



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA" O.D.**

**"UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE  
GENERACIÓN EN EL ABORDAJE DE TRASTORNOS DEL  
DESARROLLO SEXUAL"**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA:**

**MAURICIO RENÉ MURILLO VILCHES**

**TUTOR: DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"**

**CO-TUTORES: DR. MIGUEL ÁNGEL FONSECA SÁNCHEZ  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"**

**DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>RESUMEN ESTRUCTURADO.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
	II.I. Mecanismos del desarrollo gonadal.....	4
	II. II. Control genético del desarrollo gonadal.....	6
	II. III. Trastornos del desarrollo sexual.....	11
<b>III.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>19</b>
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>V.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>21</b>
<b>VII.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>22</b>
	VII.I. Diseño del estudio.....	22
	VII.II. Población del estudio.....	22
	VII.III. Procedimiento.....	23
	VII.IV. Materiales y técnicas.....	25
	VII.V. Análisis estadístico.....	36
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
	VIII.I. Caracterización molecular de pacientes con TDS 46,XX.....	37
	VIII.II. Caracterización molecular de individuos con TDS 46,XY fenotípico.....	45
<b>IX.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>66</b>
<b>XI.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## “UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE SECUENCIACIÓN DE SIGUIENTE GENERACIÓN EN EL ABORDAJE DE TRASTORNOS DEL DESARROLLO SEXUAL”

### RESUMEN ESTRUCTURADO.

**INTRODUCCIÓN.** Los Trastornos del Desarrollo Sexual (TDS) son entidades clínicamente heterogéneas, donde se ve alterado tanto el sexo cromosómico, gonadal y fenotípico, el diagnóstico está basado en criterios clínicos y al cumplir con estos se puede identificar la causa en aproximadamente 15-20% de los casos. Las técnicas de Secuenciación de Siguiete Generación han mejorado la capacidad diagnóstica en el caso de trastornos con heterogeneidad genética.

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.** Actualmente el porcentaje de diagnósticos moleculares definitivos en los TDS, por lo que se requiere la realización de un protocolo molecular en el abordaje diagnóstico tomando en cuenta herramientas de secuenciación eficientes como la Secuenciación de Siguiete Generación.

**JUSTIFICACIÓN.** La caracterización de variantes patogénicas asociadas a TDS mediante de un protocolo molecular que incluya técnicas eficientes de diagnóstico, permitirá confirmar el diagnóstico, brindar asesoramiento genético certero y guiar la vigilancia de comorbilidades asociadas.

### **OBJETIVOS.**

**General.** Caracterizar variantes patogénicas asociadas a Trastornos del Desarrollo Sexual 46, XY, 46, XX y trastornos gonadales mediante técnicas moleculares específicas para cada trastorno, como Amplificación Múltiple de Sondas Ligadas, Secuenciación Sanger, y secuenciación de Siguiete Generación con el protocolo de Exoma.

**Específicos.** Caracterizar variantes patogénicas con del gen CYP21A2, en pacientes con TDS 46,XX, para integrar el diagnóstico de Hiperplasia Suprarrenal Congénita. Identificar variantes patogénicas y estimar una frecuencia de variantes en los genes de la enzima 5-alfa reductasa tipo 2 y en el gen del receptor de andrógenos en la población de pacientes con TDS 46,XY, mediante secuenciación Sanger. Identificar variantes patogénicas en un caso

familiar de TDS gonadal XX con dos individuos afectados, mediante Secuenciación de Siguiete Generación con el protocolo de Exoma, familiar.

## **RESULTADOS.**

El protocolo molecular en pacientes con TDS 46, XX mediante MLPA identificó variantes patogénicas en siete pacientes, todos con la forma clásica de Hiperplasia Suprarrenal Congénita.

Con el abordaje de Secuenciación Sanger de *SDR5A2* y *AR*, se lograron identificar variantes patogénicas en 12 casos de 49 paceutes estudiados en total.

Se logró identificar la primera familia mexicana con una variante patogénica en el gen *ADAM8*, mediante el protocolo de Secuenciación Exoma.

## **CONCLUSIONES.**

La aplicación de MLPA es de gran utilidad en el abordaje de pacientes con Hiperplasia Suprarrenal Congénita clásica. El protocolo de estudio de los genes *SDR5A2* y *AR* mediante Secuenciación Sanger permite caracterizar variantes patogénicas en 24% de los pacientes estudiados. El protocolo de Secuenciación Exoma permitió identificar una variante no reportada previamente en el gen *ADAM8*, gen reportado como participante en el desarrollo gonadal en modelos murinos.

## INTRODUCCIÓN

La determinación gonadal es el evento crítico que definirá la ruta que seguirá la gónada indiferenciada a testículo u ovario y finalmente hacia un fenotipo masculino o femenino. Estos eventos del desarrollo tienen un patrón dimórfico, que culmina con las características biológicas, psicológicas y sociales inherentes a cada sexo (1). Se trata de un proceso activo que depende de la interacción de genes y proteínas en células específicas y en presencia de la dosis génica exacta y cualquier modificación de estas condiciones origina que se altere el destino de la gónada que se traduce en defectos genitales o trastornos del desarrollo sexual. Sin embargo, el conocimiento acerca de estos procesos aún no ha sido bien definido (2). La última revisión de la Asociación Americana de Pediatría establece que las anomalías del área genital se presentan en 1 de cada 100 RNV e incluyen hipospadias, criptorquidias y patologías más complejas(1).

Las nuevas tecnologías actuales de diagnóstico genético como la Secuenciación de Nueva Generación (“Next Generation Sequencing” ó NGS, por sus siglas en inglés) son aplicables para la realización del diagnóstico molecular en pacientes con este tipo de trastornos.(1) En nuestro medio, el acceder a el uso de las técnicas de NGS en servicios hospitalarios gubernamentales es limitada, sin embargo en la práctica privada se muestra una gran factibilidad de la realización de el protocolo molecular con el uso de NGS.

El uso de técnicas de Secuenciación de Siguiete Generación, fue introducido como parte del protocolo de estudio diagnóstico de varias entidades genéticas con una heterogeneidad del locus como autismo sindromático, cáncer hereditario y enfermedades neurogenéticas, en las cuales ha alcanzado un porcentaje mayor de detección de variantes patogénicas frente al protocolo de secuenciación Sanger, incluso de gran ventaja en la detección de genes asociados que no habían sido reportados previamente con estudios moleculares convencionales (1).

Estas técnicas han tenido un gran impacto en la investigación biomédica y se abren camino hacia el campo del diagnóstico clínico impulsado por la reducción del coste y mayor flexibilidad debido a plataformas específicas dirigidas. Se ha demostrado la eficacia de las técnicas NGS al analizar una gran cantidad de genes de forma simultánea (2).

Los desórdenes o trastornos del desarrollo sexual (DDS o TDS) son condiciones congénitas en las que el sexo cromosómico, gonadal o fenotípico están alterados. Es un grupo heterogéneo en donde se incluyen fenotipos clínicos como hipospadias (1 de 250 recién nacidos masculinos), genitales ambiguos (1 de cada 4,500 recién nacidos) y reversión sexual completa XX o XY (1 de cada 20,000 recién nacidos) (3).

Representan un problema de salud principalmente en la población pediátrica, debido a la dificultad en el manejo clínico de estas condiciones. La incertidumbre sobre el género del paciente puede ser extremadamente traumático para el paciente, los padres y otros miembros de la familia, y puede tener consecuencias psicológicas y reproductivas para el paciente (3).

El diagnóstico molecular específico se realiza en aproximadamente 20% de los pacientes con TDS. (4) Un mejor entendimiento de la base genética será de ayuda para el diagnóstico y tratamiento de cada uno de los trastornos de la diferenciación sexual (4).

### **MECANISMOS DEL DESARROLLO GONADAL**

El sexo se determina por la constitución del sexo cromosómico, XY en varones y XX en mujeres (5).

Durante la quinta semana de la etapa embrionaria, son visibles la gónada primitiva bipotencial y las crestas genitales (4). El desarrollo sexual se puede dividir en dos procesos secuenciales: determinación y diferenciación sexual.

En la determinación sexual; la gónada primitiva indiferenciada da origen a los testículos u ovarios. Esta etapa depende del complemento cromosómico sexual, la presencia de un cromosoma Y, y la expresión del gen *SRY*, promueven la formación de la gónada masculina. En ausencia del cromosoma Y, resulta en el desarrollo de la gónada femenina (4,5).

En la diferenciación sexual, las hormonas gonadales actúan sobre los genitales internos y externos, dando lugar a la diferenciación de las estructuras reproductivas. La secreción de factores locales y endócrinos como testosterona, y la hormona anti-Mülleriana, por los testículos, lleva al desarrollo de los genitales masculinos internos (próstata, conductos deferentes, vesícula seminal) a partir de los conductos de Wolf y a nivel periférico la

conversión de testosterona a dihidrotestosterona permite la virilización de estructuras derivadas del seno urogenital y dan lugar a utero, pene y escroto. En ausencia de estas hormonas los conductos de Müller dan origen a los genitales internos femeninos (trompas de Falopio, útero y tercio superior de la vagina) y a la feminización de los genitales externos (clítoris, labios mayores y menores) (4,5).

Las gónadas de ambos sexos se desarrollan desde el primordio localizado en el borde medioventral del reborde urogenital, adyacente al riñón y la suprarrenal primitivos. Hasta la fase de 12 mm o 42 días de gestación, las gónadas del varón y la hembra son indistinguibles. La gónada indiferenciada primitiva está constituida por cuatro linajes de células: células germinales, células de tejido conectivo, células productoras de esteroide y células de soporte(4). Proceden de la proliferación del epitelio celómico mesodérmico, la masa de células mesenquimales en el reborde urogenital, los elementos mesonéfricos y las grandes células germinales primordiales, que contienen fosfatasa alcalina y han emigrado desde el endodermo posterior del saco vitelino a través del mesénquima del mesenterio, hasta la gónada(4). El número de células germinales emigrantes en el embrión humano es de 700 a 1300 y hacia las 8 semanas de embriogénesis existen alrededor de 600,000 células germinales que más tarde se convierten en oogonias o espermatogonias. La falta de células germinales es incompatible con la diferenciación ovárica, pero no impide la morfogénesis testicular(4,5).

Bajo la influencia de los genes determinantes del testículo, la organización testicular comienza aproximadamente en la sexta o séptima semana. El testículo se desarrolla con más rapidez que el ovario. El ovario no emerge de la fase indiferente hasta los 3 meses de gestación(6).

Estos procesos están regulados por diferentes genes, localizados en los cromosomas sexuales y los autosomas, que actúan a través de una variedad de mecanismos, entre ellos factores organizadores, hormonas gonadales esteroideas y peptídicas y receptores (6).

En el 2006 se emitió una nueva nomenclatura de los trastornos del desarrollo sexual, en la cual términos como hermafrodita, pseudohermafroditismo, reversión sexual e intersexo, quedan en desuso y se adopta la definición genérica de TDS (Tabla 1) (7).

Tabla 1. Nomenclatura anterior y actual de los TDS.

<b>Nomenclatura anterior</b>	<b>Nueva Nomenclatura</b>
Intersexual	Desorden del desarrollo sexual (DDS)
Pseudohermafroditismo masculino: subvirilización, submasculinización XY hombre	DDS 46,XY
Pseudohermafroditismo femenino: sobrevirilización, masculinización XX mujer	DDS 46, XX
Hermafroditismo verdadero	DDS Ovotesticular
Hombre XX o reversión sexual XX	DDS 46, XX testicular
Reversión sexual XY	Disgenesia gonadal completa, síndrome de Swyer.

## CONTROL GENÉTICO DEL DESARROLLO GONADAL

El conocimiento sobre el control genético del desarrollo sexual se ha obtenido del análisis mutacional y funcional de los pacientes con trastornos de la diferenciación sexual. Se han utilizado modelos de ratón *in vivo* e *in vitro* modelos como NTERA-2 (líneas celulares de carcinoma embrionario testicular). El desarrollo sexual es un proceso complejo que involucra un gran número de genes (Tabla 2) (4,8).

Tabla 2. Genes asociados con los trastornos del desarrollo sexual en el humano.

GEN	PÉRDIDA DE FUNCIÓN/HAPLOINSUFICIENCIA	GANANCIA DE FUNCIÓN/DUPLICACIÓN
<i>SRY</i> (Yp11.2) OMIM 480000	Disgenesia gonadal 46,XY	DDS 46,XX testicular
<i>SOX9</i> (17q24) OMIM 608160	Disgenesia gonadal 46,XY con displasia campomélica	DDS 46,XX testicular
<i>NR5A1 (SF1)</i> (9q33) OMIM 184757	Disgenesia gonadal 46,XY con falla adrenal	Disgenesia gonadal 46,XY
<i>NR0B1 (DAX1)</i> (Xp21.2) OMIM 300473	Hipoplasia adrenal congénita e hipogonadismo hipogonadotrópico	Disgenesia Gonadal 46, XY
<i>WNT4</i> (1p36.12) OMIM 603490		Disgenesia Gonadal 46, XY
<i>RSPO1</i> (1p34.3) OMIM 609595	DDS 46,XX testicular con hiperqueratosis	
<i>WT1</i> (11p13) OMIM 607102	Síndromes WAGR, Denys-Drash y Frasier	
<i>CBX2</i> (17p25) OMIM 613080	DDS 46,XY	
<i>FOXL2</i> (3q22) OMIM 605597	Síndrome Blefarofimosis-ptosis-epicanto-inverso con falla ovárica	
<i>DMRT1</i> (9q24.3) OMIM 602424	Disgenesia gonadal 46, XY	

Adaptado de "Disorders of Sex Development" John M. Hutson. Springer. 2012

### ***Genes relacionados con el desarrollo testicular.***

El dimorfismo sexual es desencadenado por la expresión del gen *SRY*, localizado en el cromosoma Y, alrededor de la sexta semana de gestación. La expresión del gen *SRY* es transcripcionalmente regulada por la proteína del tumor del Wilms (WT1, también conocida como WT33), SF-1, GATA-4, su cofactor FOG-2 (también llamado ZFPM2) y CBX2 (4).

El gen *SRY* humano tiene su locus en Yp11.3, no contiene intrones y produce transcritos que codifican una proteína de 204 residuos con tres dominios: un dominio amino-terminal, un dominio de unión al ADN central, que consiste en una sola secuencia de HMG (grupo de alta movilidad), y un dominio carboxilo-terminal. En los humanos se expresa en las gónadas 46,XY, coincidiendo con la formación del cordón sexual y persiste hasta al menos la semana 18 de gestación, en las células de Sertoli fetales, así como en las células de Sertoli y células germinales adultas (9).

En los humanos, los niveles de ARNm de *SRY* se expresan en la cresta urogenital a la séptima semana postconcepcional, llevando a la gónada bipotencial hacia la vía testicular en individuos 46, XY. La proteína *SRY* se transporta al núcleo y se une a regiones potenciadoras de *SOX9*, lo cual dirige la diferenciación y proliferación de células de Sertoli y la organización tubular testicular (3).

El gen *SOX9* es el segundo gen más importante en la vía testicular. Se localiza en 17q24, pertenece a una familia de factores de transcripción de proteínas de dominio HMG relacionados con el factor determinante del testículo *SRY*. A diferencia del *SRY* tiene un intrón y un dominio de trans-activación transcripcional bien definido. Se expresa en el riñón, en el sistema nervioso central, el páncreas, las células precursoras condrogénicas y las células de Sertoli (10). La proteína *SOX9* junto con *SRY* y *NR5A1*, se une a su propio promotor lo que mantiene niveles altos de expresión de *SOX9* (4)

*TCF21* (Factor de transcripción 21), tiene tres sitios de unión para *SRY* en su región promotora y su proteína actúa directamente sobre los sitios de unión para iniciar una cascada de eventos asociados a la diferenciación de células de Sertoli y desarrollo del testículo embrionario (11).

El gen *NR5A1* o *SF-1* (factor esteroideogénico 1), pertenece a la familia de los receptores nucleares huérfanos y es un factor de transcripción involucrado en la regulación de enzimas

esteroidogénicas (12). Está ubicado en 9q33. Codifica para un receptor nuclear huérfano, el cual, es el mayor contribuyente en el desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-gónada-adrenal. En las células pre-Sertoli, NR5A1 sinergiza con el factor de transcripción GATA-4, al inicio de la determinación testicular, y se une al promotor de *SRY* para aumentar la expresión de éste (6)

El gen *WT1* (locus 11p13), codifica para una proteína en dedos de zinc, la cual tiene función de represor o activador transcripcional, dependiendo del contexto celular o cromosómico. Actúa junto con *SF-1* en el desarrollo urogenital para asegurar la formación adecuada de la gónada indiferenciada (5).

El gen *NR0B1* o *DAX1*, está localizado en el cromosoma X (Xp21.3), al igual que *NR5A1* codifica para un receptor nuclear huérfano, es un regulador de la transcripción (5). Se expresa temporalmente junto con *SF-1*, en el hipotálamo, la hipófisis, las glándulas suprarrenales y las gónadas en desarrollo. En las células de Sertoli de la gónada en desarrollo se expresa junto con otros factores determinantes del testículo como *WT1*, *SF1*, *SOX9* y *SRY*.(8)

Los genes *GATA4* y *ZFPM2* o *FOG2*, codifican para factores de transcripción que son críticos en el desarrollo testicular (8)

El gen *DMRT1* (locus 9p24.3), es un factor de transcripción, su función está bien establecida, es un regulador crítico del desarrollo gonadal, sus funciones incluyen: proliferación y pluripotencialidad de las GC fetales, diferenciación de las células de Sertoli en neonatos y control de la decisión entre mitosis y meiosis en la espermatogonia adulta. También es un represor y activador transcripcional de *STRAT8*, ya que o activan en mujeres y reprimen en varones durante la etapa embrionaria. *STRAT8* se requiere para la replicación pre-meiótica del ADN (13).

El gen *WWOX*, tiene su locus en el cromosoma 16 y se cree que su proteína participa en la misma vía que *DMRT1*, promoviendo la diferenciación de las células de Sertoli y el mantenimiento de las células germinales (4)

La proteína del gen *DHH* o proteína erizo del desierto, es un miembro de la familia de proteínas de señalización del erizo. La *DHH* y el *Patched 1*, el receptor de la *DHH*, tienen un papel crítico en la diferenciación de las células de Leydig, mediante suprarregulación del *SF1*. El gen *DHH* se localiza en 12q12-q13.1. (4)

### ***Genes relacionados con el desarrollo ovárico.***

En décadas pasadas, la determinación sexual ovárica se consideraba un proceso pasivo que ocurría en ausencia del gen *SRY*. A pesar de la ausencia de cambios morfológicos visibles, patrones de expresión génica dentro de las células somáticas XX en la gónada bipotencial han demostrado la diferenciación de las células de la granulosa y las células de la teca. Altos niveles de ARNm de los factores de señalización *WNT4* y *RSPO1*, aumentan la expresión y estabilizan al factor de transcripción CTNNB1 o  $\beta$ -catenina, el cual reprime la expresión de *SOX9*, permite la expresión de *WNT4* y promueve la proliferación de células germinales. (12)

El gen *RSPO1* está localizado en 1p34.3 actúa mediante la activación de las vías de señalización WNT y  $\beta$ -catenina. La expresión de *RSPO1* está incrementada durante la sexta a novena semanas de gestación, etapas críticas del desarrollo ovárico temprano. (4)

El gen *WNT4*, tiene su locus en 1p36. Durante la embriogénesis se expresa en la gónada de uno y otro sexo, antes de que los eventos de la determinación sexual tomen lugar a continuación se subexpresa en la gónada masculina. Está implicado en la regresión de los conductos de Müller, formación de la vasculatura sexo específica, inhibición de la esteroidogénesis a través del incremento de la expresión de *DAX1/NROB1* que antagoniza a SF-1 y además participa en los eventos de migración celular sexo-específica. Interviene en la supervivencia de las células germinales femeninas fundamentales en el proceso de formación y mantenimiento del ovario (14).

La diferenciación ovárica ocurre durante la séptima semana de la gestación, que es la etapa del desarrollo en la cual las células germinales entran a meiosis.(4)

El ovario y las células de la granulosa se mantienen debido a la expresión de *FOXL2*, que se localiza en 1q23, es un factor de transcripción esencial para la función reproductiva en el sexo femenino, se expresa desde etapas tempranas del desarrollo ovárico, lo que sugiere una función en la determinación ovárica. Además es un activador transcripcional de *CYP19* que codifica para la enzima aromatasa, responsable de la biotransformación de andrógenos a estrógenos. En la vida postnatal es importante para el mantenimiento folicular y del ovario, debido a que es un regulador de la función de la célula de la granulosa y un factor transcripcional clave en estas células.



### **Trastornos del Desarrollo Sexual 46, XY.**

Se trata de un grupo de TDS en los cuales el sexo cromosómico es 46 XY, sin embargo presentan un fenotipo desde subvirilizado hasta fenotipos femeninos completos. (15) La fisiopatología es diversa y es lo que los clasifica en trastornos de disgenesia o disfunción testicular (Disgenesia Gonadal Completa) , defectos de reducción en la síntesis de andrógenos (deficiencia de 5 alfa reductasa), defectos en la síntesis o acción deficiente de la hormona antimülleriana (Síndrome de Persistencia de conductos Mülleriano), trastornos de falta de respuesta del órgano terminal (defectos de los receptores androgénicos) y otros trastornos asociados a síndromes dismórficos, hipospadias aisladas, micropene aislado.(16)

#### *Disgenesia gonadal 46,XY*

La disgenesia gonadal 46,XY (MIM 400044), fue descrita por Swyer. Ocurre en 1 de cada 80000 nacidos vivos, (16) En su forma completa se caracteriza por fenotipo femenino, talla normal o alta, gónadas disgénéticas bilaterales, infantilismo sexual con amenorrea primaria, habito eunucoide y cariotipo 46,XY. Las estructuras internas son femeninas, con trompas bilaterales, útero y vagina. Entre el 10 y el 30% de los pacientes desarrollan neoplasias gonadales, especialmente gonadoblastoma y germinoma (seminoma, disgerminoma). (15)

En los individuos con la forma incompleta los genitales tanto internos como externos pueden ser ambiguos. El desarrollo de las mamas después de la edad normal de la pubertad sugiere la presencia de un tumor gonadal secretor de estrógenos, especialmente un gonadoblastoma. Están aumentadas las gonadotrofinas en plasma y en orina. En algunos pacientes, la concentración de la testosterona sérica es más alta que en las mujeres adultas, probablemente debido a secreción de andrógenos por las células del hilio de las cintillas gonadales. (15)

La disgenesia XY es un proceso heterogéneo que se puede deber a deleciones del brazo corto del cromosoma Y, mutaciones del gen *SRY* u otros genes determinantes del sexo, o duplicaciones de *DAX1* en el cromosoma X. Se han encontrado mutaciones puntuales en el gen *SRY* en el 10 al 20% de los pacientes con disgenesia gonadal 46 XY completa.

El diagnóstico de disgenesia gonadal completa se basa en los hallazgos clínicos, histología gonadal, análisis cromosómico y pruebas para detectar cambios en genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual (*SRY, SOX9, WT1, NR5A1, DHH, NR0B1*) (15).

### *Deficiencia de 5 alfa-reductasa tipo 2.*

Se debe a un defecto en el gen *SRD5A2* que codifica para la enzima 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2, se localiza en 2p23, tiene 5 exones, codifica para una proteína de 254 aminoácidos la cual se expresa antes y después de la diferenciación sexual principalmente en las células de la próstata y la piel de los genitales. La mayoría de los casos son homocigotos, aunque cerca del 35% de los casos son heterocigotos compuestos. Se han identificado distintos tipos de variantes patogénicas, el resultado es la disminución o ausencia de la actividad enzimática por lo que la biotransformación de testosterona a 5 $\alpha$ -reductasa se encuentra reducido o ausente, lo que explica la heterogeneidad fenotípica. (16)

El fenotipo de los individuos varía, al nacimiento presentan ambigüedad genital caracterizada por falo pequeño, ausencia de la porción peneana de la uretra, hipospadias de varios grados formando una vagina en fondo de saco, escroto bífido y próstata rudimentaria. La diferenciación de los conductos de Wolff es normal, por lo que tienen vesículas seminales, epidídimo, conducto deferente y eyaculador. No existen derivados Mülllerianos. La mayoría de los casos presentan criptorquidia en canal inguinal. Generalmente se asignan como mujeres, por lo que el sexo de crianza y rol social durante la infancia es femenino. Al iniciar la pubertad se virilizan, incrementa la masa muscular, la voz se hace gruesa, los testículos descienden, la piel del escroto se pigmenta, el pene crece a dimensiones casi normales con posibilidad de tener erección y eyaculación. La espermatogénesis está disminuida, siendo el hallazgo más frecuente la oligospermia o azoospermia. El vello corporal y facial es escaso. La relación funcional de andrógenos: estrógenos se conserva, por lo que no hay ginecomastia. Las características hormonales incluyen concentraciones de testosterona (T) normales a incrementadas, disminución de las concentraciones de dihidrotestosterona (DHT), incremento en la relación DHT/T en condiciones basales y tras la estimulación con hormona gonadotropina coriónica humana (hGC). El diagnóstico de base en los hallazgos fenotípicos, las pruebas bioquímicas indicativas de disminución o ausencia de dihidrotestosterona y la secuenciación del gen *SRD5A2*(16).

### *Síndrome de insensibilidad a la acción de los andrógenos.*

El gen *AR* se localiza en Xq11-12, tiene ocho exones y codifica para una proteína de 919 aminoácidos. El exón 1 presenta dos repetidos polimórficos (CAG y GGN), que codifican trectos de poliglutamina y poliglicina de longitud variable, en la región N-terminal del receptor de andrógenos (AR). CAG varía en longitud de 8 a 35 repetidos, mientras que GGN presenta de 10 a 30 repetidos. La longitud del repetido CAG y el potencial de transactivación de AR están inversamente correlacionados. El aumento en la longitud del repetido CAG se asocia con disminución en la actividad de AR. La delección de los repetidos GGN también da como resultado una reducción de 30% en el potencial de transactivación. Lo anterior sugiere que el incremento en el número de repetidos GGN pudiera estar asociado con enfermedades relacionadas con mayor acción androgénica. Los exones 2-3 codifican el dominio de unión al ADN, mientras que la región de bisagra que une los dominios de transactivación y de unión al ADN consiste de los residuos 628 a 699. Los exones 4-8 codifican el dominio de unión al ligando.

El tipo de herencia es recesiva ligada al X, las mutaciones se heredan de una portadora en 70% de los casos, 30% ocurren *de novo*. Las diferentes mutaciones pueden dar como resultado un espectro variable como el síndrome de insensibilidad completa a la acción de los andrógenos (SICA), el síndrome de insensibilidad parcial a la acción de los andrógenos (SIPA), el síndrome de insensibilidad moderada a la acción de los andrógenos (SIMA) y la atrofia muscular espino bulbar o enfermedad de Kennedy.

En el síndrome de insensibilidad completa a la acción de los andrógenos, no existe actividad de AR, esto genera un fenotipo femenino con testículos bilaterales que funcionan de manera normal durante la vida intrauterina, produciendo concentraciones fisiológicas de T y DHT, sin embargo, la ausencia de receptores funcionales de AR en las células blanco, impide la acción biológica de ambas, inhibiendo de esta manera el desarrollo de conductos wolffianos y de genitales externos masculinos. La presencia de células de Sertoli en el testículo fetal permite la producción de hormona antimulleriana, por lo que los pacientes carecen tanto de genitales internos femeninos como masculinos. El motivo de consulta durante la infancia es la presencia de una hernia inguinal en una paciente fenotípicamente femenina. En la adolescencia o etapa adulta el motivo generalmente es amenorrea primaria en un individuo fenotípicamente femenino. Esta indicado realizar un cariotipo y de ser

46,XY realizar estudios de imagen (resonancia magnética y ultrasonido pélvico) para evaluar la presencia de genitales internos. La incidencia de gonadoblastoma es baja, motivo por lo que no se recomienda la resección quirúrgica temprana, esto permite una evolución natural del inicio de la pubertad, caracterizada por un desarrollo mamario de acuerdo a la edad, pero con escaso o ausente vello axilar y púbico. La talla es normal o discretamente aumentada, y la exploración genitourinaria muestra genitales externos normales con una vagina rudimentaria en fondo de saco. Después de la pubertad, cuando se haya alcanzado la talla final y el desarrollo mamario, es conveniente extirpar las gónadas mediante laparoscopia. El perfil hormonal se caracteriza por concentraciones elevadas de testosterona con hormona luteinizante (HL) anormalmente elevada y estradiol aumentado, producto de la aromatización periférica de la testosterona.

El síndrome de insensibilidad parcial a los andrógenos presenta grados variables de virilización en individuos 46, XY secundaria a distintos grados de actividad del AR. El espectro clínico va desde hipospadias aisladas, en casos leves, hasta ambigüedad genital grave, pudiendo acompañarse de criptorquidia. Otros datos comunes son hipospadias perineoescrotales, micropene y escroto bífido.

Los pacientes con síndrome de insensibilidad moderada a la acción de los andrógenos, son desde el punto de vista fenotípico y genotípico varones, con evidencia de defectos en la acción de los andrógenos, manifestados como oligospermia acompañada de concentraciones elevadas de testosterona e DHT. También se puede presentar ginecomastia en varones jóvenes e hipospadia leve (17).

#### *Otros TDS 46,XY*

El síndrome de Persistencia de Estructuras Müllerianas (MIM 261550) se define como la presencia de derivados de los conductos de Müller, útero y trompas de Falopio en un varón XY con virilización normal. El fenotipo externo es completamente masculino, la utertra se encuentra adecuadamente formada sin hipospadia. La ausencia de ambigüedad genital permite diferenciarlo de un cuadro de disgenesia gonadal mixta. Variantes patogénicas en el gen *AMH*, que codifica para la hormona antimülleriana y el gen *AMHRII*, del receptor tipo II de la hormona antimülleriana explican el 88% de los casos de Síndrome de Persistencia de Estructuras Müllerianas. (18)

Las hipospadias resultan de una falla en el cierre uretral en individuo masculino y afecta a 1 de cada 200-300 embarazos. Ocurre cuando se produce un evento disruptivo en el desarrollo normal del falo, y se han reportado varios genes asociados con las hipospadias aisladas como *BMP4*, *WT1*, *HOXA4*, *MAP3K1*, *MAMLD1*, *HSD3B2*, *AR* y *ATF3*. (19)

La criptorquidia, definida como la falta de descenso testicular, es el defecto congénito más frecuente en recién nacidos masculinos, con una incidencia de 2-4%, es considerada como una entidad con una etiología compleja en la cual participan tanto factores genéticos como ambientales. En el caso de criptorquidias aisladas se asocia a variantes en genes del desarrollo como *HOXD13*, *FGFR1*, genes relacionados con el descenso testicular como *INSL3* y genes relacionados con los TDS clásicos como *NR5A1* y *AR*.(20)

### **Trastornos del Desarrollo Sexual 46,XX**

Dentro de los Trastornos del Desarrollo Sexual 46,XX, la Hiperplasia Suprarrenal Congénita (MIM 201910) es el espectro de deficiencias enzimáticas en la vía de la esteroidogénesis, del cual el más frecuente es la deficiencia de 21 hidroxilasa (MIM 201910), que cursa en la etapa neonatal con ambigüedad genital e insuficiencia suprarrenal. Aparte de la deficiencia de 21 hidroxilasa, existen otras deficiencias enzimáticas las cuales pueden cursar con un cuadro clínico similar pero la enzima alterada es diferente, por ejemplo, la deficiencia de 11 beta hidroxilasa (MIM 202010) o la deficiencia de 17 hidroxilasa (MIM 202110), por lo que al descartar la más frecuente nos encontramos frente a un panorama de muchos déficits enzimáticos a veces difíciles de diferenciar (21).

### **Trastorno del Desarrollo Sexual 46, XX testicular y Trastorno del Desarrollo Sexual Ovotesticular**

Los TDS 46, XX testicular (MIM 400045) fueron descritos por primera vez por Chapelle et al en 1964, y en la actualidad ocurren en 1 de cada 20000 sujetos. (22). En el TDS testicular existe un desarrollo completo de ambas gónadas como testículos sin rastro de tejido ovárico, a diferencia de lo que ocurre en el TDS ovotesticular el cual se caracteriza por la presencia de ambos tejidos, testicular y ovárico en las gónadas de un mismo individuo (23). Los fenotipos clínicos reportados a propósito de TDS 46,XX testicular han

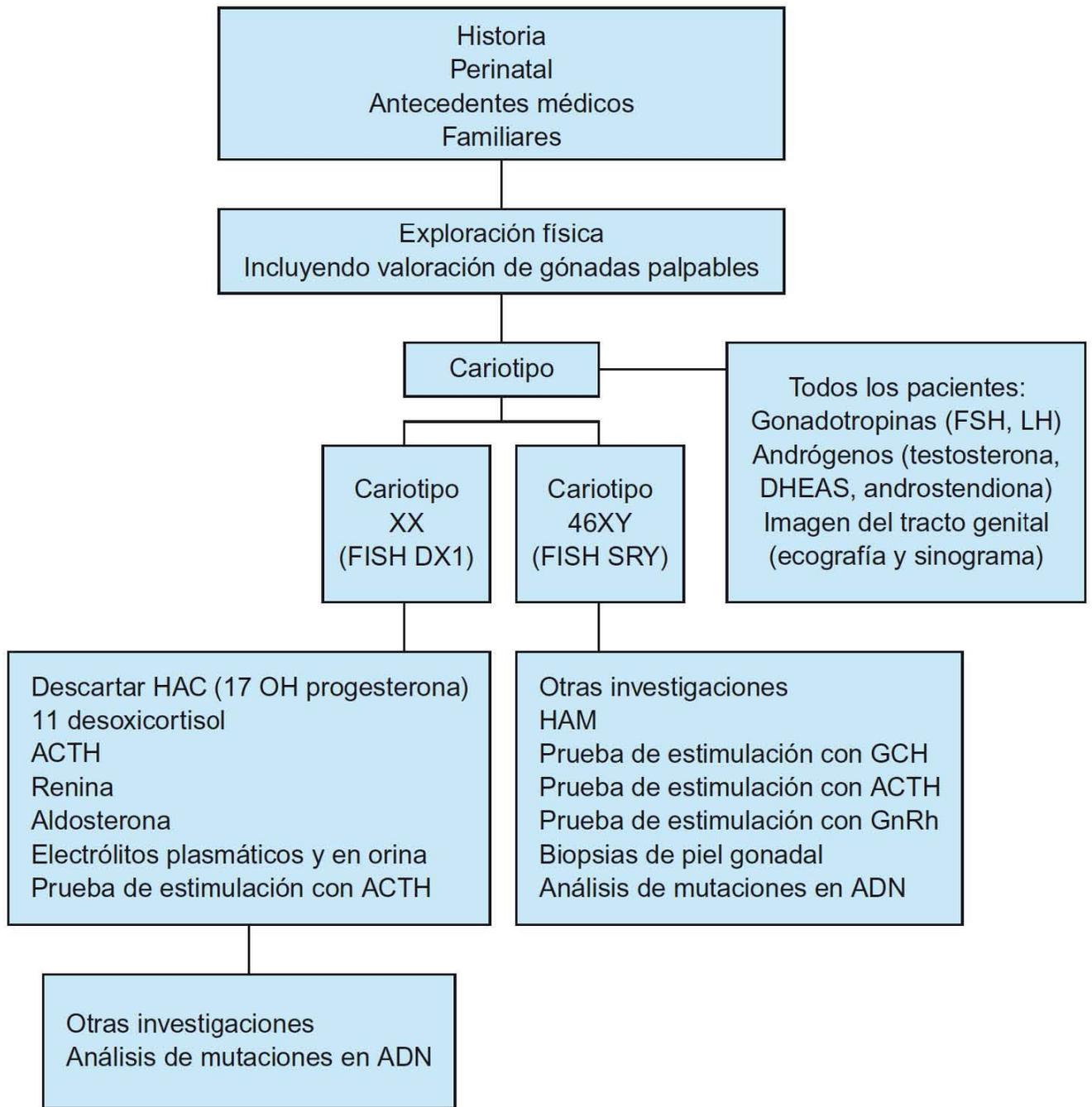
sido identificados en tres grupos que incluyen a varones con fenotipo normal, varones con ambigüedad genital y varones con hermafroditismo verdadero (24).

Aproximadamente 85% de los individuos con la forma no sindrómica de TDS 46, XX testicular presentan después de la pubertad vello púbico normal y pene de tamaño normal, pero testículos pequeños, ginecomastia e infertilidad resultado de la azoospermia. Entre los hallazgos clínicos menos frecuentes están la critorquidia e hipospadias anterior. El 15% de los individuos presentan ambigüedad genital, típicamente hipospadias penoescrotal. La historia natural de los individuos con TDS46,XX testicular, si no es tratado, es similar a las típicas consecuencias de deficiencia de testosterona: disminución en la libido y posible disfunción eréctil disminución de los caracteres sexuales secundarios, masa muscular reducida y distribución anormal del vello corporal (25).

Existen varios mecanismos patogénicos que explican la fisiopatología de el TDS 46, XX testicular: el primero indica que existe una translocación de secuencias del cromosoma Y, que incluyen al gen *SRY*, hacia un cromosoma X o un autosoma; el segundo mecanismo se produce por una mutación en genes relacionados con el desarrollo testicular, desencadenando una diferenciación testicular en masculinos XX *SRY* negativos y el tercer mecanismo ocurre por un cromosoma Y oculto limitado a un mosaico gonadal. (26)

## **ABORDAJE DIAGNÓSTICO DE LOS TRASTORNOS DEL DESARROLLO SEXUAL**

El diagnóstico de TDS implica el proceso habitual de la historia clínica, la exploración física y las investigaciones. En el siguiente algoritmo se resumen los principales pasos a seguir en el abordaje diagnóstico inicial de los TDS. (5)



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los Trastornos del Desarrollo Sexual son entidades clínicas con una frecuencia de hasta 1 en 200 nacidos vivos si tomamos en cuenta defectos como criptorquidias e hipospadias, dada su amplia variabilidad clínica, forman parte de un espectro amplio, que va desde la presencia de hipospadias, que se maneja muchas veces como un defecto congénito aislado aunque algunos están estrechamente relacionados con los TDS, ambigüedad genital, la cual también cuenta con una amplia variabilidad en cuanto a causas, hasta la presencia de fenotipos completamente opuestos al sexo cromosómico.

Actualmente se cuentan con herramientas diagnósticas que nos permiten integrar un diagnóstico molecular específico en entidades como los TDS cromosómicos, TDS 46, XY por variantes patogénicas de los genes *SRY*, *AR* y *SDR5A2*, TDS 46, XX mediante el estudio del gen *CYP21A2*. Sin embargo, el diagnóstico molecular se alcanza en aproximadamente 15% de los TDS 46, XY por disgenesia gonadal, en los TDS 46, XX testicular y TDS ovotesticular que al ser un grupo de condiciones con un gran número de genes involucrados en su fisiopatología, resulta difícil el abordaje molecular tanto por los costos que genera la secuenciación de muchos genes, como la necesidad de personal especializado para la interpretación correcta de estos estudios.

La importancia de tener un abordaje molecular adecuado en los pacientes con TDS radica en que el manejo y el pronóstico cambian sustancialmente de una mutación en un gen determinado a otra, lo que influye directamente en el contexto bio psico sexual del paciente, lo que en estas condiciones es vital para una adecuada calidad de vida.

## JUSTIFICACIÓN

Ante la baja eficiencia de los estudios moleculares en el abordaje de los Trastornos del Desarrollo Sexual debidos a disgenesia gonadal en 46,XY, TDS 46,XX testicular y TDS ovotesticular, la aplicación de las técnicas de Secuenciación de Siguiete Generación resultará una técnica aplicable de manera eficaz y eficiente en el diagnóstico molecular, como ya se ha visto en varios ámbitos de la patología genética tales cáncer hereditario, enfermedades neurogenéticas, etc.

El presente estudio se diseñó ante la necesidad de realizar un abordaje molecular de los TDS, utilizando las herramientas de Secuenciación de Siguiete Generación, las cuales han innovado el campo de la investigación en la genética molecular. El contar con la culminación diagnóstica de los TDS mediante una herramienta molecular eficiente es la base de la realización de este estudio, que dados los resultados podría impactar en el protocolo de atención de los pacientes con este diagnóstico.

Las técnicas de Secuenciación de Siguiete Generación permiten la caracterización de genes de una forma más rápida y con menor costo, a diferencia de las técnicas tradicionales (Secuenciación Sanger), las cuales son muy costosas y por logística de tiempo su utilidad en la clínica está limitada. Así las técnicas de secuenciación de siguiente generación por su factibilidad son una técnica ideal para su aplicación clínica.

## OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar variantes patogénicas asociadas a Trastornos del Desarrollo Sexual 46, XY, 46, XX y trastornos gonadales mediante técnicas moleculares específicas para cada trastorno, como Amplificación Múltiple de Sondas Ligadas (Multiple Ligation-Probe Amplification –MLPA-), Secuenciación Sanger, y secuenciación de Siguiete Generación con el protocolo de Exoma, en pacientes de la Clínica de Diferenciación Sexual del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

## OBJETIVOS PARTICULARES.

- Caracterizar variantes patogénicas con del gen *CYP21A2*, en pacientes con TDS 46, XX, para integrar el diagnóstico de Hiperplasia Suprarrenal Congénita.
- Identificar variantes patogénicas y estimar una frecuencia de variantes en los genes de la enzima 5-alfa reductasa tipo 2 y en el gen del receptor de andrógenos en la población de pacientes con TDS 46,XY, mediante secuenciación Sanger.
- Identificar variantes patogénicas en un caso familiar de TDS gonadal XX con dos individuos afectados, mediante Secuenciación de Siguiete Generación con el protocolo de Exoma, familiar.

## METODOLOGÍA

### DISEÑO DEL ESTUDIO.

Se trata de un estudio observacional, de corte transversal ya que la recolección de los datos (mutaciones en genes del desarrollo gonadal) se obtuvieron en un punto en el tiempo; descriptivo, ya que se estudiaron las diferentes mutaciones basándonos en frecuencias. Es prolectivo porque se realizó la captación de los pacientes, realización de la historia clínica y se realizó la toma de muestra de sangre periférica para estudios complementarios tanto citogenético como molecular. y se fueron registrando los datos encontrados .

### POBLACIÓN DEL ESTUDIO

Pacientes con diagnóstico clínico de Trastorno del Desarrollo Sexual que acuden a la Clínica de Diferenciación Sexual del Hospital General de México.

La muestra es por conveniencia ya que se trata de un estudio descriptivo, además es un estudio exploratorio. Se integrarán mediante el muestreo antes comentado eligiendo de forma consecutiva a cada individuo accesible con diagnóstico validado de Trastorno del Desarrollo Sexual.

### **Criterios de Inclusión**

- Pacientes del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”, que cuenten con el diagnóstico clínico de Trastorno del Desarrollo Sexual con o sin ambigüedad genital.
- Pacientes que cuenten con cariotipo normal: 46, XX ó 46, XY.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado.

### **Criterios de Exclusión**

- Pacientes que presenten mutaciones ya conocidas.
- Pacientes portadores de rearreglos cromosómicos.
- Pacientes con síndromes polimalformativos.

## **Procedimiento.**

1. Se recabó información sobre pacientes que recibieron consulta de Genética en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.
2. Se estableció contacto por primera vez con estos pacientes mediante la consulta en el servicio de Genética, se realizó árbol genealógico para evaluar la presencia de familiares afectados como parte de la realización del expediente clínico, además se realizó una ficha de criterios clínicos, la cual cuenta con datos relevantes para el diagnóstico clínico.
3. El grupo de genetistas que forma parte de la clínica de Diferenciación Sexual, valoró a los pacientes mediante la exploración física para determinar el cumplimiento de criterios clínicos compatibles con trastorno del desarrollo sexual.
4. A los pacientes que aceptaron ser parte del protocolo, se les explicó las bases del estudio de investigación y se les otorgó el documento de consentimiento informado para su lectura y la aclaración de las dudas que se presentaran.
5. Una vez firmado el Consentimiento Informado, se procede a la toma de muestra de 10 ml de sangre periférica.
6. A los pacientes menores de edad, el estudio también involucró a los padres para analizar el estado de portadores.
7. Realización de cariotipo de sangre periférica.
8. En pacientes que cuenten con alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales fueron excluidos del estudio.
9. Extracción de ADN para iniciar protocolo molecular.
10. Es estudio estará dividido en tres etapas con diferente abordaje
11. En la primera etapa, en pacientes con complemento cromosómico 46, XX, con datos clínicos de sobrevirilización se realizó estudio molecular del gen *CYP21A2* mediante Secuenciación Sanger y Amplificación Múltiple de Sondas Ligadas (MLPA).
12. En pacientes con complemento cromosómico 46,XY, con datos clínicos positivos para trastorno del desarrollo sexual fenotípico (Insensibilidad a Andrógenos y

Deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2), se realizó estudio molecular de ambos genes (*AR* y *SRD5A2*) mediante la técnica de Secuenciación Sanger.

- 13.** Como complemento se realizó análisis de secuencias del cromosoma Y, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- 14.** Se seleccionó un caso familiar de DSD 46,XX gonadal para el protocolo de secuenciación Exoma, donde se realizó el análisis de los pacientes afectados y de ambos padres, para identificar variantes patogénicas hereditarias.
- 15.** Utilizando paquetes de software bioinformático se hará un análisis de los datos obtenidos de la secuenciación masiva, para filtrar las diferentes variantes encontradas y poder clasificarlas como patogénicas, polimorfismos o variantes de significado incierto.

## MÉTODOS Y TÉCNICAS.

### 1. CARIOTIPO DE SANGRE PERIFÉRICA.

Se realizó estudio de cariotipo de sangre periférica con bandeo GTG, con la técnica estándar con un nivel de resolución de 450 bandas.

### 2. EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizó un kit comercial para la extracción de ADN, de la marca Qiagen. El proceso se realizó siguiendo las instrucciones comerciales del kit.

- Se colocaron 300ul de sangre periférica en un tubo con 900 ul de solución de lisis para glóbulos rojos, se mezcló e incubó durante un minuto a temperatura ambiente.
- Se centrifugó durante 20 segundos a 13000 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y se agitó en el vórtex para resuspender el botón.
- Se agregó 300 ul de solución de lisis celular y se resuspendió mediante pipeta hasta obtener una solución homogénea.
- Se agregó 100 ul de solución de precipitación de proteínas, se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos y se centrifugó a 13000 rpm durante un minuto.
- El sobrenadante restante se transfirió a un tubo con 300 ul de isopropanol, se mezcló por inversión durante 50 segundos y posteriormente se centrifugó durante un minuto a 13000 rpm.
- Se decantó el isopropanol, se agregaron 300 ul de etanol al 70%, se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto y se decantó el etanol.
- Posteriormente se colocaron los tubos de un desecador a velocidad media durante 15 minutos.
- El DNA obtenido se resuspendió en 50 ul de solución de hidratación y se incubó durante 1 hora a 60°C.
- Finalmente se cuantificó mediante espectrofotometría y se evaluó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### 3. AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS LIGADAS (MLPA).

- Reactivos.
  - Buffer para MLPA.
  - SALSA MLPA
  - Ligasa buffer.
  - Ligasa 65
  - SALSA PCR primer mix.
  - SALSA polimerasa.
  - Formamida
  - Agua destilada
- Descripción de las sondas utilizadas.
  - SALSA MLPA probemix P050-B3 CAH

Diseñada para detectar deleciones/duplicaciones de uno o más exones de genes cuyas sondas mencionaremos a continuación:

    - Contiene cinco sondas para el gen *CYP21A2* (exones 1, 3,4,6 y 8).
    - Contiene sondas para las siguientes mutaciones en el mismo gen: deleción de 8pb, cluster E6, I172N y Q318.
    - Contiene tres sondas específicas para el *CYP21A1P*.
    - Tres sondas para al gen *TNXB*.
    - Una sonda para en gen *C4A*.
    - Una sonda para el gen *C4B*.
    - Una sonda para el gen *ATF6B*.
    - Dos sondas localizadas en 6p21.3.
    - Una sonda específica del cromosoma Y (*UTY*).
    - Diez y seis sondas de referencia.
- Protocolo para una reacción de MLPA
  - Desnaturalización del ADN (1 día)
    1. 5uL de ADN (20ng/uL) en tiras de PCR (alternativamente en placa de 48 para un total de 100 ng de reacción).
    2. Desnaturalizar a 98°C/ 5 minutos y enfriar a 25°C.

- Hibridación del ADN (día 1)
  1. Homogeneizar por vortexeo las soluciones “MLPA probemix” y “MLPA buffer.
  2. Preparar en MMH (Master Mix de Hibridación):
  3. Homogeneizar el MMH por vortexeo.
  4. Tomar 3 uL de MMH para adicionar a cada una de las muestras desnaturalizadas.
  5. Someter a una incubación a 95°C/1 min y luego a 60°C/16-20 horas.
- Reacción de ligación (día 2)
  1. Homogeneizar los dos buffers de ligasa .
  2. Preparar el MML (Master Mix de Ligación).
  3. Homogeneizar suavemente el MML por pipeteo.
  4. Después de la incubación de las muestras a 60°C por el tiempo antes indicado, incubar a 54°C, al alcanzar esta temperatura añadir a cada una 32uL de MML y mezclar por pipeteo.
  5. Continuar la incubación a 54°C por 15 minutos, luego inactivar la enzima a 98°C por 5 minutos y detener la reacción a 20°C. Guardar los tubos a 4°C (máximo dejarlos así hasta una semana).
- Reacción de PCR (día 2)
  1. Homogeneizar el SALSA PCR primer mix por mezcla.
  2. Precalentar en las manos a la polimerasa durante 10 minutos.
  3. Preparar el MMP (Master Mix PCR).
  4. Homogeneizar el MMP suavemente por pipeteo (mantener el hielo hasta su uso).
  5. A temperatura ambiente tomar 10 uL de MMP y añadirlos a cada una de las muestras ligadas. Mezclar por pipeteo suave.
  6. Correr el siguiente programa de PCR: (95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos)\* 35 ciclos; 72°C por 20 minutos y 15 °C por tiempo indefinido

7. Cubrir las reacciones con papel aluminio o meterlos en una caja oscura, guardar a 4°C hasta una semana o a -20°C por más tiempo.
- Electroforesis capilar (día 3)
    1. Preparar el MC (Mix de Corrida)
    2. Homogeneizar el MC por pipeteo.
    3. Colocar en tubos de PCR 15uL de MC y añadir 1uL de muestra, tomados con punta filtro. Homogeneizar por pipeteo.
    4. Desnaturalizar a 95°C la muestra total (16uL) durante 5 minutos y al terminar colocar inmediatamente en la placa congelada.
    5. Agregar el contenido desnaturalizado en cada tubo a un pozo de la placa de electroforesis.
    6. Correr las muestras en electroforesis capilar bajo las siguientes condiciones: temperatura del capilar 50°C por 120 segundos; voltaje de inyección de 1.6 kv, tiempo de inyección 30 segundos; tiempo de corrida 60 minutos a 4.8kv.

#### 4. AMPLIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN DE GENES *AR Y SRD5A2*.

Se realizó Secuenciación de acuerdo al protocolo estándar de la técnica que se utiliza rutinariamente, posteriormente se realizó la amplificación de los productos de secuenciación como se describe a continuación.

##### **Análisis por PCR**

Se analizaron los 5 exones y las uniones exón-intrón del gen de la 5 alfa reductasa. La amplificación del DNA se realizó a través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Lo mismo se realizó para analizar los exones 2 al 8 del receptor de andrógenos. Los reactivos necesarios para realizar esta reacción se observan en la tabla.



Productos amplificados por PCR

Exón	Oligonucleótido	Temp. de alineamiento	Fragmento amplificado
Exón 1	5'-GCCGCGCTCTCTTCTGGGAG-3' 5'-AGTGCCTGCACTGGGCGCC-3'	60 °C	371 pb
Exón 2	5'-AACAGTGAATCCTAACCTTTCCTCCC-3' 5'-TTGTTAGCTGGGAAGTAGGTGAGAAG-3'	60 °C	245 pb
Exón 3	5'-TGTGAAAAAGCACCACAATCTGGA-3' 5'-GCTCCAGGGAAGAGTGAGAGTCTGG-3'	60 °C	212 pb
Exón 4	5'-TGCAATGATTGACCTTCCGATTCTTC-3' 5'-TGTTTGGAGAAGAAGAAAGCTACGTG-3'	60 °C	241 pb
Exón 5	5'-TCAGCCACTGCTCCATTATATTAC-3' 5'-TTGACAGTTTTTCATCAGCATTGTGG-3'	60 °C	170 pb

Productos amplificados por PCR

Exón	Oligonucleótido	Temp. de alineamiento	Fragmento amplificado
Exón 2	5'-TTCAGTGACATGTGTTGCATTGG-3' 5'-GGTTAGTGTCTCTCTCTGGAAG-3'	65 °C	262 pb
Exón 3	5'-GTTTGGTGCCATACTCTGTCCAC-3' 5'-TCTGGTCTAAAGAGAGACTAG-3'	60 °C	300 pb
Exón 4	5'-CCACTGATGATAAATTCAAGTCTCTC-3' 5'-CTAAATATGATCCCCCTTATC-3'	60 °C	376 pb
Exón 5	5'-CCAACAGGGAGTCAGACTTAGC-3' 5'-AGGTCTGGCCAAGCTGCCTG-3'	65 °C	277 pb
Exón 6	5'-CCCTCATTCCTTTTTCTCTG-3' 5'-GGCATTCCCTGCACTTCTAG-3'	62 °C	195 pb
Exón 7	5'-TCTAATGCTCCTTCGTGGGC-3' 5'-CAGGGAGAACAGCCTGATAGAG-3'	65 °C	265 pb
Exón 8	5'-GAGGCCACCTCCTTGTC AAC-3' 5'-CAGATGTCTTCTGCCTGTTATAACT-3'	65 °C	277 pb

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%. Las bandas que se observaron en el peso esperado, se cortaron para preparar la reacción de secuencia.

#### Extracción de DNA del gel

Se cortó el gel obtenido del PCR, se pesó y se le agregaron 30  $\mu$ l de buffer L1 por cada 10 mg de gel. Se agitó y se incubó a 50°C por 15 minutos (se mezcló cada 3 minutos). Se colocó un cartucho de carga dentro de un tubo colector de 2 ml. La muestra se colocó dentro de este cartucho y se centrifugó a 10,000g por 1 minuto. Se eliminó el filtrado y se agregaron 500  $\mu$ l de buffer solubilizador de gel L1 en el cartucho. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y después se centrifugó a temperatura ambiente a 10,000 g por 1 minuto. Se eliminó nuevamente el filtrado y se realizó el lavado del cartucho se agregaron 700  $\mu$ l de buffer de lavado L2 se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último se centrifugó a 10,000g por 1 minuto, se eliminó el filtrado y se centrifugó por 1 minuto nuevamente para eliminar el buffer residual. Para la elución del DNA se colocó el cartucho dentro de un tubo de 1.5 ml, se adicionaron 50  $\mu$ l de TE buffer en el centro de éste, se incubó un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000g por 2 minutos.

#### PCR de secuencia

Se utilizó el DNA extraído en el paso anterior y se mezcló con uno de los oligos y con el reactivo Big Dye (Applied Biosystems). El programa de amplificación que se utilizó es el siguiente :

#### Programa de PCR de secuencia

96 °C	1 minuto
96 °C	30 segundos
50 °C	15 segundos
60 °C	3 minutos

## Paso por columna

Se colocaron 2 tubos, cada uno con un oligo diluido (1mM). Para la hidratación de las columnas, éstas se lavaron con agua destilada y se agregaron 0.06 gr de sephadex una vez que ya están secas y limpias. Se agregaron 800 µl de agua destilada y se hidratan por 2 horas. Se colocaron en tubos de 2 ml y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 3 minutos para eliminar el exceso de agua. La columna se colocó en tubos de 500 µl, se agregó el producto de PCR (obtenido del paso anterior) sin tocar el sephadex y se centrifugó a 3,000 rpm por 3 minutos. Se dejó secar el producto en el desecador y se resuspendió en 20 µl de Formamida para la secuenciación del producto de DNA secuencia específica.

## 5. PROTOCOLO DE SECUENCIACIÓN EXOMA.

- Construcción de las bibliotecas genómicas.

Cada muestra se preparó de acuerdo a los protocolos de Illumina. En resumen, se fragmentó un microgramo de DNA genómico mediante nebulización, el DNA fragmentado es reparado colocando en su extremo 3' una adenina, los adaptadores de Illumina se ligan a los fragmentos y se seleccionó un tamaño de 350-400 pares de base. El producto del tamaño seleccionado es amplificado por PCR y el producto final es validado utilizando el Agilent Bioanalyzer.

Antes de la primera reacción de hibridación, las diferentes bibliotecas se combinan con diferentes índices dentro de un grupo específico, esto previo al enriquecimiento. Las librerías agrupadas se mezclan con las sondas de las regiones diana. El tiempo de hibridación recomendado asegura que las sondas se ligen a las regiones diana.

Las perlas de estreptavidina se utilizan para la captura de sondas que contienen las regiones diana. Se realizaron tres etapas de lavados para eliminar la unión no específica de las perlas. La librería enriquecida es posteriormente eluida de las perlas y preparada para la segunda hibridación.

La primera elución de la librería de DNA se mezcla con las sondas de captura de las regiones diana, esta segunda hibridación tiene como propósito asegurar que las

regiones dianas sean adicionalmente enriquecidas. Se realiza un segundo lavado, similar al primero.

Se utiliza la PCR para amplificar el DNA enriquecido para su secuenciación.

Los procedimientos de Axseq Technologies fueron realizados para el análisis de control de calidad de las bibliotecas de la muestra y cuantificación de las plantillas de DNA de la bibliotecas.

- Formación de Clusters y Secuenciación.

Illumina utiliza una única reacción de amplificación que ocurre en la superficie de la célula de flujo. Una célula de flujo contiene millones de clusters únicos que son cargados al HiSeq 2000 para ciclos automatizados de extensión e imagen.

La Secuenciación de Solexa por síntesis utiliza cuatro nucleótidos de propiedad que contienen fluoróforo reversible y propiedades de terminación. Cada ciclo de secuenciación ocurre en presencia de los cuatro nucleótidos que conduce a una mayor precisión que los métodos en los que existe un solo nucleótido por cada mezcla. Este ciclo se repite, una base a la vez, generando una serie de imágenes cada una representando una única extensión de base en un grupo específico.

Número de genes diana	20794
Número de exones diana	201121
Tamaño de regiones diana	62 Mb
Número de sondas	340427
Porcentaje de cobertura de exones codificantes	96.4%
Tamaño recomendado de la biblioteca insertada	300-400pb

## 6. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.

El diseño del exoma cubre 51 Mb del genoma humano correspondiente a los exones y regiones intrónicas flanqueantes de 20766 genes en la secuencia de referencia humana (hg19/GRCh37, publicada en febrero de 2009).

Posteriormente aproximadamente 63 millones de lecturas de tamaño promedio de 107 pb por muestra se nos enviaron en dos archivos FASTQ (un archivo por orientación). Cada par de archivos FASTQ se alinearon con el genoma humano (hg19) usando

Novoalign (<http://www.novocraft.com>). Todos los parámetros se mantuvieron en la configuración redeterminada, como recomienda Novocraft.

Se empleó SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) (Li et al., 2009) para ordenar los archivos SAM, crear archivos BAM y generar sus archivos de índice.

Se usó Picard (<http://picard.sourceforge.net/>) para eliminar todos los PCR duplicados de los archivos BAM.

El Genome Analysis Toolkit (GATK) (McKenna et al, 2010) se usó para realineamientos locales, de la base de calidad y variantes. Los parámetros se ajustaron como se describe en GATK's Bests Practice v3.

GATK generó archivos llamados variantes estándar (VCF <http://www.1000genomes.org/wiki/Analysis/Variant%20Call%20Format/vcf-variant-call-format-version-41>). Los archivos VCF fueron anotados usando snpEff ([snpeff.sourceforge.net](http://snpeff.sourceforge.net)) (Cingolani et al., 2012) y ANNOVAR (Wang et al., 2010).

A partir de este punto nuestro análisis se centró sólo en las variantes codificantes no sinónimas putativas. Se eliminaron lo que se conoce como falsos positivos por medio de un filtro el cual verifica que cada variante cumpla con una calidad de mapeo  $>30$ , una calidad de base  $>20$  y una cobertura  $\geq 10$  y la presencia de las variantes en lecturas de ambas orientaciones.

Las variantes comunes se eliminaron utilizando la información de los alelos de frecuencia de la NHLBI ESP (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>).

Una variante común se definió como variante presente en el ESP con una frecuencia alélica menor de más del 1%. Cada variante se anotó como posible efecto funcional en la proteína usando tres predictores de efectos variantes: SIFT (Kumar et al., 2009). PolyPhen-2 (predicción de efectos funcionales de nsSNPs humanos, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) (Adzhubei et al., 2010) y Mutation Taster ([www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org)) (Schwarz 2010).

Un segundo análisis se limitó a aquellas variantes que pudieran tener un efecto en la secuencia de codificación de proteínas, incluyendo cambios de codón no sinónimas, variantes de cambio en el marco de lectura, variantes e el sitio de empalme y deleciones e inserciones.

Adicionalmente se aplicó filtros para considerar algunos potenciales patrones de herencia:

- De novo. Variante nueva presente en el paciente pero en ninguno de los padres.
- Homocigoto (recesivo). Variante candidata única presente en ambos alelos en el paciente y en al menos uno de los alelos en cada uno de los padres.
- Heterocigoto compuesto. Dos o más variantes candidatas en un solo gen con al menos una variante candidata única presente en cada uno de los padres.
- Ligada al X en pacientes masculinos. Variante candidata heredada por vía materna en el cromosoma X.

#### 7. CONFIRMACIÓN DE LAS MUTACIONES POR MEDIO DE SECUENCIACIÓN SANGER.

Las variantes candidatas observadas vía SEC fueron confirmadas usando la técnica de Secuenciación tipo Sanger para validar cada mutación probablemente deletérea y para confirmar su presencia en estado homocigoto, heterocigoto compuesto o digénico (según sea el caso) en cada paciente afectado así como el estado heterocigoto en los padres y hermanos no afectados; además en 100 controles sanos.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización del presente trabajo se hará uso de modelos de estadística descriptiva, tomando en cuenta las frecuencias alélicas y genotípicas de las mutaciones y polimorfismos encontrados en la secuenciación.

Para los resultados de la secuenciación exoma, se aplicó filtración discreta la cual consiste en buscar variantes en un mismo gen en los pacientes afectados y descartar variantes normales por comparación con bases de datos como dbSNP y 1000 genomas.

A través de programas computacionales PolyPhen-2 y Mutation Tester se predijo la patogenicidad de la mutación candidata y con SIFT, un software empleado para calcular el o los posibles cambios en la estructura de la proteína con base en el grado de conservación de los residuos de aminoácidos en las alineaciones de secuencias derivadas de secuencias estrechamente relacionadas.

Se busco información sobre la función de lo genes candidatos.

## ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD.

Dentro de los procedimientos del presente protocolo, este proyecto está dentro de la categoría de riesgo menor al mínimo, ya que solo se realizará la toma de muestra de sangre.

## RESULTADOS.

Se reclutaron un total de 99 pacientes con diagnóstico clínico de Trastorno del Desarrollo Sexual, incluidos tanto fenotipos gonadales como fenotípicos.

A todos los pacientes incluidos el estudio citogenético de cariotipo en sangre periférica mostró un complemento cromosómico 46,XX en 44 pacientes (44.5%), el restante 55.5% mostró un complemento 46, XY.

A los individuos con complemento 46,XX se les clasificó en gonadales y fenotípicos, dando como resultado que un 2.3% (n=1) se colocaba dentro de los fenotipos gonadales y el restante 97 % (43 individuos) dentro de los fenotípicos.

Los individuos con complemento 46,XY, mostraron un patrón similar ya que la gran mayoría un 92.7% (n=51) mostraron un cuadro clínico compatible con trastorno fenotípico y el restante 7.3% ( 4 individuos ) con un fenotipo gonadal. (Tabla 1.)

TDS	46,XX	46,XY	TOTAL
GONADAL	1	4	5
FENOTÍPICO	43	51	94

Tabla 1. Distribución del total de pacientes en base a fenotipo y estudio citogenético.

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON TDS 46,XX FENOTÍPICO.

### 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA MUESTRA.

Se incluyeron un total de 43 pacientes con diagnóstico clínico de Trastorno del Desarrollo Sexual 46,XX fenotípico, a los cuales se les realizó estudio de MLPA y de forma complementaria Secuenciación Sanger del gen *CYP21A2*, responsable del 95% de los casos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC).

Del total de los pacientes incluidos, el 25.58% fueron del sexo de asignación masculino (n=11) y el 74.41% con sexo de asignación femenino (n=32).

El árbol genealógico mostró solamente un caso familiar con dos afectados con características clínicas compatibles con HSC clásica, hermanos, ambos con la forma virilizante simple, sin embargo no fue posible el estudio del individuo III-1 ni de los padres. Figura 1.

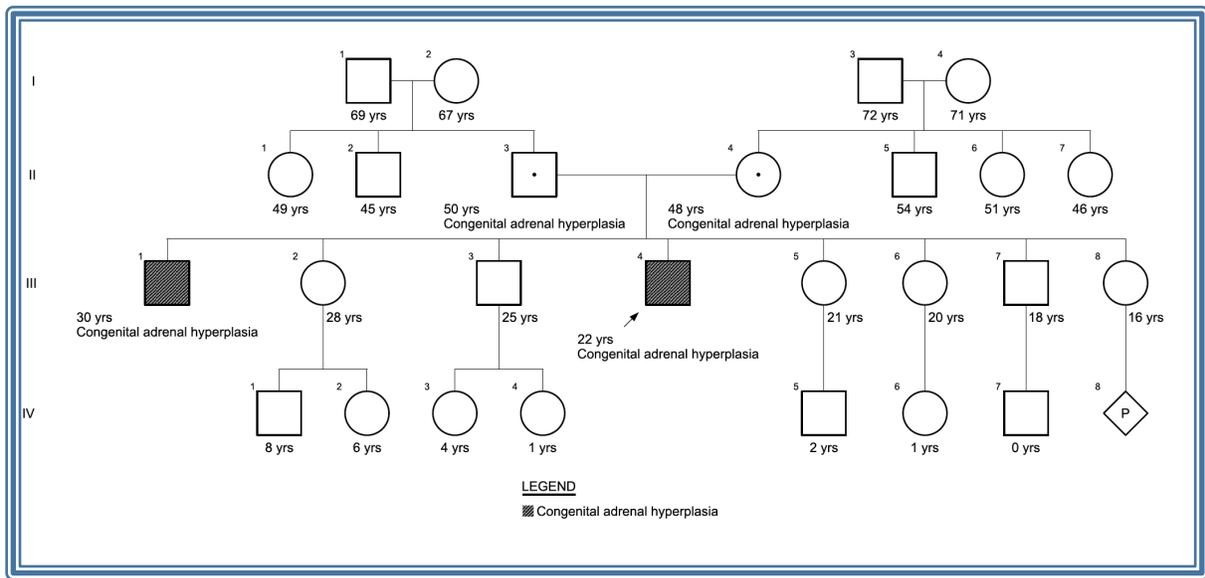


Figura 1. Árbol genealógico de familia con dos afectados.

## 2. HALLAZGOS CLÍNICOS

Del total de los pacientes con diagnóstico clínico, la Hiperplasia Suprarrenal Congénita Clásica se presentó en el 16.28% de los casos (n = 7) y el 83.72% (n = 36) presentó características clínicas de Hiperplasia Suprarrenal Congénita no clásica .

Los datos clínicos predominantes en pacientes con diagnóstico de HSC clásica son la ambigüedad genital, crisis hiponatémicas y talla baja. Es importante recalcar el amplio espectro de edades de los pacientes, por lo que las características clínicas presentan amplia variabilidad clínica (Tabla 2).

Tabla 2. Formas clínicas y datos clínicos relevantes en pacientes con diagnóstico de HSC clásica

PACIENTE	TIPO DE HSC	EDAD	SEXO DE ASIGNACIÓN	DATOS CLÍNICOS OBJETIVOS
1.	Forma perdedora de sal.	21 días.	Femenino	Ambigüedad genital Prader III, crisis hiponatémicas, insuficiencia suprarrenal.
2.	Forma perdedora de sal.	6 meses	Femenino	Ambigüedad genital Prader III, crisis hiponatémicas, insuficiencia suprarrenal.
3.	Forma virilizante simple	22 años	Masculino	Hipospadias penoescrotal, talla baja proporcionada, presencia de estructuras müllerianas.
4.	Forma perdedora de sal	4 meses	Femenino	Ambigüedad genital, crisis hiponatémica severa,
5	Forma virilizante simple	12 años	Femenino	Pubertad precoz, ambigüedad genital Prader II, hirsutismo..
6.	Forma virilizante simple	3 años	Femenino	Hipertrofia de clítoris.
7.	Forma virilizante simple	8 años	Masculino	Pubertad precoz, hiperpigmentación de genitales.

### 3. ESTUDIO MOLECULAR MEDIANTE AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS LIGADAS (MLPA) Y SECUENCIACIÓN

Se realizó estudio molecular con la técnica de MLPA, los resultados fueron positivos para alteraciones del gen *CYP21A2* en 4 de 43 pacientes, resultado que se confirmó al repetir nuevamente el estudio. Tabla 3.

Tabla 3. Estudio de MLPA en pacientes con diagnóstico clínico de HSC clásica.

PACIENTE	TIPO DE HSC	RESULTADO DEL MLPA
1.	Forma perdedora de sal.	rsa 6p21(CYP21A2exons4-8)del
2.	Forma perdedora de sal.	I172N
3.	Forma virilizante simple	E3Δ8bp/E6
4.	Forma perdedora de sal	I172N/dup E3
5	Forma virilizante simple	Patrón normal
6.	Forma virilizante simple	Patrón normal
7.	Forma virilizante simple	Patrón normal

En todos los casos negativos al estudio por MLPA se realizó Secuenciación Sanger. Los resultados obtenidos mostraron mutaciones puntuales homocigotas en siete individuos, (16.27%) y 26 polimorfismos previamente reportados del gen *CYP21A2*, (60.24%), en el resto de los casos no se observó ningún cambio. Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de Secuenciación Sanger en pacientes con HSC clásica negativos para MLPA y pacientes con HSC no clásica.

TIPO DE VARIANTE	HSC CLÁSICA	HSC NO CLÁSICA
<b>PATOGENICA</b>	2	0
<b>SNP</b>	1	29
<b>SIN VARIANTE</b>	0	7
<b>Total</b>	3	36

De los casos positivos para alteraciones del gen mediante MLPA, con deleciones y duplicaciones todos presentaron un fenotipo severo de la enfermedad principalmente con déficit de aldosterona y ambigüedad genital.

En caso 1 se pudo realizar el estudio de MLPA y Secuenciación Sanger a los padres del individuo afectado, se pudo identificar el estado de heterocigoto en los padres, deleción del exón 4 al 8 en la madre, detectado por MLPA y el padre con una mutación puntual en el intrón 2 (IVS2AS, A/C-G, -13) identificada mediante Secuenciación Sanger, determinando de esta forma el estado de heterocigoto compuesto en el paciente. Figuras 2,3,4 y5.

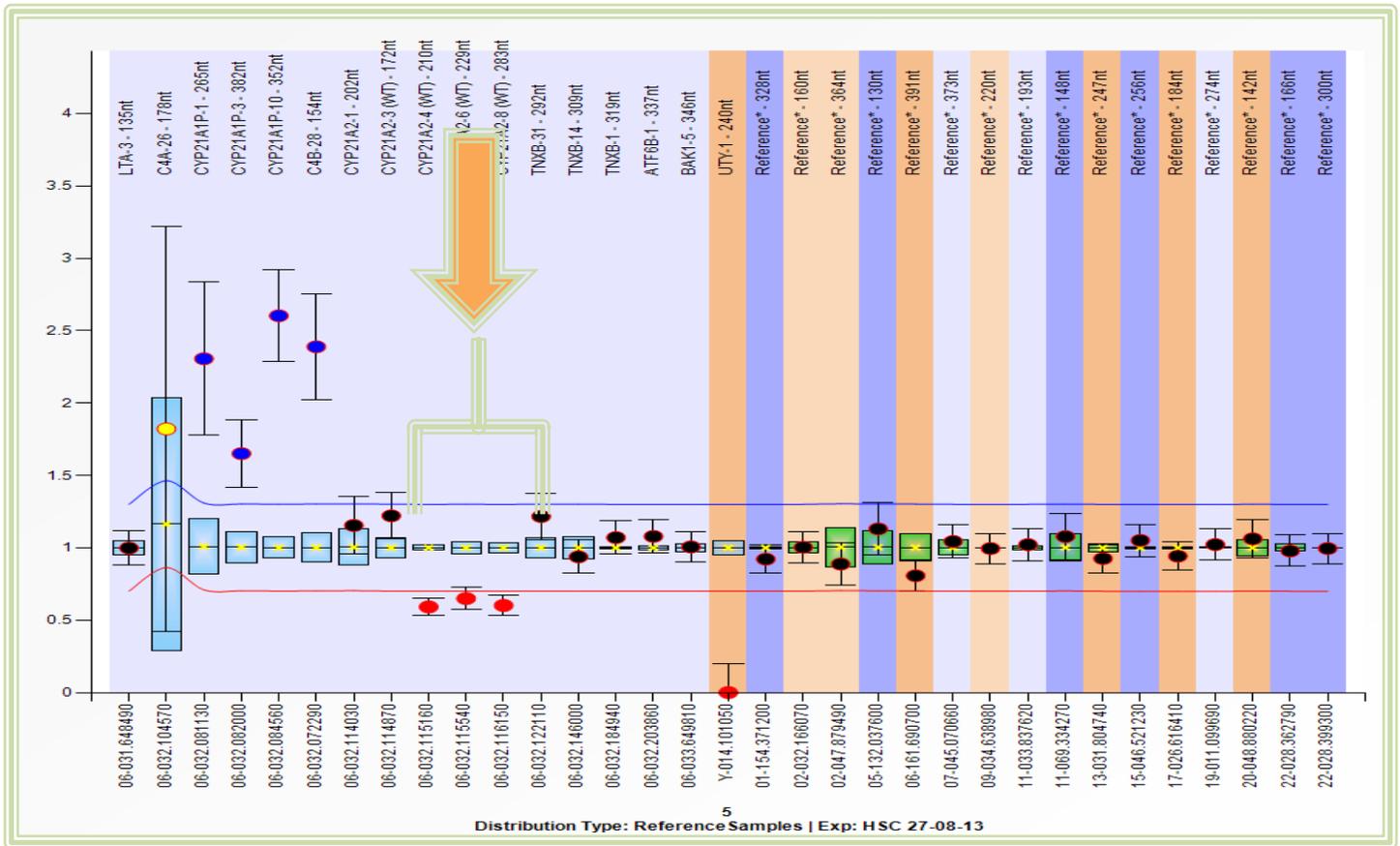


Figura 2. Gráfica del patrón de *CYP21A2* en caso índice, obsérvese en la flecha la deleción de las tres regiones correspondientes a los exones 4, 6 y 8.

Figura 3. Gráfica del patrón de *CYP21A2* en madre del caso índice, obsérvese en la flecha la delección de las tres regiones correspondientes a los exones 4, 6 y 8, idéntica a la del probando..

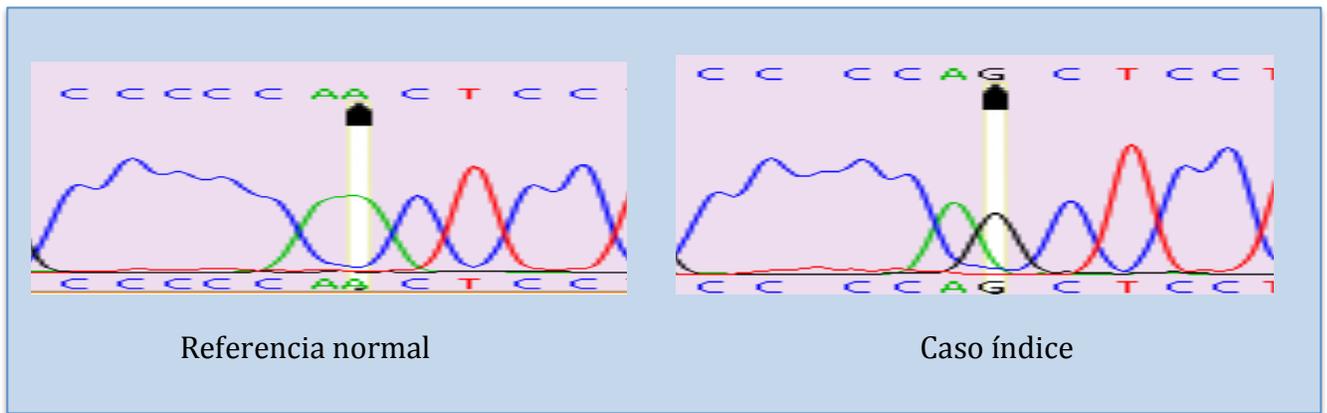
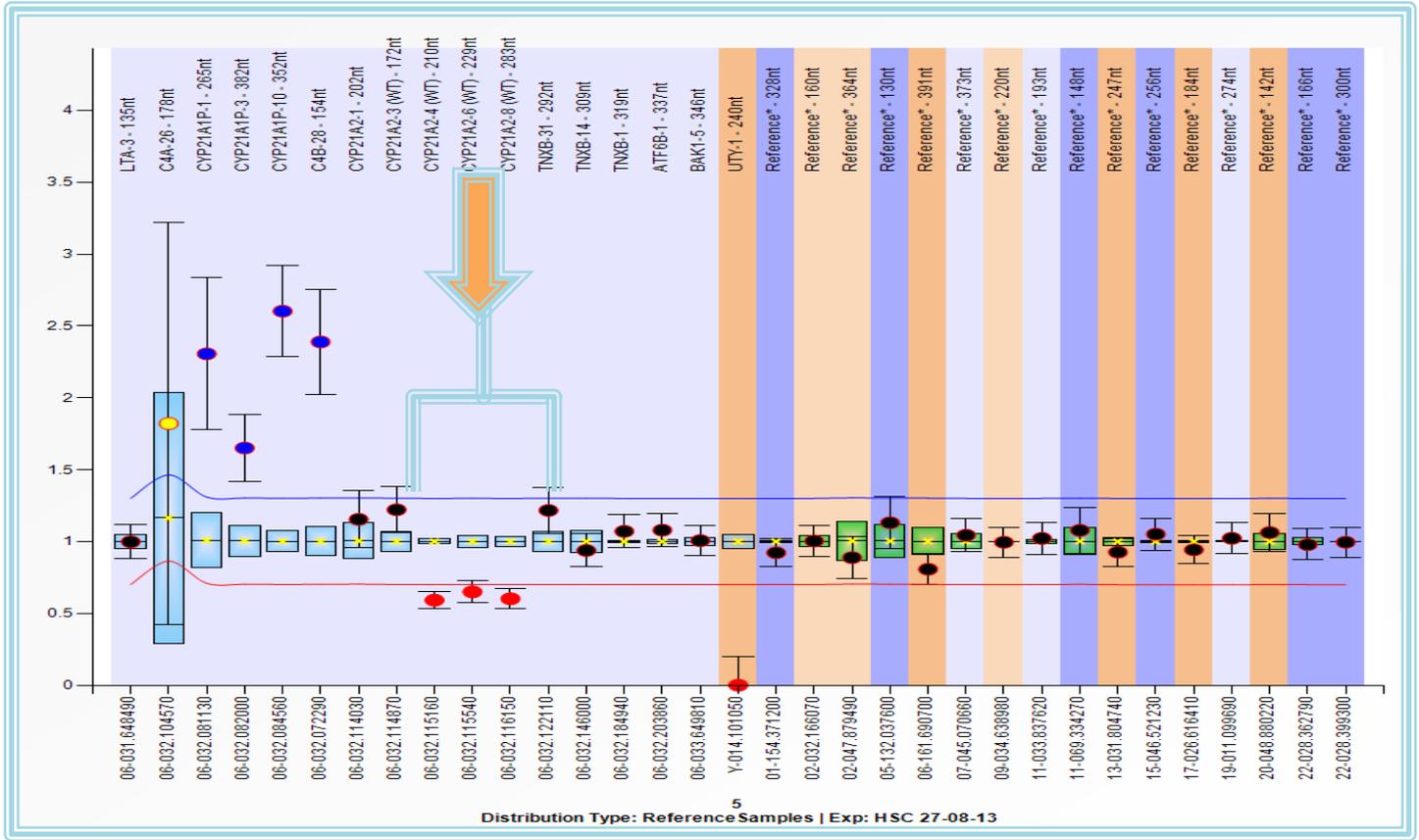


Figura 4. Electroferograma de Secuenciación Sanger del gen *CYP21A2* del caso índice, mutación intrónica en la cual hay una sustitución heterocigota de A por G (rs6467).

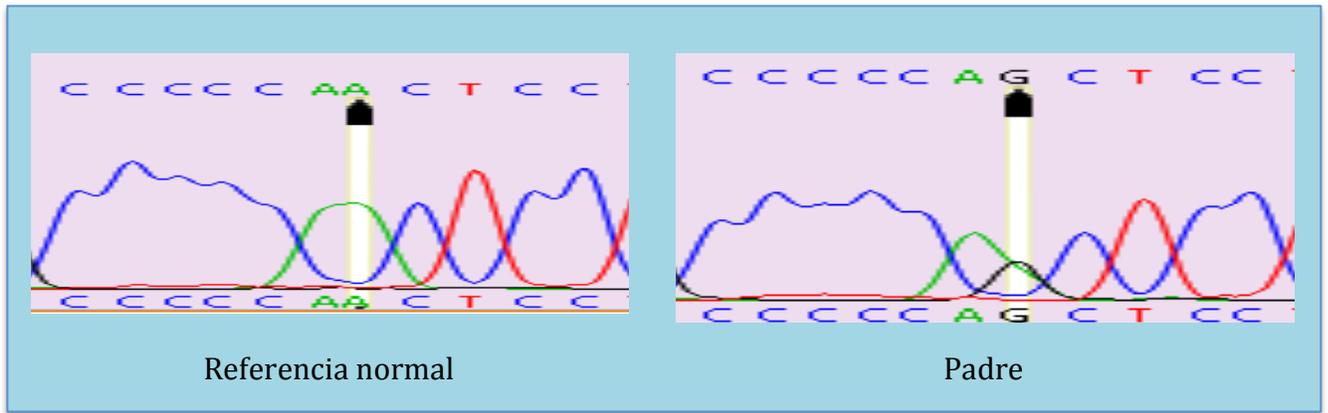


Figura 5. Electroferograma del patrón de Secuenciación Sanger del gen *CYP21A2* del padre del caso índice, se observa mutación intrónica en la cual hay una sustitución heterocigota de A por G (rs6467), idéntica a la del probando.

En la Figura 6 y 7 se muestra el electroferograma de uno de los pacientes positivo para dos deleciones detectadas mediante MLPA, en el cual no fue necesario algún estudio complementario.

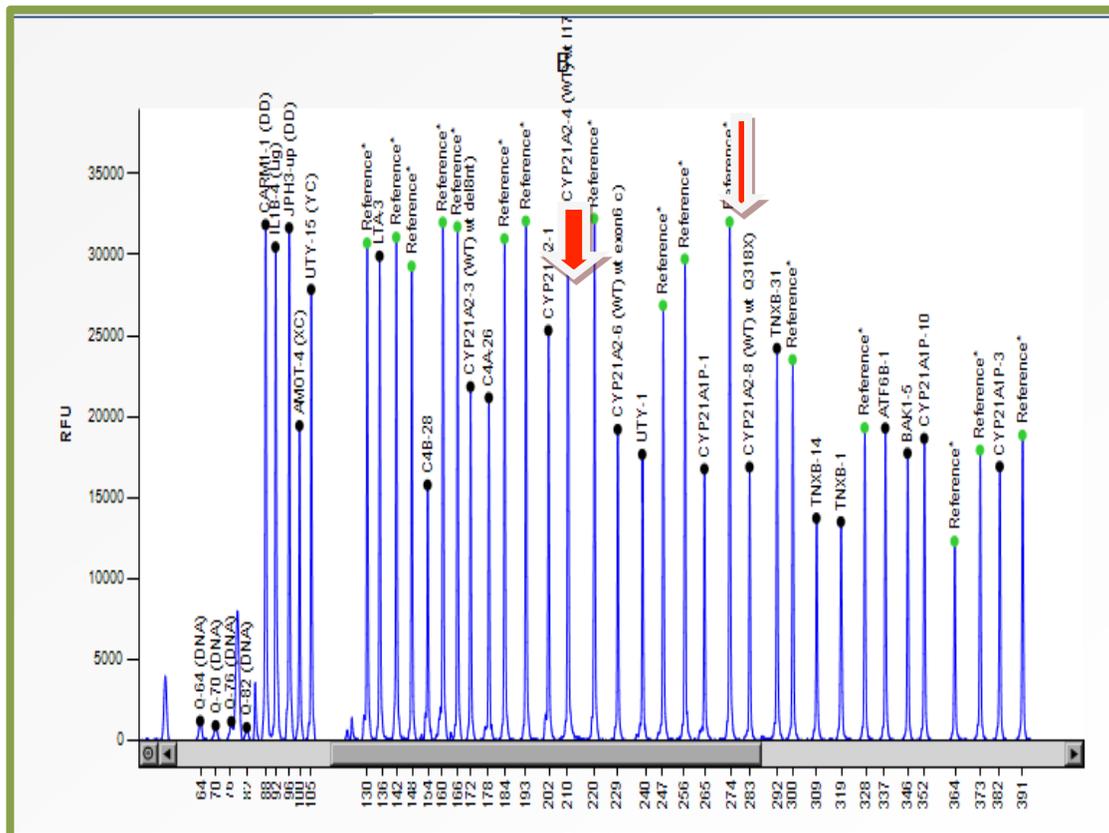


Figura 6. Electroferograma que muestra la fluorescencia de las sondas que reconocen regiones específicas en una muestra de referencia normal.

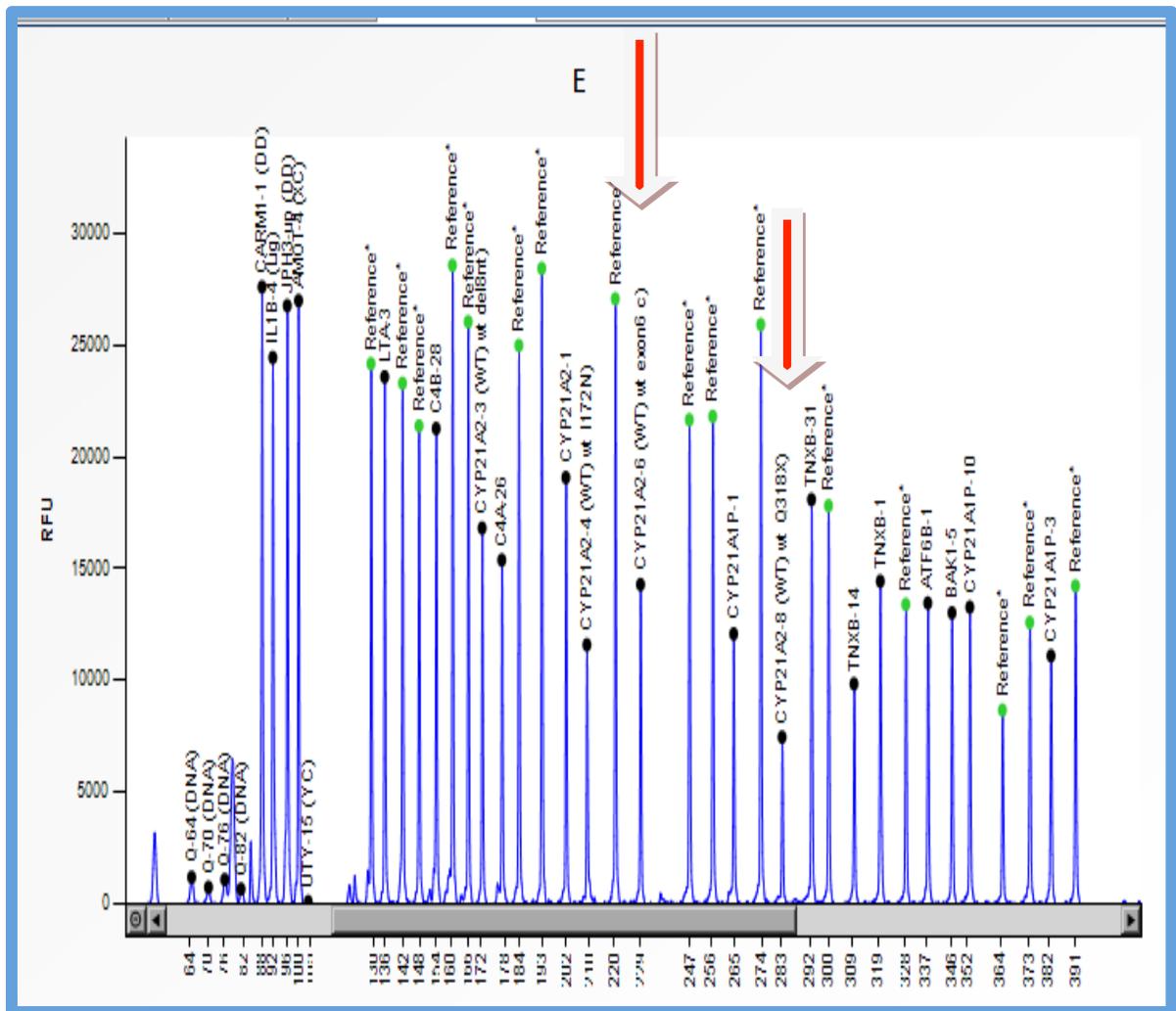


Figura 7. Electroferograma de caso índice donde se observa una disminución en la sonda 01974-L011507 I172N en el exón 4 y de la sonda 05477-L04895 Q818X en el exón 8.

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE INDIVIDUOS CON TDS 46,XY FENOTÍPICO.

### 1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA MUESTRA.

Se incluyeron en esta etapa a 55 pacientes con cariotipo 46,XY, de los cuales cuatro pacientes presentaron fenotipo gonadal, el resto se clasificó en tres fenotipos diferentes y se entraron a la etapa de secuenciación de los genes *AR* y *SDR5A2*. (Tabla 5).

GRUPO	FENOTIPO	TOTAL DE INDIVIDUOS
I	Insensibilidad parcial a los andrógenos	27
II	Síndrome de deficiencia de cinco alfa reductasa tipo 2	18
III	TDS 46,XY	6

Tabla 5. Clasificación de fenotipos en pacientes con TDS 46,XY

Del total de los pacientes integrados en este grupo un 15.6% ( 8 individuos ) tienen sexo de asignación masculino, el resto presentan un sexo de asignación femenino, ningún paciente tuvo que reasignarse.

En el análisis del árbol genealógico se vio una agregación familiar en dos casos, en los cuales la presentación clínica sugiere un patrón de herencia autosómico recesivo o ligado al X, donde los afectados presentaron grados variables de ambigüedad genital sin otros datos clínicos.

## 2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES *AR* Y *SDR5A2*.

El grupo 1 que se conformó de 27 pacientes donde se estudiaron los 8 exones del receptor de andrógenos (RA). El estudio de secuenciación identificó 4 casos (14.81%) en los que se encontró una variante patológica en el gen *AR*.

En el caso No. 3 se observó una transición de A por G en la base 2704 del exón 6, esta sustitución provoca un cambio de tirosina (Y) por cisteína (C) en el a.a. 781 que corresponde al dominio de unión al esteroide (Figura 8).

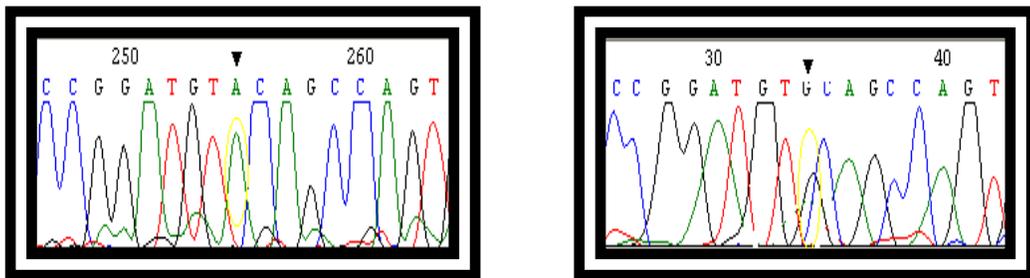


Fig. 8 Caso No. 3, c.2704 A>G Sustitución en el aminoácido Y781C.

La figura 9 muestra la mutación identificada en el caso No. 4 donde se observó una transversión de T por A en la base 2884 del exón 7, esta sustitución cambia una isoleucina por una asparagina en el a.a. 841 que corresponde al dominio de unión al esteroide. El cambio de un aminoácido hidrofóbico por un aminoácido polar sin carga genera falta de unión de la hormona al receptor.

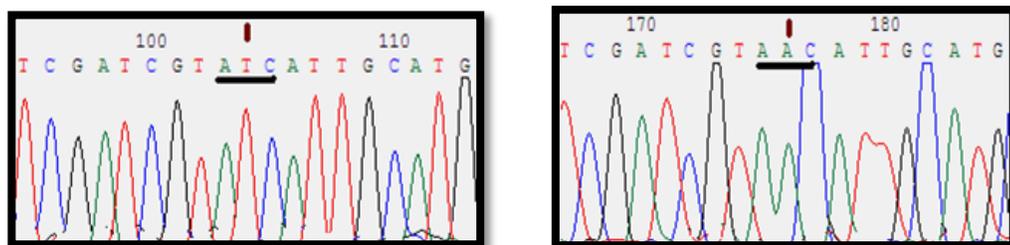


Fig. 9 Caso No. 4 Sustitución en el aminoácido I 841N.

El caso No. 9 mostró una transición de A por G en la base 3075 del exón 8, esta sustitución cambia una lisina por un ácido glutámico en el aminoácido 905 que corresponde al dominio de unión al esteroide. El cambio de un aminoácido básico por uno ácido en este dominio reduce la afinidad de unión del esteroide al receptor (Fig 10).

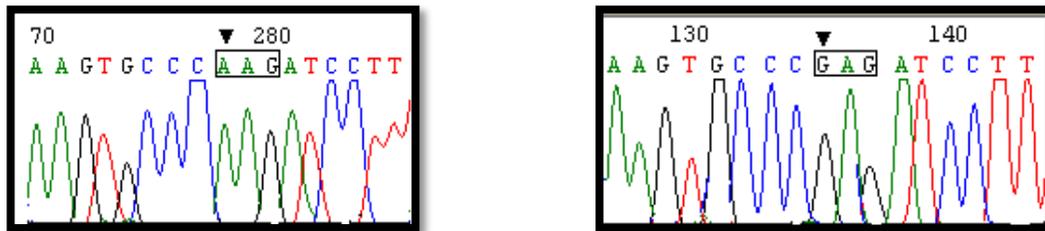


Fig. 10 Caso no. 9. Sustitución en el aminoácido K905E.

El caso No. 48 mostró una transición de una T por C en la base 3100 del exón 8, esta sustitución provoca el cambio de una prolina por una leucina en el aminoácido 932 que corresponde al dominio de unión al ligando.

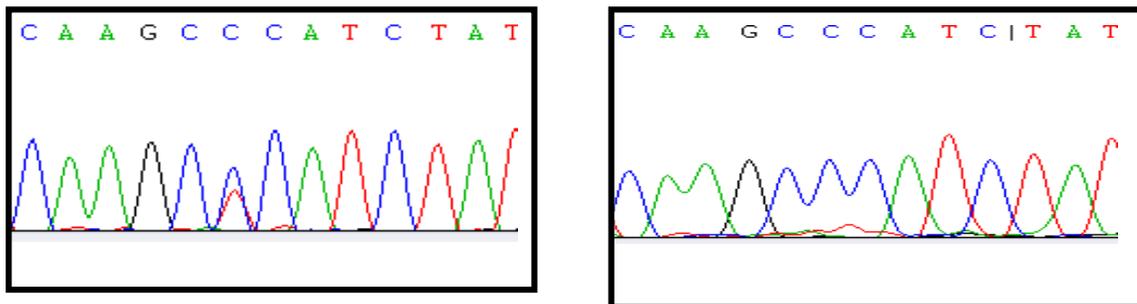


Fig. 11 Caso No. 48 Sustitucion en el aminoácido P932L

De los 23 casos restantes en donde clínicamente habían sido incluidos como Insensibilidad a la acción de los andrógenos y en los que no se observaron mutaciones en el gen *AR*, se realizó el estudio molecular de los 5 exones del gen *SRD5A2*. En este grupo de pacientes se identificaron 3/23 casos (13.04%) con mutaciones en este gen.

La figura 12 muestra la mutación en el caso No.8 que mostró ser un heterocigoto compuesto, un alelo es portador de una transversión G por T en el exón 4, esta modificación cambia el aminoácido ácido glutámico por un ácido aspártico en el aminoácido 197 (E197D). En el otro alelo se identificó una transición de C por T en el exón 4, esta origina un codón de paro en el aminoácido 227 (R227stop).

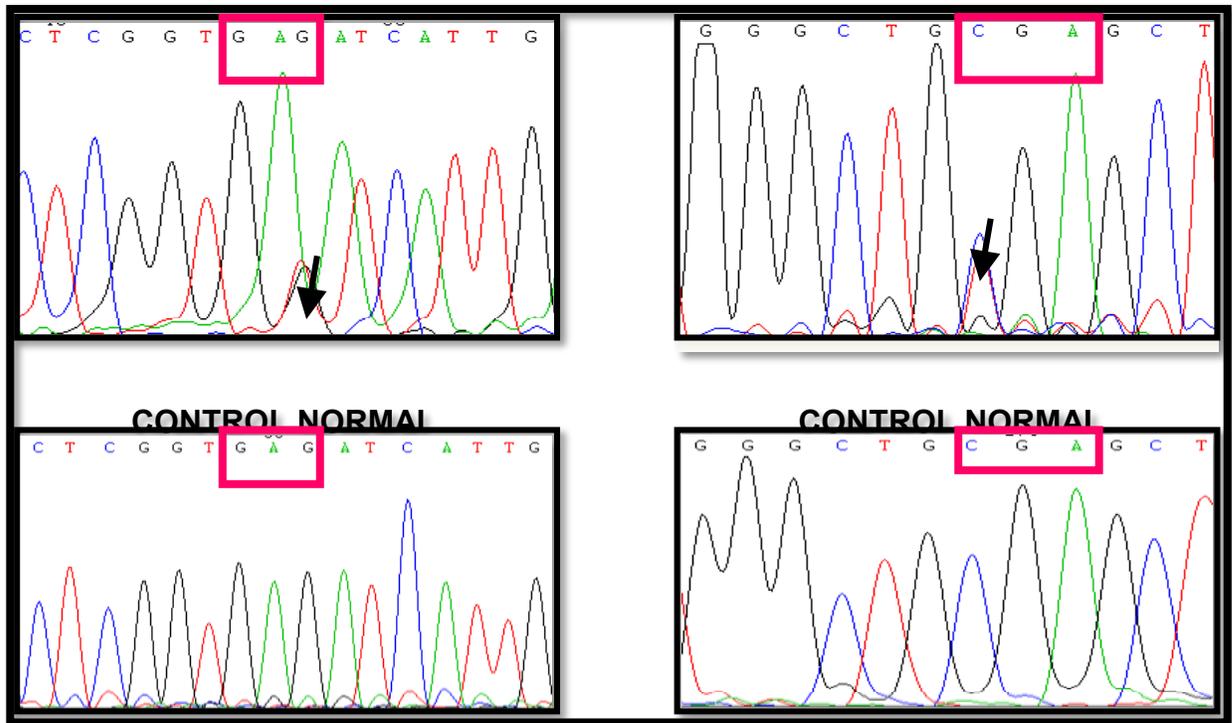


Fig. 12 Caso No. 8 (A) E197D, (B) R227stop

El caso No. 28 presentó una transición heterocigota G por A en el exón 1, esta sustitución provoca el cambio de una glicina por una arginina en el aminoácido 34 como una mutación puntual. (Figura 13).

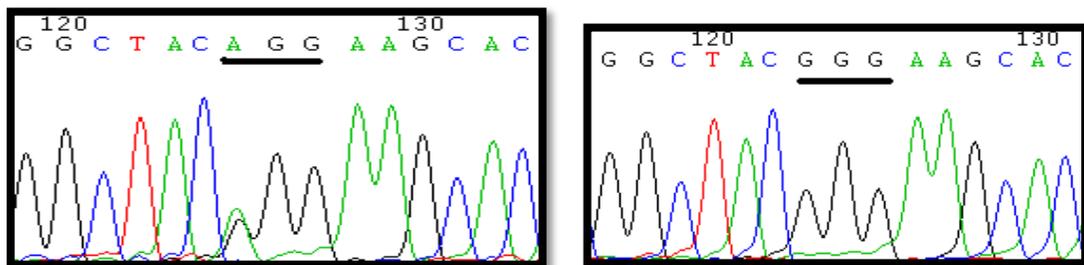


Fig. 13 Caso No. 28 Sustitución en el aminoácido G34R.

En el caso No. 44 se presento una transversión G por C en el exón 1 del gen, esta sustitución ocasiona el cambio de un ácido glutámico por una glutamina en el aminoácido 57 (Q57E). (Figura14).

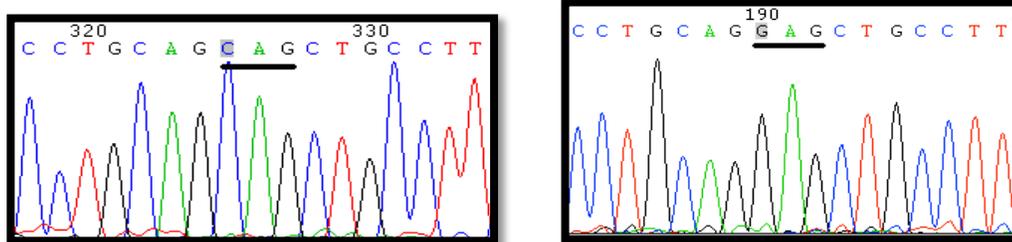


Fig. 14 Caso No. 44 Sustitución en el aminoácido Q57E.

El estudio molecular del grupo 2, se formó por 18 casos que ingresaron al estudio con diagnóstico clínico de deficiencia de 5 alfa reductasa tipo 2. En estos pacientes de manera inicial se realizó estudio molecular de los 5 exones y uniones exon/intron del gen de 5alfa reductasa tipo 2. Se identificaron mutaciones en 3/18 de estas casos (16.6%).

El caso No. 20 presentó una transición de una G por A en el exón 2, esta sustitución provoca un cambio de glicina (G) por ácido aspártico (D) en el a.a. 115 (Figura 15).

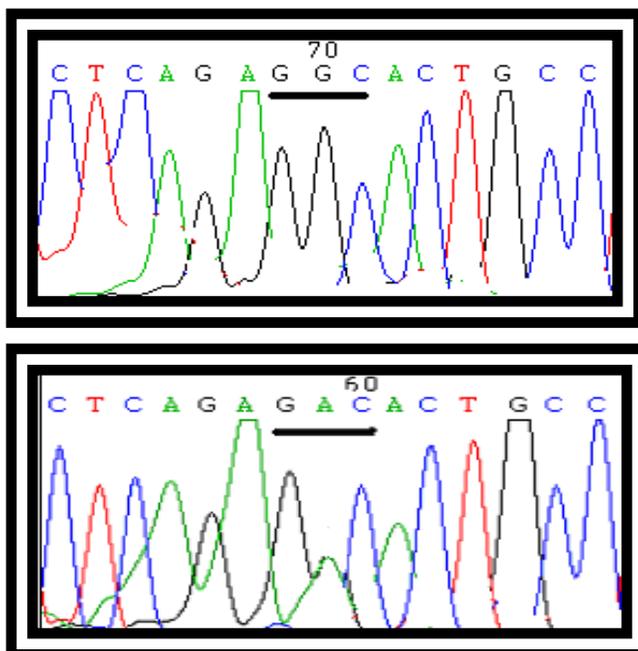


Fig. 15 Caso No. 20. Sustitución en el aminoácido G115D.

El caso No. 45 presentó una sustitución homocigota de una Citosina (CGG) por una Timina (TGG) en el exón 5, esta sustitución provoca un cambio de una Arginina por un Triptofano en el aminoácido 246 (R246W). (Figura 16)

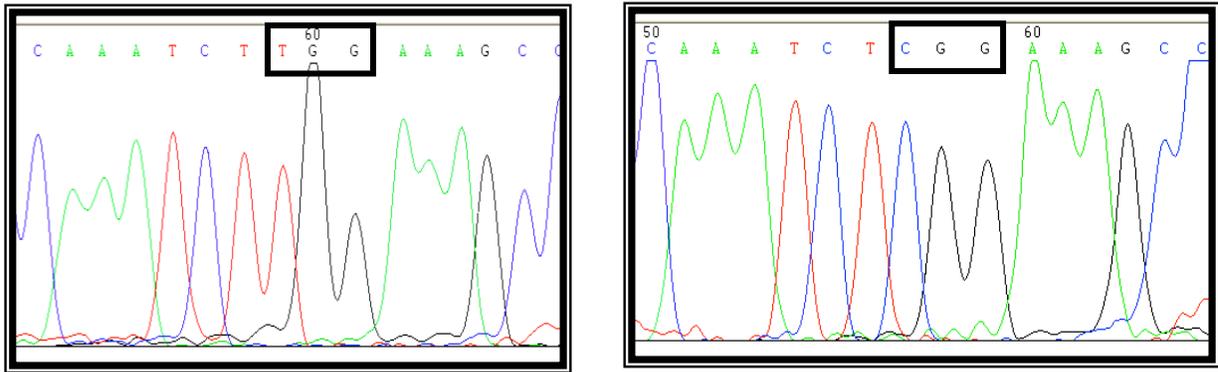


Fig. 16 Caso No.45 Sustitución en el aminoácido R246W

El caso No. 47 presentó una transición homocigota de una C por T en el exón 4, esta sustitución origina un codón de terminación (UGA); R227stop. (Figura 17).

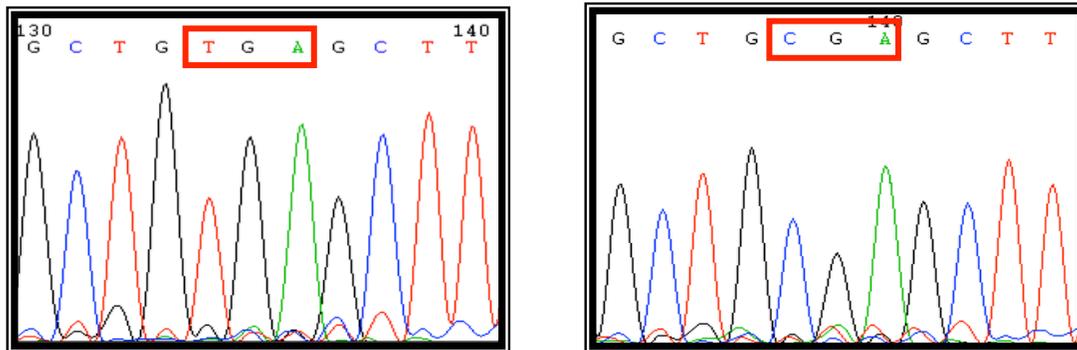


Fig. 17 Caso No. 47 Sustitución en el aminoácido R227stop

En los 15 casos restantes en donde no se identificaron mutaciones en SRD5A2 se les realizó estudio molecular del gen *AR*.

En el caso 46 (1/15) se identificó una sustitución de una C por una T en el exón 8 del Receptor de Andrógenos esta sustitución origina cambio del triplete AGC por AGT que corresponde a una serina en el aminoácido 888 (S888S) (Figura 18).

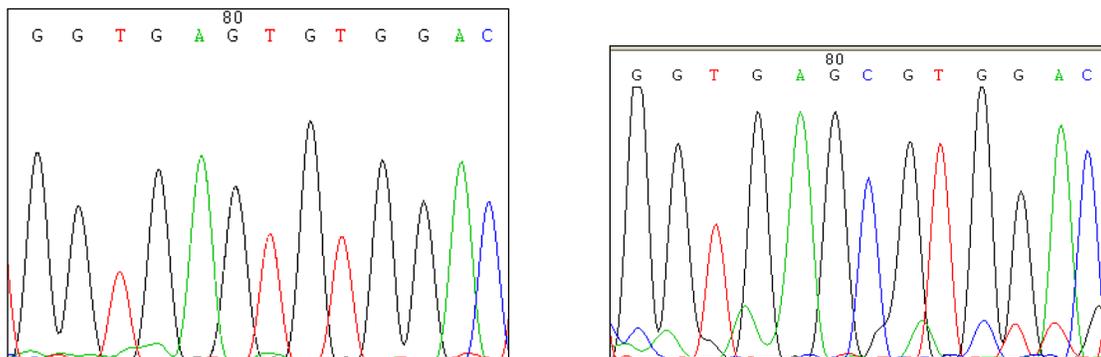


Fig. 18 Caso No.46 Sustitucion en el aminoacido S888S

En el grupo 3, los pacientes incluidos únicamente con diagnóstico de alteración en la diferenciación sexual 46,XY por probable deficiencia en la síntesis o acción de los andrógenos. Este grupo contó con 6 casos de pacientes con ambigüedad genital, cariotipo 46,XY normal y presencia de tejido testicular funcional. En estos casos se realizó simultáneamente el estudio de los dos genes de estudio.

En el caso No. 39 se observó una transición de G por A, en el exón 7 del gen *AR*. Esta modificación ocasiona el cambio del aminoácido Arginina por una Histidina en el aminoácido 317 (R317H) que corresponde al dominio de unión del ligando. (Figura 19)

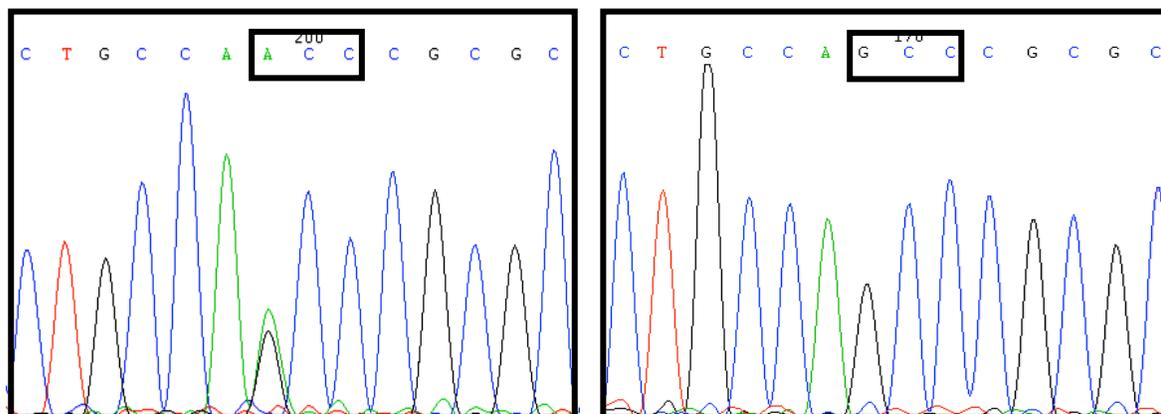


Fig. 19 Caso No. 39 cambio de aminoácido R317H

El análisis de los 49 pacientes incluidos en el presente estudio mostraron mutaciones en 12 casos en los genes de interés lo que corresponde al 24.4%. En 75.6% de los individuos estudiados no se observaron alteraciones en ninguno de los dos genes involucrados (*AR* y *SRD5A2*).

### 3. SECUENCIACIÓN EXOMA

El protocolo de secuenciación exoma se realizó en un caso familiar donde el probando cuenta con el diagnóstico de TDS 46,XX testicular, corroborado, clínicamente y mediante estudios complementarios como perfil hormonal y estudios de imagen de región urogenital; el caso índice cuenta con una hermana menor la cual cuenta con el diagnóstico de TDS 46,XX Ovotesticular corroborado tanto por clínica como por estudio histopatológico de la gónada. En la figura 20 se ilustra el árbol genealógico de la familia estudiada.

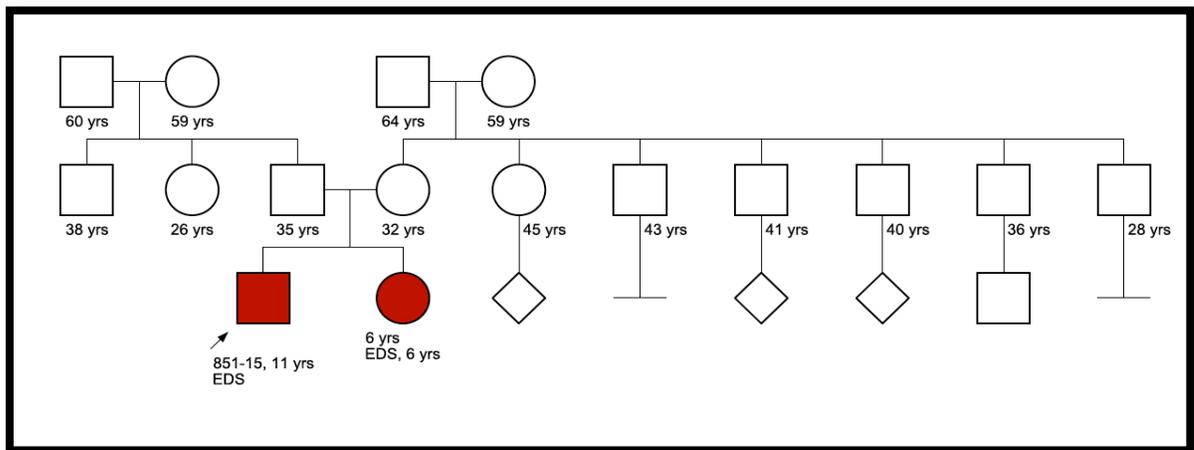


Fig. 20. Árbol genealógico de familia estudiada mediante protocolo de secuenciación exoma.

El árbol genealógico sugiere un patrón de herencia autosómico recesivo, donde los afectados tienen genotipos homocigotos o heterocigotos compuestos y los padres cuentan con un genotipo heterocigoto para la variante patogénica. Siguiendo esta lógica es como se analizaron los resultados obtenidos del protocolo de secuenciación exoma.

Los resultados de la secuenciación exoma mostraron una gran cantidad de variantes encontradas, las cuales fueron reportadas en los archivos FASTQ. Estas variantes fueron estudiadas mediante un análisis bioinformático descrito previamente, el cual fue realizado en colaboración con el Departamento de Genómica del Broad Institute en Estados Unidos. Posterior a este análisis se filtraron una gran cantidad de variantes para quedar como probables solamente diez, las cuales se ilustran en la tabla 6.

Tabla 6. Genes candidatos en resultado de secuenciación Exoma.

GEN	Loc. y variante	Tipo de variante	Probando	Padre	Madre	Hermana
<i>SASH1</i>	Cr. 6 G>A	Sin sentido R>Q	A/A	G/A	G/A	A/A
<i>UNC45A</i>	Cr. 15 G>C	Sin sentido R>P	C/C	G/C	G/C	C/C
<i>KRTAP9-1</i>	Cr. 17 T>TGCTGTG GGTCCAGC	Marco de lectura C>CCGSS	TGC.../T GC..	T/TGC...	T/TGC ...	TGC.../TGC..
<i>PAPSS2</i>	Cr. 10 G>A	Sitio de empalme	<b>G/A</b>	G/G	G/G	G/A
<i>BCLAF1</i>	Cr. 6 A>T	Sitio de empalme	<b>A/T</b>	A/A	A/A	A/T
<i>ESRRA</i>	Cr.11 T>C	Sentido equivocado L>P	<b>T/C</b>	T/T	T/T	T/C
<i>CYP3A5</i>	Cr. 7 A>G	Sitio de empalme	<b>A/G</b>	A/G	A/A	A/G
<i>WAC</i>	Cr. 10 G>TC	Sin sentido E>*	<b>G/T</b>	G/T	G/G	G/T
<i>ADAM8</i>	Cr. 10 A>C	Sitio de empalme	<b>A/C</b>	A/C	A/A	A/C
<i>ZNF93</i>	Cr. 19 G>A	Sin sentido W>*	<b>G/A</b>	G/A	G/G	G/A

De los genes candidatos resultado del análisis bioinformático, se realizó validación por medio de Secuenciación Sanger, de las diez variantes encontradas para corroborar el diagnóstico molecular.

Se corroboró mediante Secuenciación Sanger la variante c.11+2T>C en el gen *ADAM8* que se presenta en forma heterocigota en los casos afectados y heterocigotos en el padre quien se considera portador sano.

Esta variante afecta el sitio de empalme y se codifican 43 tripletes del intrón 11 y se genera un codón de paro que trunca la proteína.

Esta variante encontrada fue validada mediante la secuenciación Sanger en 600 cromosomas con lo que se descartó que se trate de una variante polimórfica.

## DISCUSIÓN

El presente estudio describe un grupo de pacientes con diagnóstico clínico de Trastorno del Desarrollo Sexual. Se incluyeron tanto pacientes lactantes como adultos. La clasificación de acuerdo a los fenotipos clínicos, permitió realizar un abordaje diferente en los diferentes subgrupos de pacientes estudiados.

Los TDS son entidades clínicamente heterogéneas las cuales cuentan con una variabilidad fenotípica amplia, por lo que en su primer abordaje se clasifican de acuerdo a sus características clínicas, hormonales y cromosómicas (Hughes 2006). Dentro de nuestro grupo de estudio se clasificaron a los pacientes en dos grupos tomando en cuenta la fisiopatología: los TDS gonadales y los TDS fenotípicos.

Se utilizaron tres abordajes moleculares diferentes tomando en cuenta la valoración clínica inicial, eso con el fin de obtener la mayor tasa de éxito de diagnóstico molecular.

En el primer grupo de pacientes los cuales incluyeron individuos con diagnóstico clínico de TDS 46,XX, cuya causa principal es la Hiperplasia Suprarrenal Congénita, se realizó abordaje molecular para analizar variantes en la región 6p21. Este grupo de pacientes fue valorado clínicamente tanto por el servicio de genética como por el servicio de endocrinología y se corroboró el diagnóstico clínico y hormonal.

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita, es un grupo heterogéneo de trastornos autosómicos recesivos, que son resultado de la deficiencia enzimática involucrada en la síntesis de cortisol en la corteza adrenal. Existen formas raras las cuales son poco frecuentes y se requiere su estudio para lograr identificar las variantes no detectadas por los métodos estándar (Speiser W, 2003).

En nuestro grupo de estudio se aplicó la técnica de MLPA a todos los pacientes, teniendo un resultado positivo en 57% de los pacientes con la presentación clásica (4/7) lo cual se asemeja a los reportes publicados por el grupo italiano en 2009, quienes reportaron resultados positivos en 9 de 18 pacientes, identificando tanto deleciones como duplicaciones del gen *CYP21A2*.(27)

En nuestro estudio se reportaron la mayor parte de los resultados positivos en pacientes con diagnóstico de formas clásicas de hiperplasia suprarrenal congénita,

por lo que se puede realizar una correlación genotipo fenotipo en la que se confirma que las formas más severas de la enfermedad se asocian a deleciones del gen en su gran mayoría, los tres pacientes que reportamos con la forma clásica perdedora de sal, en su totalidad presentaron resultado positivo para el MLPA. En el estudio de New et al (28) se estudiaron 1507 pacientes con diagnóstico de hiperplasia suprarrenal congénita y se analizaron los genotipos de las tres formas clínicas debidas a deficiencia de 21- hidroxilasa (virilizante simple, perdedora de sal y no clásica) y reportan que las formas perdedoras de sal se asocian a deleciones presentes de forma homocigota, pero las formas virilizantes simples tienen un mayor rango de variabilidad genotípica que puede incluir desde deleciones hasta mutaciones puntuales. En nuestro estudio los tres pacientes con las formas perdedora de sal presentaron, el primero deleción homocigota en exones 4 al 8, lo que corresponde perfectamente a lo reportado previamente, en el segundo paciente se encontró la variante I172N de forma homocigota, en la cohorte estudiada este genotipo se asoció en su mayoría en pacientes con la forma virilizante simple; y el tercer paciente que cuenta con un genotipo heterocigoto compuesto el cual presenta un alelo con la variante I172N y la otra con una duplicación en la secuencia Q318X, lo cual no está reportado en la cohorte mencionada previamente. Se requiere un número de individuos mayor, lo que nos permita hacer una correcta valoración de esta probable correlación genotipo fenotipo.

En las formas clínicas no clásicas, se realizó la secuenciación Sanger de todo el gen *CYP21A2*, en búsqueda de variantes asociadas a deficiencias leves. Nuestro estudio reportó una variedad grande de polimorfismos en todos los pacientes reportados sin encontrar variantes patogénicas asociadas, estos polimorfismos por sí mismos no generan una deficiencia específica, sino que pueden estar relacionados con la actividad enzimática y afectar su estructura. En la cohorte de pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita reportada por New et al, los pacientes con las formas no clásicas presentaron mayor frecuencia de la variante V281L, dato no encontrado en nuestros casos.

El abordaje molecular de pacientes con diagnóstico clínico de trastorno del desarrollo sexual 46,XY fenotípico, se realizó de acuerdo a lo descrito en la

literatura. En este grupo de pacientes la literatura reporta que entre las causas más frecuentes se encuentra el espectro de mutaciones en el gen del receptor de andrógenos que cuenta con los fenotipos de insensibilidad completa y parcial a la acción de los andrógenos; y también los fenotipos asociados a deficiencia de la enzima 5 alfa reductasa 2, la cual es fundamental para el desarrollo fenotípico de genitales externos (26).

Se clasificaron a los pacientes en tres subgrupos de acuerdo a las características fenotípicas en pacientes con insensibilidad parcial a los andrógenos, deficiencia de 5 alfa reductasa 2 y pacientes con TDS 46, XY sin causa especificada.

En el primer grupo con diagnóstico clínico de Insensibilidad Parcial a los andrógenos se analizaron 27 pacientes, el 14.8% (4/27) mostró mutaciones en el receptor de andrógenos. En cuatro casos las mutaciones se identificaron en el sitio de unión al esteroide y fueron: una transición de Adenina por Guanina en el exón 6, una transversion de Timina por Adenina en el exón 7, una transición de Adenina por Guanina en el exon 8. y una transición de Timina por Citosina en el exón 8. Hasta la fecha se han descrito más de 400 mutaciones y en su mayoría son por sustitución de nucleótidos con error de sentido y/o sin sentido. De acuerdo con los datos reportados en otras series los cambios aquí identificados se localizaron en el sitio de unión al esteroide. Las secuencias del gen que codifican para el dominio de unión al ligado (exon 5 y 7) y son considerados como puntos calientes (hot spots) para la aparición de mutaciones. Las alteraciones que se encuentran en el resto del gen se observan con mayor frecuencia en los aminoácidos más conservados a lo largo de la evolución. Sin que exista una correlación genotipo-fenotipo bien documentada algunos autores han reportado que mutaciones que abaten por completo la unión al DNA conducen al fenotipo completo.

La frecuencia de mutaciones en el gen RA, en pacientes PAIS no ha sido determinada con exactitud, sin embargo, se estima que en casos esporádicos esta es menor al 30% (15-32%). En este trabajo se identificaron mutaciones en 14.8% de los pacientes, aun así nuestra frecuencia de mutaciones en los individuos con PAIS es menor a lo reportado en la literatura. (29) La insensibilidad parcial a la acción ha

sido un modelo para estudiar enfermedades por alteraciones en co-reguladores, estos son un grupo de proteínas que modulan la transactivación transcripcional. Los receptores de hormonas esteroides como el RA, el receptor de estrógenos, el receptor de glucocorticoides son factores de transcripción dependientes de ligando y pertenecen a una super familia de receptores nucleares. Estos receptores unen sus respectivos elementos de respuesta hormonal en la región promotora y así regulan la expresión (30). Cualquier alteración en las proteínas que regulan la transcripción modifican la transactivación del gen, esto tiene un efecto fisiológico sobre el individuo. A este grupo de enfermedades se les conoce como “transcription factor disease” (enfermedades de los factores de transcripción). En estos casos no se identifican mutaciones en el gen de estudio pero las características clínicas y bioquímicas son compatibles con la enfermedad, por lo que se ha asociado a mutaciones o alteraciones en moléculas co-reguladoras que al modificar la transactivación del gen se observa el fenotipo relacionado con la enfermedad en estos casos insensibilidad parcial a la acción de los andrógenos (31). Esta familia de receptores nucleares comparten varias regiones estructurales, como el sitio de transactivación, el de unión al DNA y el del ligando, el sitio de función de activación 1 (AF-1) en la región NH<sub>2</sub> y el de activación 2 (AF2) en la C-terminal. El AF-2 es bastante conservado entre los diferentes receptores, sin embargo, el AF-1 tiene una gran variación entre ellos. Una vez que se ha unido el ligando al receptor, este tiene un cambio conformacional en su estructura para poder translocarse al núcleo. Las proteínas co-reguladoras unen al receptor y modulan la actividad transcripcional del receptor en la región promotora y en el tejido específico. Existen dos tipos de co-reguladores los activadores y los represores. Los defectos en el RA forman parte de este grupo de enfermedades junto con otros modelos como el Síndrome de Rubinstein-Taybi (RTS), a la resistencia múltiple de las hormonas tiroideas o Síndrome de Refetoff (RTH) (32). Estudios en algunos de estos cofactores como ARA 70, fue realizada en pacientes con insensibilidad parcial a la acción de los andrógenos con la finalidad de identificar si alteraciones en este co-regulador participaban en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, no se encontraron anomalías. (33) Recientemente se ha visto que alteraciones en la

molécula co-chaperona FKBP52 disminuye la actividad androgénica (34), y 3). Otra posibilidad que tiene que considerarse aquellos casos en donde no se identifican mutaciones es la posible presencia de mosaicismos en las que un individuo puede tener líneas celulares mutantes (genitales) y líneas celulares sin la mutación (sangre), por lo que la prueba molecular no detectaría la alteración. La variabilidad de el PAIS por genotipo-fenotipo se da en casos de mosaicismo somático.

La segunda causa más frecuente son los defectos en la enzima 5  $\alpha$  reductasa 2, que en edad pediátrica se observa con un fenotipo clínicamente similar al IPAA. El estudio molecular de 5 $\alpha$  red identificó en el 13% una mutación de 5 $\alpha$  (3/23) en estos casos las pruebas de reserva testicular y la relación T/DHT no mostraron ser de utilidad para el diagnóstico, ninguno de los casos tenía estos parámetros considerados como diagnóstico alterados.

De los casos restantes con diagnóstico de IPAA que no se les encontró ninguna mutación y se les realizó el estudio molecular del gen *SDR5A2* en solo tres casos se observaron mutaciones que fueron: una transición heterocigota Guanina por Adenina en el exón 1, esta sustitución provoca una mutación puntual, una transversion Guanina por Citosina en el exón 1 y en un paciente se encontraron Un heterocigoto compuesto ya que en el exón 4 se encontraron dos mutaciones; una transversion Guanina por Timina y una transición de Citosina por Timina, que origina una codón de paro. Estos cambios se ha identificado en la población mexicano-norteamericana y en otros grupos étnicos como los vietnamitas y los sicilianos, de forma homocigota (35,36). Sin embargo la presencia del genotipo heterocigoto en este último caso no explica el fenotipo de ambigüedad genital ya que se requiere la alteración de ambos alelos por tratarse de una patología autosómica recesiva. Estos hallazgos confirman nuevamente que los estudios clínicos y bioquímicos no son diagnósticos en muchos de los casos y que es necesario realizar estudios moleculares, otro punto importante a comentar es como lo fenotipos clínicos se pueden imbricar.

El segundo grupo con diagnóstico clínico de Deficiencia de 5 alfa reductasa 2; mostró en los 18 pacientes que lo conformaron que todos los casos tuvieron características clínicas y bioquímicas (relación T/DHT mayor de 15) compatibles con el diagnóstico. Hasta la fecha se requieren estos parámetros indispensables para integrar el diagnóstico clínico; sin embargo, no se conoce con certeza la sensibilidad de estos criterios, por lo que el diagnóstico molecular se considera como el estándar de oro.

El diagnóstico de déficit de 5alfa reductasa 2 por mediciones hormonales es mucho más sencillo de comprobar después de la pubertad ya que en estos casos se documenta en todos los casos una relación testosterona/DHT anormalmente alta. (37). Sin embargo, en edad pediátrica el diagnóstico precoz del déficit de 5alfa reductasa 2 es importante debido a la influencia sobre la asignación de sexo en el lactante afecto. La presencia de DHT aún en pequeñas cantidades es el principal ligando del receptor de andrógenos y por lo tanto el principal agente causal de la virilización. La frecuencia de esta patología no se conoce, aunque se ha reportado una mayor incidencia en países como República Dominicana, Turquía y algunas tribus de Nueva Guinea, posiblemente debido a la elevada consanguinidad en estos países (38).

En el 16.6 % (3/18) se identificaron cambios en la secuencia del DNA de este gen, las mutaciones que se identificaron fueron principalmente una transición de una Guanina por Adenina en el exón 2, ya reportada anteriormente (39). Esta mutación, junto con otras también ha sido reportada en población mexicana (40) y en un individuo de un grupo étnico de Jordania radicado en Nueva York (37), una sustitución homocigota de una Citosina por una Timina en el exón 5 y una transición homocigota de una Citosina por Timina en el exón 4, que origina un codón de terminación.

El trastorno se hereda con carácter autosómico recesivo y es genéticamente heterogéneo, se han descrito más de 20 mutaciones y la variación fenotípica es amplia, aún en individuos pertenecientes a la misma familia y con la misma

mutación. Las mutaciones han sido descritas a lo largo de todo el gen y no se ha identificado un sitio específico para la presentación de éstas. Se ha visto que los cambios mutacionales de los exones 2 y 5 disminuyen la afinidad de la enzima por su sustrato (testosterona) en tanto que las mutaciones presentes en los exones 1 y 4 que afectan al -3' y al carboxilo terminal se asocian con una disminución de la afinidad por el cofactor NADPH (41). Se han encontrado mas de 30 mutaciones con error de sentido, estas se asocian con menos del 0.4% Imperato-McGinley y cols. Describieron un aislado geográfico y cultural de seuohermafroditas varones con déficit de 5alfa-reductasa, que se masculinizaron en la pubertad. En otro aislado genético de pacientes con déficit en la Eastern Highlands Province de Guinea Nueva Papúa, el papel de género pareció afectarse de modo primario por factores sociales experienciales y culturales, en vez de por mecanismos hormonales (37). Se pueden presentar mutaciones heterocigotas compuestas. Los casos restantes con diagnostico de Deficiencia a la 5alfa reductasa que no se les encontró ninguna mutación se les realizó el estudio molecular del gen *AR*, de los cuales solo un caso manifestó mutación. (1/15).

Finalmente el tercer grupo, en donde se tomaron en cuenta a 4 pacientes que presentaban ambigüedad genital, cariotipo 46,XY normal y tejido testicular funcional, se les realizaron ambos estudios moleculares (RA Y SRDA52), solo en uno se identificó mutación en el Receptor de Andrógenos y heterocigosidad para el gen de 5 alfa reductasa 2.

Presentó una transición de Guanina por Adenina, esta modificación ocasiona el cambio del aminoácido Arginina por una Histidina en el aminoácido 317 del exón 7 del gen *AR*, que corresponde al dominio de unión del ligando.

Y en el análisis del gen *SDR5A2*, se identifico una mutación heterocigota; uno de los alelos es portador de una transición de Guanina por Adenina en el exón 1. Aunque este grupo es pequeño, se observó que el 25% tenían un defecto molecular en los genes de estudio lo que lleva a sugerir que en aquellos casos en donde los estudios clínicos y bioquímicos no sean concluyentes, y que el fenotipo se imbrinque con las dos patologías habrá que realizar ambos estudios de forma

simultánea, con la finalidad de poder tener un diagnóstico preciso en donde se puedan normar conductas terapéuticas lo más acertadas posibles.

En los casos restantes donde no se identificaron mutaciones es importante comentar que pueden tratarse de otros desórdenes en la vía de síntesis de andrógenos como 17 $\beta$ -Hidroxiesteroide dehidrogenasa-3; ya que mutaciones en este gen causa fenotipos similares a la IAA al nacimiento.

En la última parte de nuestro estudio se realizó el análisis molecular de una familia con dos individuos afectados con el diagnóstico clínico de trastorno del desarrollo sexual 46,XX testicular y trastorno del desarrollo sexual ovotesticular, en caso índice y hermana respectivamente. Los pacientes estudiados fueron estudiados en busca de mutaciones en el gen *SRY*, ambos pacientes presentaron ausencia de secuencia de este gen.

El TDS 46, XX testicular se clasifica molecularmente basado en la presencia o ausencia del gen *SRY*. Alrededor de 90% de los individuos con TDS 46,XX testicular tienen material del cromosoma Y que incluye el gen *SRY*, que usualmente está translocado en la porción más distal del brazo corto del cromosoma X; (26) esto es el resultado de un intercambio aberrante entre el cromosoma Y y el cromosoma X durante la meiosis I en la gametogénesis paterna, aunque se han reportado casos de translocación de *SRY* en autosomas. (42). El fenotipo de los individuos con esta característica tiene una amplia variabilidad, desde genitales externos e internos normales hasta características de caracteres sexuales secundarios anormales, testículos pequeños con hipospadias. Esta variación fenotípica depende primariamente de dos mecanismos posibles: el primero depende del patrón de inactivación del cromosoma X y el segundo de la cantidad de material del cromosoma Y que fue translocado hacia el cromosoma X. Un fenotipo masculino normal se muestra como resultado de un fragmento de mayor tamaño de Yp translocado en el cromosoma X, que incluye el gen *SRY*, este fragmento por su longitud protege al gen *SRY* del silenciamiento diferencial de la inactivación del X. Adicionalmente, la variabilidad fenotípica podría estar asociada con variantes

polimórficas y variantes en el número de copias de genes en cromosoma X como *NROB1* y *TAF7L*.(26).

El porcentaje restante denominados *SRY*-negativos, se producen principalmente por dos mecanismos fisiopatogénicos, el primero una sobreexpresión de genes protesticulo como *SOX9*, *SOX3*, *SOX10*, y el segundo mecanismo está relacionado con una expresión disminuida de genes pro ovario como *WNT4*, *RSPO1* y *FOXL2*. (43).

El trastorno del desarrollo sexual ovotesticular es una forma poco frecuente de TDS, con una prevalencia y cariotipos variables en diferentes regiones del mundo. Sin embargo todos los estudios concuerdan que el complemento 46,XX es el cariotipo más común observado en sangre periférica, en un rango de 65-90% (44, 45 y 46). Los casos restantes son portadores de un cromosoma Y (46,XY, 46,XX/46,XY u otro tipo de mosaicismos), lo cual explica el desarrollo de tejido testicular. En pacientes 46,XX con DSD ovotesticular y testicular, el gen *SRY* puede estar presente, debido a una translocación hacia el cromosoma X o de forma más rara hacia un autosoma. Una precisa estimación de frecuencia de *SRY*-positivo en pacientes con TDS 46,XX es dificultosa debido a la presencia de mosaicos bajos incluso a nivel germinal, no detectables en sangre periférica.(43).

En nuestro estudio, ambos pacientes afectados presentaron secuencias del Y negativas, por lo que se descarta que sean parte de ese gran porcentaje de pacientes con cariotipos 46,XX con *SRY*- positivos.

Se realizó el protocolo de secuenciación exoma a la familia seleccionada, y luego del protocolo comentado en el apartado de resultados, se determinó que la variante encontrada en el gen *ADAM8*, es la variante patogénica que explica el fenotipo de ambos pacientes.

El gen *ADAM8* codifica para el dominio 8 de la metalopeptidasa de ADAM (ADAM Metallopeptidase Domain 8), ubicado en 10q26.3. Los miembros de la familia ADAM son proteínas ancladas a la membrana estructuralmente relacionadas con las desintegrinas en especies de serpientes venenosas, han sido implicadas en una gran variedad de procesos biológicos involucrando interacciones célula – célula y célula matriz, incluyendo fertilidad, desarrollo muscular y neurogénesis.

Utilizando hibridación in situ, Kelly et al (47), detectaron expresión de Adam8 en células maternas en la decidua y en derivados del trofoblasto en embriones de 8.5 días, pero no se identificó en células propias del embrión. En estadios posteriores, Adam8 se expresó de forma transitoria en tejidos embrionarios, predominantemente en sistema nervioso central, gónadas, primordios de cartílago y epitelios, tejidos adyacentes a vasos mayores y células endoteliales linfáticas.

En el estudio de Beverdam y Koopman (48) se generó y caracterizó una nueva línea murina transgénica en la cual la expresión de una proteína potenciadora fluorescente se encuentra bajo el control de un fragmento del promotor de Sfl exclusivamente en células somáticas gonadales tanto masculinas como femeninas. Esta línea celular murina permitió determinar perfiles de expresión en las células somáticas gonadales durante el periodo crítico de de la determinación sexual masculina. Aunque se identificaron algunos genes con roles ya conocidos durante el desarrollo temprano de la gónada, también fueron identificados genes que no cuentan con un reporte ni estructural ni funcional. Adicionalmente se encontraron ortólogos humanos que en el mapeo de loci cromosómicos ya conocidos, se han asociado a trastornos del desarrollo sexual desde disgenesias gonadales, reversiones sexuales hasta fenotipos leves como hipospadias y criptorquidias. Notablemente, genes como *ADAM8*, *PIK3API*, *PNLIPRP1*, *SFXN3*, *SCL18A2*, *TRIM47* y algunos otros fueron mapeados en la región 10q, la cual ya se reportó como una región asociada con disgenesia gonadal y ambigüedad genital, lo cual los convierte en excelentes genes candidatos de patología gonadal.

Dentro de perfiles de expresión analizados en modelos murinos durante el desarrollo de la gónada primitiva y el proceso de determinación sexual, se lograron identificar aproximadamente 2300 genes que exhiben patrones de expresión específicos tanto para gónada masculina como femenina, dentro de los genes encontrados en estos perfiles de expresión se tiene que *ADAM8* incrementa su expresión 2.4 veces más durante este periodo de desarrollo gonadal, principalmente ovárico como lo demuestra el estudio de Nef et al. Este estudio también provee una gran cantidad de genes candidatos a ser responsables de trastornos del desarrollo sexual debido a su expresión diferencial en tejidos gonadales durante el desarrollo embrionario (49).

Es también reconocido el papel de otras proteínas ADAM en el desarrollo genitourinario, como Adamts16, que se coexpresa con la proteína del tumor de Wilms (Wt1) durante el desarrollo de los glomérulos en los riñones embrionarios. Además Adamts16 fue detectado mediante hibridación in situ de ARN mensajero e inmunohistoquímica también en gónadas embrionarias, en espermátides y células de la granulosa de testículos y ovarios adultos respectivamente. La interacción del factor de transcripción Wt1 con el gen *ADAMTS16* puede jugar un rol importante en el desarrollo gonadal. Wt1 actúa en múltiples pasos durante el desarrollo gonadal, ya que en ratones *WT1* nulos la cresta gonadal degenera por apoptosis generando agenesia gonadal. En los resultados de este estudio indican que *WT1* controla la expresión de *ADAMTS16* en las gónadas en desarrollo durante el evento de la determinación gonadal, así, el silenciamiento de *WT1*, incrementa los transcritos de *ADAMTS16*. Se sugiere que *ADAMTS16* se sobreexpresa en las gónadas femeninas en desarrollo y alguna variante en su secuencia altera el desarrollo ovárico.

## CONCLUSIONES.

El presente estudio permitió realizar un análisis clínico molecular los trastornos del desarrollo sexual, mediante la aplicación de diferentes técnicas moleculares, mostrando gran utilidad en los diferentes fenotipos clínicos.

Se reportó la primera familia mexicana con mutación en el gen *ADAM8*, cuya variante patogénica se asocia a un TDS 46, XX testicular y ovotesticular, no reportada previamente en humanos, lo cual prueba su intervención durante el desarrollo gonadal temprano. Con esto se resalta la gran complejidad de la red de genes relacionadas con el desarrollo gonadal.

Dentro del abordaje molecular de pacientes con TDS, este estudio demostró la gran efectividad de la técnica de MLPA para el diagnóstico de los fenotipos más severos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita clásica como la perdedora de sal en la que se lograron diagnosticar la totalidad de los casos mediante esta técnica.

El análisis molecular de los genes *AR* y *SDR5A2* nos permitió distinguir solo un porcentaje de pacientes con TDS 46,XY, lo que nos indica que se requiere analizar otros genes relacionados con el desarrollo fenotípico de genitales externos como las variantes de hiperplasia suprarrenal congénita debida a deficiencia de 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa u otras enzimas relacionadas con la esteroidogénesis.

Con este estudio podemos concluir que el protocolo de secuenciación de exoma completo es una gran herramienta molecular con una gran efectividad diagnóstica pero con la limitante de que la interpretación de las variantes encontradas es un reto el cual debe ser analizado de una forma muy cuidadosa para lograr identificar la variante patogénica causal.

Los TDS son padecimientos frecuentes, por lo que se requiere continuar con la búsqueda del origen genético de los diferentes fenotipos para alcanzar un porcentaje importante de diagnósticos.

La identificación de las variantes causales continua siendo de gran importancia para la toma de decisiones en cuanto al manejo terapéutico y al asesoramiento genético de los individuos con estos trastornos.

## Referencias Bibliográficas.

1. **Shen T, Pajaro-Van de Stadt S, Yeat N.** Clinical applications of next generation sequencing in cáncer: from panels, to exomes, to genomes. *Frontiers in Genetics*. 2015. 6: 215.
2. **Valencia CA, Sivakumaran TA, Tinkle BT, Husami A, Zhang K.** NGS-Based clinical diagnosis of genetically heterogeneous disorders. *Next Generation Sequencing: Traslation to Clinical Diagnosis*. Springer Science, New York 2013; Chapter 7: e115 – e151.
3. **Egger S, et al.** Disorders of sex development:insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biology*. 2016; 17: 243.
4. **Ono M, Harley V.** Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nature reviews endocrinology*.9, 79-91 (2013).
5. **Arboleda VA, Sandberg DE, Villain E.** DSDs: genetics, underlying pathologies and psychosexual differentiation. *Nat Rev Endocrinol*. 2014; 10(10):603-615.
6. **Koopam P.** The genetics and biology of vertebrate sex determination. *Cell*. 2001; 105; 843-847.
7. **Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA.** Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*. 2006; 118:e488-e500.
8. **White S, Sinclair A.** The molecular basis of gonadal development and disorders of sex development. En Hutson JM, Warne GL y Grover SR (Eds.), *Disorders of sex development*. Nueva York: Springer. 2012.
9. **Capel B.** Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu Rev Physiol*. 1998; 60: 497-523.
10. **Clarkson MJ, Harley VR.** Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13: 106-111.
11. **Bhandari RK et al.** Basic Helix-Loop-Helix Trascription Factor TCF21 is a Downstream Target of the Male Sex Determining Gene SRY. *PLoS One*. 2011; 6 (5): 19935.

12. **Ohnesorg T, Vilain E, Sinclair AH.** The genetics of disorders of sex development in humans. *Sex Dev.* 2014; 1-11.
13. **Matson CK et al.** The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. *Dev Cell.* 2010; 19 (4): 612-624.
14. **Boyer A, Goff AK, Boerboom D.** WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21 (1):25-32.
15. **Délot EC, et al.** Genetics of Disorders of Sex Development. *Endocrinol Metab Clin n Am.* 2017; 1-19.
16. **Auchus RJ, Miller WL.** Defects in androgen biosynthesis causing 46,XY disorders of sexual development. *Semin Reprod Med.* 2012; 30 (5): 417-426.
17. **Mendonca BB, et al.** 46,XY DSD due to impaired androgen production. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010; 4 (2): 243-262.
18. **Picard J.Y, Cate R, Racine C, Josso N.** The Persistent Müllerian Duct Syndrome: An Update Based Upon a Personal Experience of 157 Cases. *Sexual Development.* 2017; 11:109-125.
19. **Bouty A, Ayers K, Pask A, Heloury Y.** The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. *Sexual Development.* 2015; 9: 239-259.
20. **Docampo M J, Hadziselimovic F.** Molecular Pathology of Cryptorchidism-Induced Infertility. *Sexual Development.* 2015; 9: 269-278
21. **Sharma R, Seth A.** Congenital adrenal hiperplasia: issues in diagnosis and treatment in children. *Indian Journal Pediatrics.* Springer Science. 2014. Vol 81: 178-185.
22. **Chapelle A, Hortling H, Niemi M, Wennström J.** XX sex chromosomes in a human male. *Acta Medica Scandinavica* .1964, 175(Suppl 412):25–28.
23. **Alves C, Braid Z, Coeli FB, Mello MP:** 46, XX Male-Testicular Disorder of Sexual Differentiation (DSD): hormonal, molecular and cytogenetic studies. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010, 54(8):685–689.
24. **Lee GM, Ko JM, Shin CH, Yang SW.** A Korean boy with 46,XX testicular disorder of sex development caused by SOX9 duplication. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2014, 19(2):108–112.

25. **Délot EC, Vilain EJ.** Nonsyndromic 46,XX Testicular Disorders of Sex Development. 2003 Oct 30 [Updated 2015 May 7]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.
26. **Wu Q Y, Li N, Li WW, Zhai JS, et al.** Clinical, molecular and cytogenetic analysis of 46, XX testicular disorder of sex development with *SRY*-positive. *BMC Urology*. 2014; 14:70.
27. **Concolino P, Capoluongo E.** Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of *CYP21A2* gene deletions/duplications in Congenital Adrenal Hyperplasia: First technical report. *Clinica Chimica Acta*. 402 (2009)164-170.
28. **New M Yuen T.** Genotype-phenotype correlation in 1507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *PNAS* vol.110 no.7. 2013, pages 2611-2616.
29. **Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, Shimura N, Tait AD, Hughes IA.** Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000. **85**:658–665.
30. **Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Cox MB, Riggs DL, Suarez-Quian C, Smith DF.** Physiological Role for the Co-Chaperone FKBP52 in Androgen Receptor Signaling. *Mol Endocrinol*. 2005.**19**(6):1654-66.
31. **Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS.** Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 1995.**16**:271–321.
32. **Vincent Guguère.** Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocrine Reviews*; 1999. **20**(5): 689-725.
33. **Culig Z, Comuzzi B, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A:** *Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer.* *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004 Nov; 92 (4):265-71.

34. **Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Cox MB, Riggs DL, Suarez-Quian C, Smith DF.** Physiological Role for the Co-Chaperone FKBP52 in Androgen Receptor Signaling. *Mol Endocrinol.* 2005 **19**(6):1654-66
35. **Imperato-McGinley J, Peterson RE, Gautier T, Cooper G, Daner R, Arthur A, Morris PL, Sweeney WJ, Shackleton C.** Hormonal evaluation of a large kindred with complete androgen insensitivity: evidence for secondary 5 $\alpha$ -reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1982.. **54**:931-941.
36. **Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato- McGinley J, Griffin JE, Francke U, Wilson JD, Russell DW.** Molecular genetics of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *J Clin Invest* **1992. 90**: 799-809.
37. **Okeigwe I, Kuohung W.** 5- $\alpha$  reductase deficiency:a 40-year retrospective review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014, 21: 483-487.
38. **Grumbach MM, Conte FA.** Disorders of Sex Differentiation en *Williams Textbook of Endocrinology. 11<sup>a</sup> ed.* Wilson J, Foster D, Kronenberg H, Larsen P. eds. W.B. Saunders Company. E.U.A. 2008:1303-1425
39. **Fernandez-Cancio M, Rodo J, Andaluz P, Martinez de Osaba MJ, Rodriguez-Hierro F, Esteban C, Carrascosa A, Audi L.** Clinical, biochemical and morphologic diagnostic markers in an infant male pseudohermaphrodite patient with compound heterozygous mutations (G115D/R246W) in SRD5A2 gene. *Horm Res.* 2004 **62**(5):259-64.
40. **Canto P, Vilchis F, Chavez B, Mutchinick O, Imperato-McGinley J, Perez-Palacios G, Ulloa-Aguirre A, Mendez JP.** Mutations of the 5  $\alpha$ -reductase type 2 gene in eight Mexican patients from six different pedigrees with 5  $\alpha$ -reductase-2 deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997. **46**(2):155-60.
41. **Ling YH, Quan Q, Xiang H. Zhu L, Chu MX, Zhang XR, Han CY:** Expression profiles of differentially expressed genes affecting fecundity in goat ovarian tissues. *Genetics and Molecular Research* 14 (4) 2015. 18743-18752.
42. **Dauwerse JG, Hansson KB, Brouwers AA, Peters DJ, Breuning MH:** An XX male with the sex-determining region Y gene inserted in the long arm of chromosome 16. *Fertil Steril* 2006, 86(2):463. e461-463. e465.

43. **Grinspon RP, Rey RA.** Disorders of sex development with testicular differentiation in SRY-negative 46,XX individuals: Clinical and genetics aspects. *Sexual Development* 2016; 10:1-11.
44. **Verkauskas G, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Malan V, Thibaud E, Nihoul-F.k.t. C:** The long-term followup of 33 cases of true hermaphroditism: a 40-year experience with conservative gonadal surgery. *J Urol* 177: 726–731 (2007).
45. **Wiersma R, Ramdial PK:** The gonads of 111 South African patients with ovotesticular disorder of sex differentiation. *J Pediatr Surg* 44: 556–560 (2009).
46. **Matsui F, Shimada K, Matsumoto F, Itesako T, Nara K, et al:** Long-term outcome of ovotesticular disorder of sex development: a single center experience. *Int J Urol* 18: 231–236 (2011).
47. **Kelly K, Hutchinson G, Nebenius-Oosthuizen D, Smith AJ, Bartsch JW, Horiuchi K, Rittger A, Manova K, Docherty AJ, Blobel CP:** Metalloprotease-disintegrin ADAM8: expression analysis and targeted deletion in mice. *Developmental Dynamics* (2005), 232: 221-231.
48. **Beverdam A, Koopman P:** Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol, 15, No 3, 417-431.
49. **Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, Schaer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Vassalli JD:** Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Developmental biology*. 287 (2005) 361-377.