22. Griffin J. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of the human androgen receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 (10):3435-3441.
 23. Gottlieb B, Leivaslaiho H, Beitel L, Lumbroso R, Pinsky L, Trifiro M. The androgen receptor gen mutations database. *Nucleic Acids Res* 1998;26:234-238.
 24. Evans B, Hughes I, Bevan C, Patterson M, Gregory J. Phenotypic diversity in siblings with partial androgen sensitivity syndrome. *Arch Dis Child* 1997; 76:529-531.
 25. Quigley C, Bellis A, Marschke K, El-Awady M, Wilson E, French F. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endoc Rev* 1995; 16(3):271-313.
 26. Balducci R, Ghirri P, Brown T, Bradford S, Boldrini A, Boscherini B, Sciarra F, Toscano V. A clinician looks at androgen resistance. *Steroids* 1996; 61:205-211.
 27. Randall S, Hines M, Tho S, Behzadian M, McDonough P. Steroid 5 alpha reductase 2 gen melting polymorphisms in male subjects with azoospermia or oligospermia. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180(6):1934 - 1938.
 28. Thigpen A, Davis D, Milatovich A, Mendonca B, Imperato J, Griffin J, Francke U, Wilson J, Russell D. Molecular genetics of steroid 5-alpha reductase 2 deficiency. *J Clin Invest* 1992;90: 799-809.
 29. Wilson J, Griffin J, Russell D. Steroid 5alpha reductase 2 deficiency. *Endoc Rev* 1993; 14(5):577- 593.
 30. Mendoca B, Inacio M, Costa E, Arnhold I, Silva F, Nicolau W, Bloise W, Russell D, Wilson J. Male pseudohermaphroditism due to steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. Diagnosis, psychological evaluation, and management. *Medicine* 1996; 75(2): 64-76.
 31. Calzada R, García M, Altamirano N, Ruiz M. Defectos en la conversión y acción de las hormonas sexuales. *Acta Pediatr Mex* 2000; 21(6):224-33.
 32. Berube D, Seralini GE. Localization of the human sex hormone binding globulin gene to the short arm of the chromosome 17 (17p12-p13). *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54(1-2):65-67.
 33. ¹ Rosnew R. Plasma Steroid-Binding Proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991;20(4):697-720.
 34. Grishkovskaya I, Avvakumoc GV, Sklenar G, Daales D. Crystal structure of human-sex-binding-globulin:steroid transport by a laminin G-like domain. *EMBO J* 2000; 19(4): 514-512.
 35. Damassa DA, Cates JM. Sex hormone binding globulin and male sexual development. *Neurosci Biobehav Rev* 1995; 19(2): 165-175.
 36. William R, Hryb Daniel, Khan M, Nakhla A, Romas N. Sex hormone -binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69:481-485.
 37. Joseph D. Structure, function and regulation of androgen-binding protein/sex hormone binding globulin. *Vitamins and hormones* 1994; 49:197 -280.
 38. Fortunati N. Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner? *J Endocrinol Invest* 1999;22(3):223-234.
 39. Loukovaara M, Carson M, Adlercreutz H. Regulation of production and secretion of sex hormone binding globulin in HepG2 cell cultures by hormones and growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 180(1): 160 -164.

40. Toscano V, Balducci R. Steroidal and no-steroidal factors in plasma sex hormone binding globulin regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;43(5):431-437.
41. Belgorosky A, Rivarola M. Sex Hormone-Binding Globulin response to human chorionic gonadotropin stimulation in children with cryptorchidism, anorchia, male pseudohemaphroditism, and micropenis. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54(4):698-704.
42. Ciaccio M, Rivarola M, Belgorosky A. Decrease of serum sex hormone-binding globulin as a marker of androgen sensitivity. Correlation with clinical response. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989;120:540-544.
43. Belgorosky A, Rivarola M. Sex hormone binding globulin response to testosterone. An androgen sensitivity test. *Acta Endocrin* 1985; 109:130-138.
44. Bertelloni S, Federico G, Baroncelli G, Cavallo L, Corsello G, Liotta A, Rigon F and Saggese G. Biochemical selection of prepuberal patients with androgen insensitivity syndrome by sex hormone-binding globulin response to the human chorionic gonadotropin test. *Pediatr Res* 1997;41(2):266-271.
45. Awady MK, Salam MA. Dihydrotestosterone regulates plasma sex hormone binding globulin in prepuberal males. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989;30(3):279-284.
46. Avila D, Wilson C, Nandi N, Griffin J and McPhaul M. Immunoreactive AR and genetic alterations in subjects with androgen resistance and undetectable AR levels in genital skin fibroblast ligand binding assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(1): 182-188.
47. Willemse P, Sleijfer D, Pratt J, Sluiter W and Doorenbos H. No change in plasma free testosterone ratio and plasma sex hormone binding globulin concentration during hCG stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58(6):1193-1196.
48. Sinnecker G, Hiort E, Nitsche P, Holterhus M and Kruse K. Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. *Eur J Pediatr* 1997;156:7 – 14.