



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS MOLECULAR EN PACIENTES CON ALTERACIONES DE
DIFERENCIACIÓN SEXUAL POR DEFICIENCIA DE 5 α -REDUCTASA TIPO 2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR(A) EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. MARÍA GUADALUPE ORTÍZ LÓPEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX FEBRERO 2023.



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.

BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS MOLECULAR EN PACIENTES CON ALTERACIONES DE
DIFERENCIACIÓN SEXUAL POR DEFICIENCIA DE 5 α -REDUCTASA TIPO 2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR(A) EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. MARÍA GUADALUPE ORTÍZ LÓPEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX FEBRERO 2023.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FICIO FCIE/DAIP/599/22

ASUNTO: Asignación de Sinodales

DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA

Presente.

Por este conducto me permito comunicarle como Directora de Tesis de la alumna **MARÍA GUADALUPE ORTIZ LÓPEZ**, quien desarrolló el Trabajo de Tesis titulado **Análisis molecular en pacientes con alteraciones de diferenciación sexual por deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2**, que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el día 14 de noviembre del 2022, designó a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado tienen los méritos para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS (Biología)**:

PRESIDENTE	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
VOCAL	DRA.	KATY SÁNCHEZ POZOS
VOCAL	DR.	JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
VOCAL	DRA.	ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
SECRETARIO	DRA.	PATRICIA CANTO CETINA

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud del(a) alumno(a), con **cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base en lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

Así mismo, informo a los miembros del jurado, que de acuerdo a la Norma 30, el Comité Académico aprobó un plazo de hasta 40 días hábiles para revisar el manuscrito de tesis y, en su caso, otorgar el voto aprobatorio fundamentado.

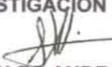
Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Cd., Mx. 17 de noviembre del 2022

**JEFE DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA
DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**


DR. ADOLFO ANDRADE CETTO

AAC/GEMF/ipp



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM), por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número 83222 para la realización de mis estudios de doctorado en el Programa en Ciencias (Biología), UNAM.

A la invaluable ayuda del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Oulu, Finlandia, así como al laboratorio de Diabetes del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM.

Laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México
Al Posgrado de la Facultad de Ciencias de la UNAM
Al CONACYT .

A mi Comité Tutor:

Dra. Vilma Maldonado y la Dr. Jorge Meléndez Zagla por asesorar el desarrollo de este trabajo.

Gracias por su apoyo y valiosos comentarios del Jurado:

Dr Luis Felipe Jiménez García, Dra. Katy Sánchez-Pozos, Dr José Pedraza Chaverrí, Dra. Elena Zambrano González y la Dra Patricia Canto Cetina.

Gracias.....

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. En primer lugar deseo agradecer a la Dra. Marta Menjívar Iraheta, directora de esta tesis, quien con su ejemplo por la investigación motivó la realización de este proyecto y me enseñó a contar la historia, que estuvo siempre presente apoyándome y dando ánimo durante todo este camino. Por tantos cafés que hemos compartido y por tantos ánimos y apoyo que he recibido de ella.

A los que fueron parte importante en el éxito y desarrollo de este proyecto, quienes me guiaron, gracias por sus valiosas aportaciones que enriquecieron mi formación en el proceso de esta tesis

A la Dra. Vilma Maldonado y al Dr. Jorge Meléndez, por su caluroso recibimiento y bienvenida en mis primeros tiempos, su ayuda altruista, su amor por la ciencia y su enorme bondad y calidad humana. Por todo su apoyo logístico, su comprensión y profesionalidad. Por tantas charlas que amenizaron el trabajo, por su diligencia, seriedad y paciencia.

A la Dra. Ángeles Granados, M en C Joel Jaimes, y de manera particular a la Dra. Katy Sánchez, por tantas comidas juntos, por tantas horas de distensión y risas. Por los ánimos que me brindaron en estos años, el apoyo y el calor humano. Por tantos buenos ratos, tantas complicidades, tanta amistad.

A mis Padres que Dios los tenga en su Gloria a mis herman@s, por apoyarme siempre, darme ánimos y comprenderme. Por confiar y creer siempre en mí.

A todos, mi más sincero agradecimiento

INDICE

Resumen.....	12
Abstract.....	13
1. Introducción.....	14
2. Objetivo.....	38
2.1. Objetivos específicos.....	38
3. Hipótesis.....	38
4. Justificación.....	39
5. Material y métodos.....	40
5.1. Participantes.....	40
5.2. Caracterización clínica.....	41
5.3. Ensayo hormonal.....	41
5.4. Análisis molecular del gen SRD5A2.....	41
5.4.1. Extracción de ADNg.....	41
5.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	41
5.4.3. Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple de DNA (SSCP siglas en inglés).....	42
5.4.4. Secuenciación.....	43
5.4.5. Mutagénesis Dirigida.....	43
5.4.6. Transfección y ensayos de actividad de 5 α -reductasa.....	44
5.4.7. Predicción de efectos funcionales de mutantes y estructurado molecular de <i>SRD5A2</i>	44
5.4.8. Modelo Conformacional.....	45
5.4.9. Análisis estadístico.....	45
6. Resultados.....	45
6.1. Caracterización clínica.....	45
6.1.1. Sujeto 1.....	45
6.1.2. Sujeto 2.....	46
6.2. Análisis molecular del gen SRD5A2.....	46
6.3. Actividad biológica de la 5 α -reductasa.....	47
6.4. Predicción de los efectos funcionales de las mutaciones en <i>SRD5A2</i> y modelado de estructuras.....	48
7. Discusión.....	50
8. Conclusiones.....	55
9. Bibliografía.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo sexual humano durante la vida fetal.....	18
Figura 2. Cronología de genes implicados en el desarrollo gonadal	21
Figura 3. Vía del metabolismo de andrógenos.....	25
Figura 4. Conversión de testosterona a DHT. Tomada de Rojas-Durán y cols. (40). 26	
Figura 5. Modelo simplificado de la acción de los andrógenos en una célula diana de andrógenos.	29
Figura 6. Las mutaciones en el receptor de andrógenos.....	32
Figura 7. Mutaciones reportadas en el gen codificante para la enzima 5 α -reductasa tipo 2.....	36
Figura 8. Pedigrees de las familias participantes. A Pedigree de familia 1. B Pedigree de familia 2.....	40
Figura 9. Análisis de secuenciación del exón 4.	47
Figura 10. Actividad de la enzima 5 α -reductasa 2 expresada en células HEK293....	48
Figura 11. Comparación entre la alineación de secuencias múltiples de la enzima esteroide 5 α -reductasa humana tipo 2	49
Figura 12. (A) Estructura de la proteína SRD5A2. (B) Acercamiento de la mutación p.Glu197Asp. (C) Acercamiento de la mutación p.Pro212Arg. En azul rey se muestra la proteína no mutada y en azul cielo la proteína mutada. La molécula de finasterida se encuentra unida a la proteína y coloreada en naranja.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Localización de diferentes genes involucrados en la diferenciación sexual .	16
Tabla 2 Clasificación de las alteraciones de diferenciación sexual 2006.....	24
Tabla 3 Características de la familia de 5 alfa reductasas	34
Tabla 4. Oligonucleótidos usados para cada exón del gene SRD5A2 (Labrie, 1992). 42	
Tabla 5. Parámetros bioquímicos y hormonales de los sujetos participantes	46
Tabla 6. Predicciones funcionales de cambios de aminoácidos detectados en 5 α -R2 en las familias estudiadas.	49

Abreviaturas

5 α -RD	Enzima 5 α - reductasa
5 α -RD	3-Oxo-5-alpha-Steroid 4-Dehydrogenase / genéticos*
5 α -RD	3-Oxo-5-alpha-Steroid 4-Dehydrogenase / químico
17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
°C	Grados centígrados
CBX2	Cromo box2
CTNNB1	Catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1
CYP17	17 α -hidroxilasa / C17-20-liasa
dATP	Desoxiadenosina trifosfato.
DBD	Dominio de Unión al DNA
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
ddH ₂ O	Agua bidestilada
DSD	Desórdenes del desarrollo sexual
dGTP	Desoxi guanina trifosfato
DHT	Dihidrotestosterona
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Dexosinucleótidos
dTTP	Desoxi timidina trifosfato
DSD	Alteraciones de la diferenciación sexual
EMX2	Empty Spiracles Homeobox 2
FSH	Hormona folículo estimulante
HCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
HSP	Proteínas de choque térmico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
KCl	Cloruro de potasio
LBD	Dominio de unión al ligando

LH	Hormona luteinizante
HIM	Hormona inhibidora de estructuras Mullerianas
μCi	microCuries
μg	Microgramos
mM	miliMolar
μM	micro Molar
Mg_2Cl	Cloruro de magnesio
Min	Minutos
μL	Microlitros
NADPH	Nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato
NR3C4	Receptor androgénico de la subfamilia 3, grupo C, miembro 4
NTD	Dominio de unión al amino terminal
$\alpha^{32}\text{P}$	Fosforo ³²
P450 SCC	Citocromo p450
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
p.P212R	Cambio de prolina en el codón 212 por arginina
PPSH	Hipospadia, Perineoescrotal con Pseudovagina
QUIA	Quimioluminiscencia
DSD	Desórdenes de desarrollo sexual
SRD5A1	Gen de 5 α - Reductasa Tipo 1
SRD5A2	Gen 5 α - Reductasa Tipo 2
SRD5A3	Gen 5 α - Reductasa Tipo 3
StAR	Proteína reguladora de esteroidogenesis aguda
SSCP	Polimorfismo conformacional de las cadenas sencillas de ADN
T	Testosterona
TBE	Tris-Base, ácido bórico y EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris-EDTA	Etiléndiaminotetraacético
LSC	Ligamento suspensor craneal

LGR8/GREAT	Miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G que contienen repeticiones ricas en leucina.
INSL3	Factor 3 similar a la insulina
LBD	Dominio de unión al ligando

Resumen

La 5 α -reductasa (5 α -RD) es la enzima responsable de la conversión de testosterona a dihidrotestosterona, hormona importante para la masculinización de los genitales externos masculinos. La deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 (5 α -RD2) es un desorden específico del desarrollo sexual (DSD por sus siglas en inglés). Las variantes patogénicas en el gen *SRD5A2*, que codifica esta enzima, son responsables del DSD 46, XY. **Objetivo.** Investigar la etiología genética de DSD 46, XY en dos niños afectados de familias mexicanas. **Material y métodos.** El gen *SRD5A2* de los padres y los niños afectados se examinó mediante secuenciación directa del gen en los niños afectados. Se identificaron dos variantes genéticas en *SRD5A2*, y su papel en la actividad de la enzima se probó mediante mutagénesis dirigida. **Resultados.** El sujeto 1 de la familia 1 presentó dos variantes: p.Glu197Asp y p.Pro212Arg. El sujeto 2 de la familia 2 fue homocigoto para la variante p.Glu197Asp. El estudio de mutagénesis dirigida reveló que las variantes p.Glu197Asp y p.Pro212Arg conducen a una pérdida total de actividad enzimática y, en consecuencia, al desarrollo anormal de genitales en los pacientes. **Conclusión.** Estos resultados sugieren que p.Glu197Asp y p.Pro212Arg son variantes que conducen a la expresión fenotípica de DSD. El manejo en la clínica de DSD es complejo, y si no se maneja de manera adecuada sus consecuencias a largo plazo pueden impactar en la fertilidad y calidad de vida de los pacientes, particularmente puede tener repercusiones en la salud mental de estos. Por ello, el diagnóstico molecular en DSD es de suma importancia para el manejo y tratamiento temprano de las personas afectadas, asimismo, debe considerarse—un grupo multidisciplinario en su manejo clínico con la finalidad de proporcionarles una calidad de vida adecuada.

Abstract

5 α - reductase (5 α -RD) is an enzyme responsible for the conversion of testosterone to dihydrotestosterone. This key enzyme is responsible for triggering masculinization of the male external genitalia. The 5 α -reductase type 2 deficiency (5 α -RD2) is a specific form of disorder of sexual development (DSD). Pathogenic variants in the *SRD5A2* gene, which encodes this enzyme, are responsible for 46,XY DSD. **Objective.** Investigate the genetic aetiology of 46,XY DSD in two Mexican families with affected children. **Material and methods.** The *SRD5A2* gene of the parents and affected children was screened in both families via polymerase chain reaction amplification, and DNA direct sequencing. The role of genetic variants in enzymatic activity was tested by site-directed mutagenesis. **Results.** Subject 1 in family 1 presented two variants: p.Glu197Asp and p.Pro212Arg. Subject 2 in family 2 was homozygous for the variant p.Glu197Asp. The two variants were reported in early studies. The directed mutagenesis study showed that the p.Glu197Asp and p.Pro212Arg variants lead to a total loss of enzymatic activity and, consequently, abnormal genitalia development in the patients. **Conclusion.** These results suggest that p.Glu197Asp and p.Pro212Arg are variants that lead to the phenotypic expression of DSD. 5 α -RD2 is of extreme importance not only because of its frequency (it is rare) but also because of its significance in understanding the mechanism of androgen action, the process of sexual differentiation, and the factors that influence normal sexual behaviour. The management of DSD is complex, and their consequences are long-term. Hence, medical or surgical treatment options, must be discussed by a multidisciplinary group of their clinical management in order to improve quality of life of patients.

1. Introducción

1.1. Diferenciación sexual

La diferenciación sexual durante la vida fetal es el resultado de una serie de etapas y procesos complejos donde intervienen un gran número de genes tanto en los cromosomas sexuales como en los autosomas, que codifican la síntesis de factores de transcripción, factores de crecimiento, enzimas, hormonas y receptores (1).

1.1.1. Etapas de la diferenciación sexual

De forma cronológica general, la diferenciación sexual se produce de manera secuencial específica: en primer lugar, se establece el sexo cromosómico. Posteriormente, el sexo cromosómico controla la diferenciación de las gónadas, las cuales determinan el medio hormonal embrionario y con ello la diferenciación de los sistemas de conductos internos y la formación de los genitales externos. Por tanto, el proceso de diferenciación sexual implica la interrelación de varios factores de manera sucesiva. La información sobre las características sexuales del nuevo individuo está contenida en los gonosomas o cromosomas sexuales, (normalmente XX y XY). Los ovocitos presentan siempre un gonosoma X, pero los espermatozoides pueden presentar tanto el gonosoma X como el gonosoma Y. Cuando ambos gametos se unen durante el proceso de fecundación, de acuerdo con el gonosoma que contenga el espermatozoide que fecunde al ovocito, se obtendrá un individuo femenino o masculino. Tradicionalmente se consideraba que el desarrollo gonadal implicaba una vía 'masculina' primaria que conducía al desarrollo testicular como resultado de la expresión de un pequeño número de genes determinantes de los testículos. Sin embargo, actualmente se sabe que existen varias redes de genes involucradas en el desarrollo de la gónada biopotencial hacia un destino testicular u ovárico. De manera interesante, esto implica a genes que actúan antagónicamente para regular el desarrollo gonadal (2,3).

El desarrollo fenotípico masculino podemos dividirlo en dos etapas: En la Etapa 1 se da la formación del testículo a partir de la gónada primitiva (determinación sexual) y en la segunda etapa la diferenciación de genitales internos y externos, por acción de las hormonas secretadas por el testículo fetal (diferenciación sexual) (4). La primera etapa implica la interacción de varios factores de transcripción y señalización celular, entre ellos se encuentra la región del gen DAX1 en el cromosoma Xp21, el cual es necesario para el desarrollo de la gónada en ambos sexos. Una sola copia del gen DAX1 es esencial para la formación del cordón testicular. Sin embargo, la sobreexpresión de DAX1 en el feto XY afectará la diferenciación testicular. El gen SRY se encuentra en el cromosoma Y (Yp11.3) e inicia la determinación del sexo por factores de regulación determinantes del sexo (5-11).

La expresión de varios genes, incluidos WT1, CBX2 (M33), SFI, GATA4/FOG2, son fundamentales para la activación de SRY (9,10). Después de la expresión de SRY, la expresión de SOX9 (gen de la caja HMG relacionada con SRY) se sobre expresa para la formación testicular (11). El gen SOX9, ubicado en el cromosoma 7q24.3-25.1 regula la sobreexpresión de los genes PGD2 y FGF9. FGF9 y PGD2, que mantienen la expresión de SOX9, formando un bucle de retroalimentación positiva en la gónada XY. Varios genes autosómicos también están involucrados en la diferenciación testicular. Algunos factores de transcripción pertenecientes a la familia de genes homeobox desempeñan un papel importante en la estabilización del mesodermo intermedio y la formación de las crestas urogenitales como son el WT1, SF1, LHX9, LM1, PAX2 GATA4, EMX2, WNT4, entre otros que están involucrados en el primordio ganadal en embriones XX and XY (4,12,13). Alteraciones de éstos genes producen alteraciones en la gónada en desarrollo, entre ellos se encuentran:

- * DAX-1: sus mutaciones producen hipoplasia suprarrenal precoz con hipogonadismo-hipogonadotrópico. La sobreexpresión de este gen inhibiría a SRY.
- * SOX 9: Sus mutaciones producen reversión sexual en el XY y displasia campomélica (encorvamiento de huesos). Su sobreexpresión conlleva a formación de testículos en el ratón XX.
- * SF-1 ó *NR5A1* (steroidogenic factor 1): De expresión en suprarrenales, cresta genital, hipófisis e hipotálamo. El gen SF-1 se localiza en el cromosoma 9q33 pertenece al grupo de proteínas de receptores nucleares que regula la

expresión, de genes de las enzimas de la esteroidogénesis como genes de las gonadotropinas hipofisarias. Las mutaciones producen insuficiencia suprarrenal y reversión sexual en los XY de las células de Leydig.

- * **WT1:** El gen WT1 es un gen tumor-supresor responsable del tumor de Wilms 1 se expresa en la cresta urogenital está situado en el cromosoma 11p13 y codifica un factor de transcripción necesario para el desarrollo de la gónada bipotencial, los riñones y corteza adrenal que va a estar regulado por SF1. El gen WT1 regula el desarrollo gonadal temprano mediante la activación de SF1. Existen mutaciones que asocian disgenesias gonadal XY y alteraciones renales del tumor Wilms (Tabla 1, Figura 2) (6).

Tabla 1 Localización de diferentes genes involucrados en la diferenciación sexual

Locus	Gen	Función	Fenotipo	No. OMIM
Yp11.3	<i>SRY</i>	Activación de la determinación testicular	Individuos XX pueden tener fenotipo masculino si presentan una translocación del gen SRY a uno de los cromosomas X	480000
19p13.2	<i>AMH</i>	AMH Inhibe la formación de los conductos Mülllerianos en el embrión masculino	Actividad inadecuada del gen conlleva al Síndrome de Persistencia de los Tubos Mülllerianos	600957
17q12	<i>LIM1-LHX1</i>	Es uno de los genes responsables de la morfogénesis y diferenciación testicular.	Mutaciones pueden ser una causa de síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser	601999
11q13	<i>SF1</i>	Controla el desarrollo sexual en el embrión y en la pubertad	Las mutaciones pueden producir genitales ambiguos, ausencia de pubertad e infertilidad	1847578
p23.1-p22	<i>GATA4</i>	Su función más importante es el desarrollo cardiaco, pero también se ha visto requerido durante el desarrollo testicular	Defectos del septum arteriosum	600576
Xq12	<i>NR3C4</i>	Receptor intracelular nuclear a andrógenos	Mutaciones en el AR están asociados con síndromes de insensibilidad a los andrógenos.	313700
15q23-q24	<i>CYP11A</i>	Inicia la esteroidogénesis mediante la conversión de colesterol en pregnenolona	Una deficiencia del gen causa hiperplasia suprarrenal congénita lipoide	1184851
p34.3	<i>RSP01</i>	Regula la vía de señalización WNT	La pérdida de función puede causar reversión sexual	609595
11P.13	<i>WNT1</i>	Codifica para un factor de transcripción que contiene dedos de zinc que es crítico	Tumor de Wilms, anomalías renales, tumores gonadales (Síndromes de WAGR, Denys -Drash y Frasier)	607102

		para el desarrollo y función del borde urogenital		
9q.33	<i>NR5A1</i>	Involucrado en la determinación y diferenciación gonadal, Activa la expresión de varias enzimas implicadas en la esteroidogénesis	Insuficiencia suprarrenal primaria; fenotipos más leves han aislado disgenesia gonadal parcial.	184757
17q24-25	<i>SOX9</i>	Responsable de la diferenciación testicular	Reordenamientos en el locus 17q24x; fenotipo más leve que las mutaciones puntuales. Displasia campomérica	608160
9p24.3	<i>DMRT1</i>	Regula distintos procesos en el desarrollo sexual como la diferenciación de la gónada, la gametogénesis y la determinación sexual	En humanos se ha observado que deleciones de la región cromosómica donde se encuentra el gen <i>DMRT1</i> (9p) se relacionan con disgenesia gonadal.	602424
9p22	<i>HSD17B3</i>	Su actividad biológica ha sido asociada al metabolismo de andrógenos y síntesis de neuro-esteroides	Androgenización parcial en la pubertad	605573
2p23	<i>SRD5A2</i>	Regulador en la conversión de T a DHT	Deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2 asociado a hipospadias	607306
1p36.12	<i>WNT4</i>	Regulador clave de la diferenciación gonadal en los humanos	Reversión sexual 46, XY.	158330
8p11.23	<i>STAR</i>	Regula la translocación intra-mitocondrial del colesterol	Su deficiencia provoca la forma más severa de hiperplasia suprarrenal congénita.	600617

1.1.2. Segunda etapa de la diferenciación sexual

La producción de hormona antimülleriana (AMH) por las células de Sertoli y de andrógenos por las células de Leydig de manera crítica dependiente de la concentración y del tiempo, inducen la diferenciación sexual masculina por medio de un proceso dependiente de hormonas. La AMH actúa sobre su receptor en los conductos de Müller para provocar su regresión. La testosterona actúa sobre el receptor de andrógenos (AR) en los conductos de Wolff para inducir la formación de epidídimo, conductos deferentes y vesículas seminales. Las células de Leydig también producen el factor 3 similar a la insulina (INSL3), que actúa directamente sobre el gubernáculo a través de su receptor asociado con la relaxina (RXFP2), también conocido como LGR8 o GREAT (14) que permite que los testículos desciendan al escroto. La testosterona se reduce a dihidrotestosterona (DHT), la cual actúa sobre el AR de la próstata y los genitales externos para provocar su masculinización. La unión de testosterona o DHT al AR es necesaria para que los andrógenos puedan hacer su

efecto. Varios correguladores interactúan probablemente transcripcional de AR. Por el contrario, tanto los correguladores como los correpresores reprimen las transcripciones (15,16).

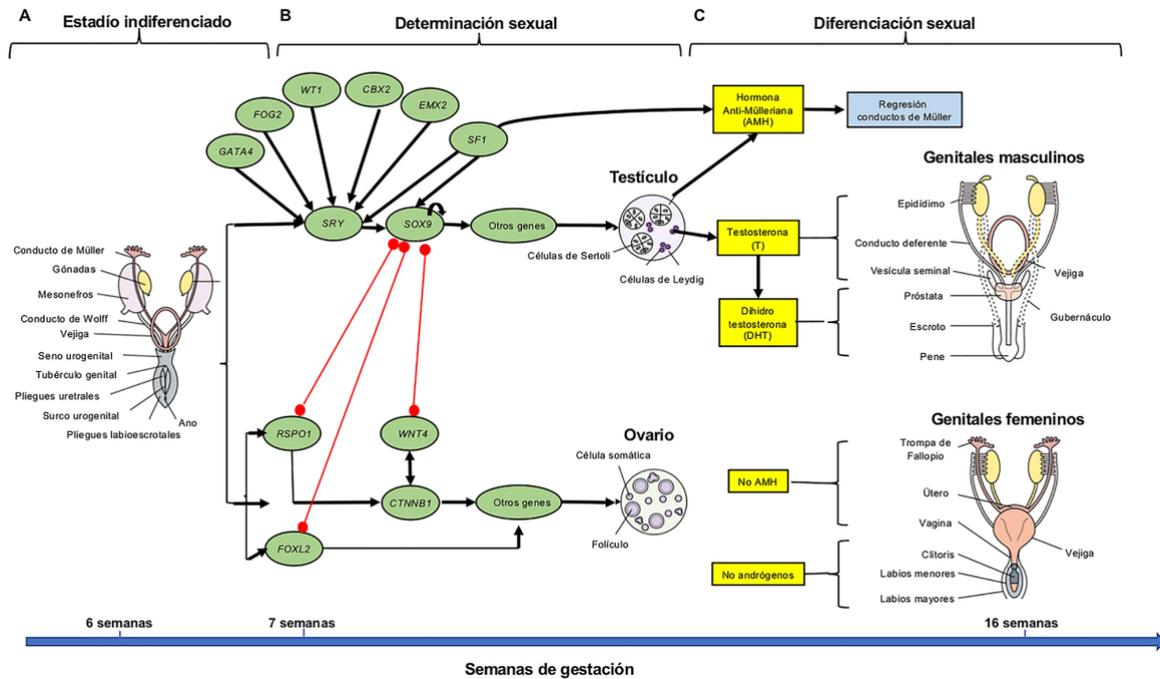


Figura 1. Desarrollo sexual humano durante la vida fetal. (A) Estadio indiferenciado: Las gónadas bipotenciales están desarrolladas a las 5 semanas, así como dos pares de conductos internos (conductos de Müller y de Wolff), los genitales externos constan del tubérculo genital, los pliegues uretrales que flanquean el surco urogenital, y los pliegues labioescrotales. Este estadio termina hacia la 6ª semana. (B) Determinación sexual: Comienza a desarrollarse entre las semanas 6ª y 7ª cuando las células somáticas y los gonocitos de las gónadas bipotenciales se diferencian en células testiculares u ováricas, dependiendo de la presencia y activación o represión de vías de señalización. Las flechas indican la activación de genes mientras que las líneas rojas indican represión de la expresión génica. (C) Diferenciación sexual: La diferenciación de genitales internos y externos depende de la presencia o ausencia de hormonas testiculares (AMH, T y DHT). Tomado de León y cols. (17). Abreviaturas: AMH, hormona anti-Mülleriana; T, testosterona; dihidrotestosterona, DHT; GATA4, Transcription Factor GATA-4; FOG2, Friend of GATA Protein 2; WT1, Wilms Tumor Protein; CBX2, Chromobox 2; EMX2, Empty Spiracles Homeobox 2; SF1, Splicing Factor 1, SRY, Sex Determining Region; SOX9, SRY-Box Transcription Factor 9; RSP01, R-Spondin 1; FOXL2, Forkhead Box L2; WNT4, Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 4; CTNNB1, Catenin Beta 1.

Sexo gonadal

El desarrollo gonadal se inicia con el establecimiento del primordio gonadal o gónada indiferenciada. En la cuarta semana del desarrollo del humano, se observa una estructura primordial común en mujeres y varones llamada cresta urogenital, que se localiza en la superficie ventromedial del mesonéfros, y se origina a partir de células mesenquimatosas somáticas del mesonéfros, y de la migración de las células epiteliales de la superficie celómica de la cresta gonadal. Este primordio se mantiene en estado indiferenciado hasta la séptima semana. Durante el estado indiferenciado, en ambos sexos, prolifera el epitelio de la cresta genital que rodea a las células germinales, lo que formará los cordones sexuales en ambos sexos. El esbozo de la gónada se inicia por modificaciones en el epitelio celómico interno. Se produce un engrosamiento de éste en una región bilateral y simétrica que abarca longitudinalmente desde la mitad caudal de la futura región torácica, hasta la región sacra, formando la cresta gonadal o genital. De toda la cresta gonadal, solo la zona central dará lugar a la gónada (18).

A continuación, un grupo de células prolifera desde el epitelio hacia el interior mesenquimal, dando lugar a los cordones germinales. Las células germinales o gonocitos migran desde la vesícula vitelina, a través del mesenterio posterior, hasta alcanzar la cresta genital. Aunque las células germinales no inducen el desarrollo gonadal, en caso de no producirse esta migración no se producirá el desarrollo gonadal. Esta migración celular permite la llegada de los gonocitos al aparato genital, pero también al mediastino, glándula pineal, etc. Normalmente en estas localizaciones desaparecen posteriormente, pero en ocasiones permanecen y dan lugar a tumores (teratomas). A las seis semanas de gestación (cuatro post-ovulación), el embrión se encuentra en un estado bipotencial: las gónadas permanecen indiferenciadas, pero son capaces de desarrollarse en uno u otro sentido (XX ó XY). Están compuestas de células germinales, epitelio especial (se diferenciará en células de la granulosa o de Sertoli) y mesénquima (células de la teca o de Leydig). Los conductos de Wolff y Müller y los genitales externos, se encuentran indiferenciados en esta fase. Como se mencionó anteriormente, este desarrollo gonadal viene determinado principalmente por la presencia de una región determinante sexual en el gen Y (región SRY), que dirige la diferenciación gonadal. En ausencia de SRY hay diferenciación sexual

femenina, aunque para que sea completa se necesitan señales moleculares adicionales.

1.2. Sexo fenotípico

Se refiere a la diferenciación del sistema de conductos internos y de los genitales externos en el ser humano y se inicia hacia la semana 7^a de gestación. Según el sexo cromosómico y gonadal que haya desarrollado el embrión, el proceso se produce en uno u otro sentido. Un embrión XY, hacia la séptima semana de gestación, tendrá un testículo en formación que empezará a producir hormona AMH en la octava semana a partir de las células de Sertoli. La hormona AMH hará que involucionen los conductos de Müller, impidiendo así el desarrollo de las estructuras femeninas. Más adelante las células de Leydig producirán testosterona. Esta hormona se encargará de desarrollar los conductos de Wolff, a partir del cual se formarán el epidídimo, el conducto deferente y las vesículas seminales. La enzima 5 α -RD es clave en el desarrollo masculino ya que al transformar la testosterona en DHT ésta producirá la masculinización de los genitales externos. La acción de la testosterona y de la hormona AMH en el varón está limitada en tiempo y espacio. En tiempo porque la receptividad tisular solo está presente durante algunos días, y en espacio porque la acción de estas hormonas es autocrina y paracrina, es decir, que su efecto en el desarrollo o regresión de las vías genitales indiferenciadas es homolateral. Por tanto, las estructuras desarrolladas dependerán de la cercanía a su gónada.

Por otro lado, un embrión XX, hacia el día 60 de gestación, tendrá unos ovarios en formación. Ante la ausencia de células de Sertoli no se producirá la hormona AMH y por tanto las estructuras derivadas del conducto de Müller darán lugar al útero, las trompas y el tercio superior de la vagina. Igualmente, no habrá síntesis de

testosterona ni DHT por lo que los genitales externos no se virilizarán, dando lugar a los genitales femeninos (Figura 2) (19,20).

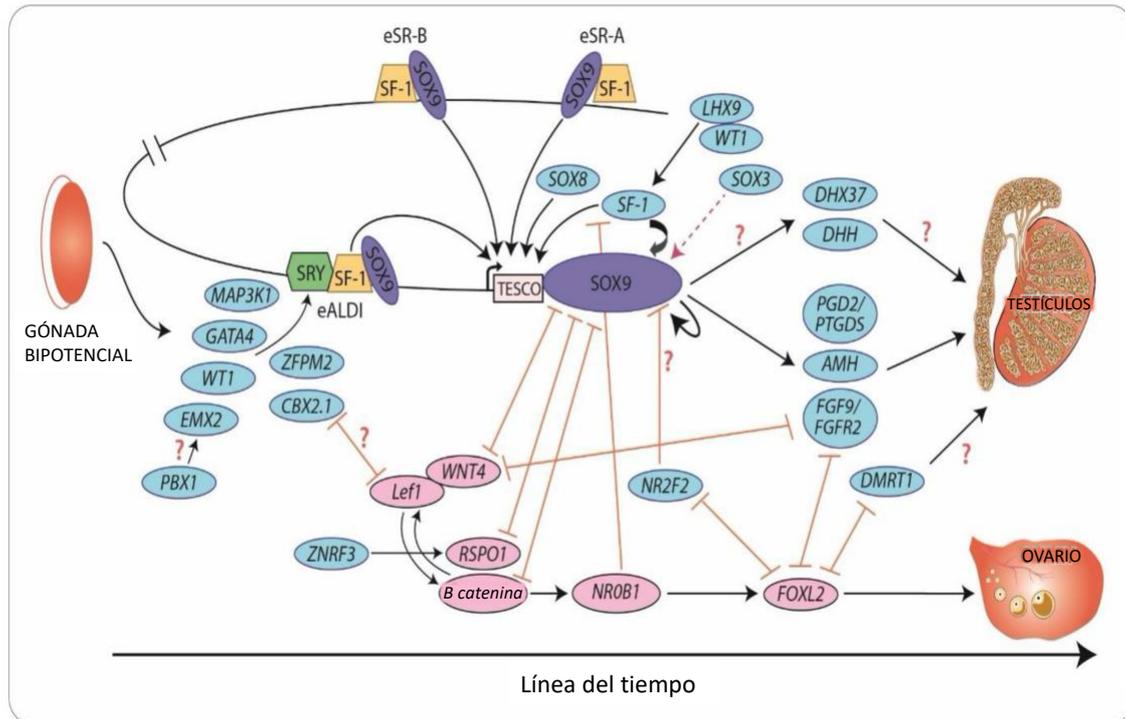


Figura 2. Cronología de genes implicados en el desarrollo gonadal. Se sabe que los genes que se muestran desempeñan un papel en el desarrollo gonadal específico del sexo en humanos y ratones. Los genes relacionados con los testículos (azul) y los genes relacionados con los ovarios (rosa) representan una vía reguladora que conduce al desarrollo de células de Sertoli y granulosa, respectivamente. Las flechas naranjas representan una acción antagónica. Las interacciones postuladas, pero no probadas se indican con (?). La expresión gonadal ectópica de SOX3 (representada por la línea punteada roja) induce la diferenciación testicular regulando al alza SOX9 de manera similar a SRY (21). MAP3K1, Mitogen-Activated Protein 3 Kinase 1; GATA4, Transcription Factor GATA-4; WT1, Wilms Tumor Protein; EMX2, Empty Spiracles Homeobox 2; PBX1, Pre-B-Cell Leukemia Transcription Factor 1; ZFPM2, Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2; CBX2, Chromobox 2; ZNRF3, Zinc And Ring Finger 3; SRY, Sex Determining Region; SF-1, Splicing Factor 1; SOX-3, SRY-Box Transcription Factor 3; SOX-8, SRY-Box Transcription Factor 8; SOX-9, SRY-Box Transcription Factor 9; WNT4, Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 4; Lef1, lymphoid enhancer-binding factor; TESCO, testis-specific enhancer core element; RSP01, R-Spondin 1; NR0B1, Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 1; FOXL2, Forkhead Box L2; DMRT1, Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1; FGF9, Fibroblast Growth Factor 9; FGFR2, Fibroblast Growth Factor Receptor 2; AMH, hormona anti-Mülleriana; PTGDS, Prostaglandin D2 Synthase; DDX37, DEAH-Box Helicase 37; LHX9, LIM Homeobox 9; eALDI, enhancer Alternate Long-Distance Initiator; eSR-B, Sex Reversal Enhancer-B; eSR-A, Sex Reversal Enhancer-A.

Tres hormonas controlan la formación del fenotipo masculino, dos de las cuales la hormona AMH y la testosterona son formadas por el testículo fetal. La hormona AMH es una hormona peptídica secretada por las células de Sertoli e induce la regresión de los ductos Müllerianos, previniendo el desarrollo de genitales internos femeninos (útero y trompas de Falopio) en el feto masculino (4). La testosterona es el principal andrógeno sintetizado por los testículos, y es el promotor de desarrollo masculino a través de dos vías: en la primera los andrógenos actúan directamente para convertir los ductos wolffianos en epidídimo, vasa deferente, vesícula seminal y ducto eyaculador. En la segunda vía, la testosterona es una prohormona para la formación de DHT, ésta última la tercer hormona requerida para la virilización (22). La testosterona y su metabolito DHT juegan un papel crítico en este proceso, cuya alteración conlleva a ambigüedad de genitales (23).

1.2.1. Mecanismo de descenso testicular

El descenso de los testículos se presenta en dos etapas, la transabdominal y la inguinoescrotal. En el humano la primera etapa ocurre en la semana 12 de la gestación y la segunda etapa ocurre entre la semana 26 a la 32. Durante la semana 12 a la 16 de gestación se presenta la primera etapa del descenso testicular, en la cual el testículo se localiza en el abdomen para posteriormente desplazarse hacia el escroto. En posición abdominal, el testículo está suspendido por dos ligamentos; uno que lo une al riñón, llamado ligamento suspensor craneal (LSC) y otro que conecta al testículo y el epidídimo a la base del escroto, conocido como gubernáculo (24). La fase transabdominal se caracteriza por el crecimiento del gubernáculo, debido tanto a la proliferación de sus células, como a la síntesis de glicosaminoglicanos y ácido hialurónico. Estos procesos dilatan el canal inguinal y el escroto facilitando el paso del testículo por estas estructuras. En esta fase del descenso también participan la AMH y el INSL3. Se ha demostrado que el INSL3 actúa directamente sobre el gubernáculo a través de su receptor asociado con la relaxina (RXFP2), también conocido como LGR8 o GREAT (14).

Durante el descenso inguinoescrotal del testículo, se lleva a cabo la regresión del gubernáculo quedando solo como un tejido fibroso que mantiene anclado el testículo al escroto. Esta fase del descenso está bajo control de la testosterona y la presión abdominal (25). Debido al efecto de la testosterona el LSC involucrena permitiendo

que el testículo permanezca muy cercano al anillo inguinal interno, y esto cause la migración del testículo hacia la región inguinal (26). El efecto de la testosterona durante el descenso inguinoescrotal puede ocurrir directamente a través de AR, que en humanos se expresan en el gubernáculo, y que se propone participan en la regresión gubernacular (27).

1.3. Clasificación de las alteraciones del desarrollo sexual (DSD)

Los DSD son un grupo de condiciones heterogéneas que se manifiestan por diversas características fisiopatológicas. Como se mencionó en las secciones anteriores existen muchos factores involucrados en la diferenciación de los órganos sexuales masculino o femenino, lo que resulta en un fenotipo clínico diverso. El sistema actual para la clasificación de DSD se introdujo en el Consenso de Chicago en 2006. De acuerdo con este sistema hay tres grupos: cromosoma sexual DSD; 46,XX DSD y 46, XY DSD (Tabla 2).

Tabla 2 Clasificación de las alteraciones de diferenciación sexual 2006 (28)

1. ADS con anomalías de los cromosomas sexuales:
a. 45X y mosaicismos; 45X0/46XX (síndrome de Turner y variantes)
b. 47XXY (síndrome de Klinefelter y variantes)
c. 45X/46XY (disgenesia gonadal mixta)
d. 46XX/46XY (ADS ovotesticular, quimerismo, antes hermafroditismo verdadero)
2. ADS con cariotipo 46XX (anteriormente pseudohermafroditismo femenino):
a. Trastornos o anomalías del desarrollo gonadal (ovario):
i. ADS ovotestes o quimera ovotesticular 46XX (antes hermafroditismo verdadero)
ii. ADS testicular (SRY, duplicación SOX9)
iii. Disgenesias gonadales 46XX
b. Excesos de andrógenos:
i. Fetal: HSC por déficit de 21-hidroxilasa, 11-beta-hidroxilasa, 3-beta hidroxisteroide deshidrogenasa, P450-óxido reductasa, tumores fetales, mutación del receptor de glucocorticoides
ii. Fetoplacentario: déficit de aromatasa, déficit de óxido reductasa
iii. Maternos: HSC incorrectamente tratada, tumores productores de andrógenos, fármacos androgénicos
c. Otros: malformaciones múltiples urogenitales sin etiología hormonal: extrofia cloacal, atresia vaginal, etc.
3. ADS con cariotipo 46XY (anteriormente pseudohermafroditismo masculino):
a. Anomalías o trastornos desarrollo gonadal (testículo):
i. Disgenesia gonadal completa (síndrome de Swyer) o parcial
ii. Síndrome de regresión testicular
iii. ADS ovotestes o quimera ovotesticular
b. Anomalías de la síntesis o de la acción de los andrógenos:
i. Mutaciones del gen LH-beta (síntesis de LH anómala)
ii. Mutaciones del gen LHCGR (aplasia o hipoplasia de las células de Leydig)
iii. Déficits enzimáticos en la biosíntesis de la testosterona a nivel testicular y suprarrenal
iv. Déficits enzimáticos en la biosíntesis de la testosterona a nivel exclusivamente testicular
v. Anomalías en la acción de los andrógenos: déficit 5-alfa reductasa, insensibilidad a andrógenos
c. Anomalías en la síntesis o la acción del factor inhibidor de los conductos de Müller:
i. Déficit de la hormona antimülleriana (gen AMH)
ii. Resistencia a la hormona antimülleriana (gen AMHR)
d. Otros: síndromes polimalformativos que asocian anomalías del desarrollo genital: anomalías cloacales, síndrome de Robinow, Aarskog, pie-mano-genital, hipospadias aislado, criptorquidia
ADS: anomalías de la diferenciación sexual.

1.3.1. Desórdenes en la acción o síntesis de hormona

1.3.1.1. Biosíntesis de andrógenos

Los andrógenos testosterona y DHT pertenecen al grupo de hormonas esteroides. El principal andrógeno circulante es la testosterona que se sintetiza a partir del colesterol en las células de Leydig de los testículos. La producción de testosterona en los testículos fetales humanos comienza durante la sexta semana de embarazo. La diferenciación de las células de Leydig y la biosíntesis temprana de testosterona en los testículos fetales son independientes de la hormona luteinizante (LH) (29–32). La síntesis y liberación de LH está bajo el control del hipotálamo a través de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) e inhibida por la testosterona a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (33). La conversión de colesterol en testosterona implica varios pasos, de los cuales el primero incluye la transferencia de colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna por la proteína

reguladora aguda esteroideogénica (StAR) y la posterior escisión de la cadena lateral del colesterol por la enzima P450_{scc} (34). Esta conversión da como resultado la síntesis de pregnenolona, un paso limitante en la biosíntesis de testosterona. Los pasos posteriores requieren varias enzimas que incluyen, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17 α -hidroxilasa/C17-20-liasa y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Figura 3).

VÍAS DE BIOSÍNTESIS DE ANDRÓGENOS

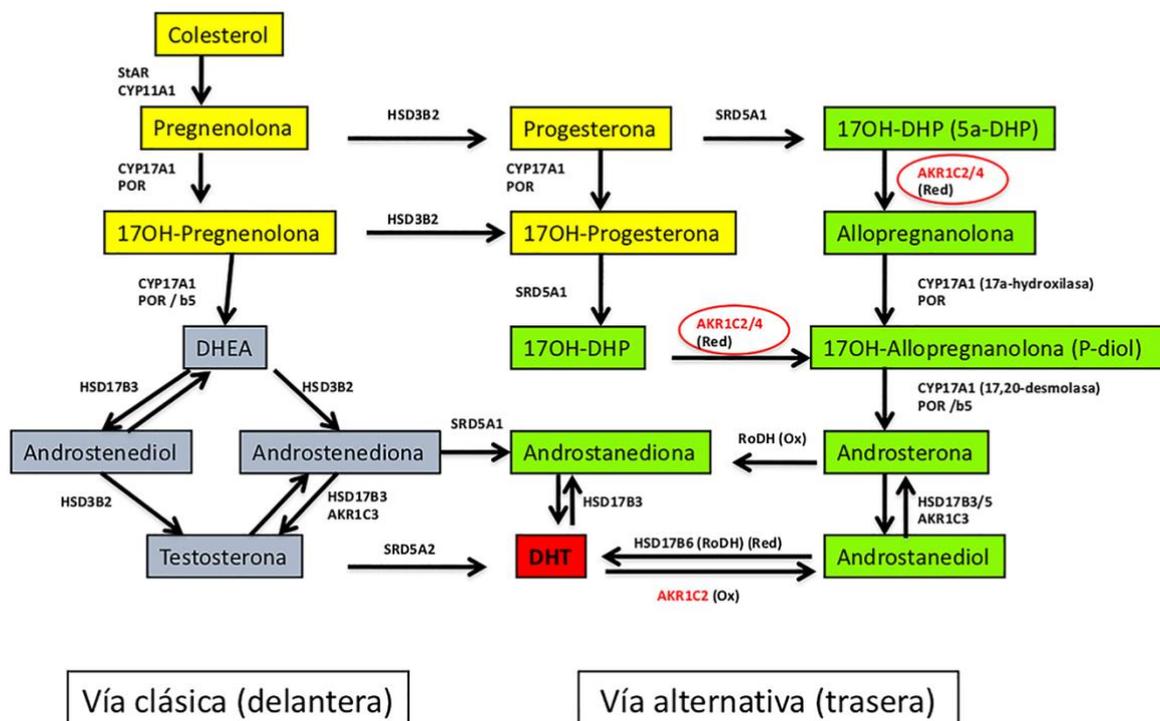


Figura 3. Vía del metabolismo de andrógenos. La síntesis de testosterona puede llevarse a cabo a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona (ruta Δ 5) o a partir de la 17-hidroxi-progesterona (ruta Δ 4). Tomada de Schiffer y cols. (35).

1.3.1.2. Metabolismo de Testosterona - Dihidrotestosterona (DHT)

El metabolismo de la testosterona a DHT ocurre a través de la vía clásica (Figura 3), la cual es esencial para el inicio de la diferenciación y el desarrollo del seno urogenital en la próstata. La diferenciación de los genitales externos masculinos (pene, escroto y uretra) también depende en gran medida de la conversión de testosterona a DHT en el tubérculo urogenital, las inflamaciones labio escrotales y los pliegues urogenitales (19). En investigaciones recientes ha habido un interés considerable en

la vía alternativa o "puerta trasera" de producción de DHT (36). Se ha encontrado que esta vía tiene un papel importante en la masculinización normal del feto y la virilización anormal del feto femenino en casos de hiperplasia suprarrenal congénita resultante de mutaciones en la enzima citocromo P450 oxido-reductasa (37,38). La conversión irreversible de testosterona a DHT está catalizada por la enzima microsomal 5α -RD2 dependiente de NADPH (Figura 4) (39).

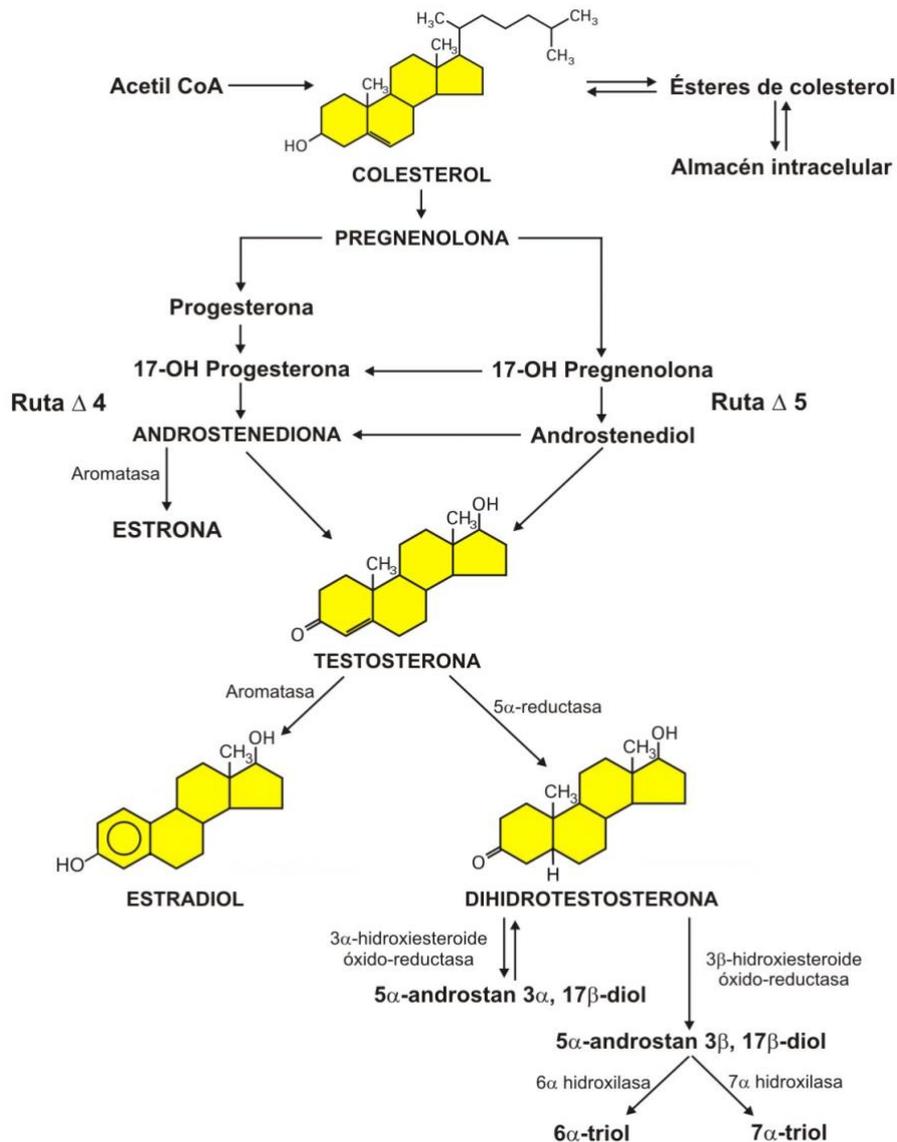


Figura 4. Conversión de testosterona a DHT. Tomada de Rojas-Durán y cols. (40).

El gen *SRD5A2* codifica una proteína de 254 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 28.4 KDa (41,42). La parte NH₂-terminal de la proteína contiene un subdominio involucrado en la unión de testosterona, mientras que la región COOH-terminal está involucrada en la unión de NADPH (43).

El gen está ubicado en el cromosoma 2 en el locus 2p23. El gen de la *SRD5A2* está conformado por cinco exones codificantes (41). La enzima tiene un pH óptimo a 5.5 en preparaciones de células, pero puede funcionar de manera óptima en el estado nativo en células intactas a pH neutro y tiene una K_m aparente para la testosterona de 4-50 nM. La K_m aparente para NADPH es de 3-10 mM. Se observa una alta expresión de *SRD5A2* en el tejido prostático. Se ha descubierto que las mutaciones y deleciones en el gen *SRD5A2* son la base molecular del síndrome de deficiencia de la enzima 5 α -reductasa. La isoenzima 5 α -reductasa tipo 1 (5 α -RD1, *SRD5A1*), que también cataliza la conversión de testosterona en 5 α -dihidrotestosterona, se diferencia de la isoenzima tipo 2 en su composición de aminoácidos, cinética, propiedades bioquímicas, especificidad del sustrato, distribución tisular y pH óptimo. Además, la enzima tipo 1 no participa en la diferenciación sexual masculina dependiente de andrógenos. El gen *SRD5A1* codifica una proteína de 259 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 29.5 KDa (44,45). El gen está ubicado en el cromosoma 5 en el locus 5p15. La K_m aparente para la testosterona es 1-5 mM y para NADPH 3-10 mM. La expresión de 5 α -RD1 en tejido prostático es relativamente baja. La diferencia en el pH óptimo entre las enzimas 5 α -RD tipo 1 y tipo 2 se puede utilizar como diagnóstico para la evaluación diferencial de las isoenzimas individuales en fibroblastos de piel genital de pacientes con el síndrome de deficiencia de 5 α -RD (41,44,46,47).

1.3.1.3. Mecanismo de acción de los andrógenos

El modelo actual para la acción de los andrógenos implica un mecanismo de varios pasos, como se muestra en la Figura 5. Tras la entrada de testosterona en la célula diana, se produce la unión al AR, ya sea directamente o después de su conversión en 5 α -DHT.

El AR pertenece a la familia de receptores nucleares. Las acciones de los andrógenos están mediadas por el AR (también conocido como NR3C4; subfamilia de receptores nucleares 3, grupo C, gen 4). Estos receptores se unen a factores de transcripción dependientes de ligando y pertenece a la superfamilia de 48 receptores nucleares humanos conocidos. El AR es necesario para la diferenciación sexual masculina y la maduración sexual que finalmente conduce al desarrollo de un testículo maduro capaz de soportar la espermatogénesis y la producción de testosterona, procesos que forman la base de la fertilidad masculina. El AR humano está codificado por un solo

gen localizado en el cromosoma X ubicado en Xq11-12, que codifica una proteína de 919 aminoácidos, miembro clásico de la gran superfamilia de receptores nucleares que incluye a receptores de los cinco esteroides de mamíferos (andrógenos, estrógenos, progesterona, glucocorticoides, mineralocorticoides), así como a hormonas tiroideas, ácido retinoico y vitamina D y numerosos receptores huérfanos donde el ligando no se ha identificado originalmente (48,49). La expresión del AR no se limita a los tejidos reproductivos y se expresa de manera ubicua, aunque los niveles de expresión y sensibilidad a los andrógenos de los tejidos no reproductivos son muy variados.

El AR tiene una ubicación predominantemente nuclear a diferencia de otros receptores de esteroides que se distribuyen más a menudo uniformemente entre el citoplasma y el núcleo cuando no se unen a sus ligandos afines. El AR se une a la testosterona o a su metabolito activo DHT. La unión del ligando conduce al desprendimiento de proteínas de choque térmico 70 y 90 que actúan como chaperonas moleculares para el AR sin ligando (50). La unión al receptor es seguida por la disociación de los complejos de proteínas chaperonas (p. ej., proteínas de choque térmico) en el citoplasma, acompañadas simultáneamente por un cambio conformacional de la proteína receptora que da como resultado una transformación y una translocación al núcleo. El complejo de chaperonas y proteínas asociadas a chaperonas se denomina colectivamente "foldosoma" y tiene funciones más allá del papel clásico en el citosol. El foldosoma puede, por ejemplo, afectar la translocación nuclear y la expresión del gen objetivo (45,46).

Después de la disociación de las proteínas de choque térmico (HSP), el receptor ingresa al núcleo a través de una señal de localización nuclear intrínseca y se une como un homodímero a elementos de ADN específicos presentes como potenciadores corrientes arriba de los genes diana de los andrógenos. La unión de andrógenos al Dominio de Unión al ligando LBD y la dimerización facilitan la unión del receptor cargado de ligando a segmentos de ADN que presentan un motivo palindrómico característico conocido como elemento de respuesta a andrógenos, ubicado en las regiones promotoras de genes diana de andrógenos. La unión específica del complejo del AR-ligando dimerizado a los elementos de respuesta a andrógenos en tándem inicia la transcripción génica, de modo que el AR actúa como un factor de

transcripción activado por ligando. Al unirse en el núcleo a secuencias específicas de ADN, el receptor se dimeriza con una segunda molécula y la entidad homodímera recluta más proteínas adicionales (p. ej., coactivadores, factores de transcripción generales, ARN polimerasa II) a través de motivos de interacción específicos (puente de comunicación entre el receptor y varios componentes de la maquinaria de transcripción) (51). Esto finalmente da como resultado la activación transcripcional o la supresión de genes sensibles a andrógenos específicos (52). La unión directa e indirecta del AR con varios componentes de la maquinaria de transcripción (p. ej., ARN polimerasa II (ARN Pol II), factores de transcripción generales (GTF) son eventos clave en la señalización nuclear. Esta comunicación desencadena la síntesis posterior de ARNm y, en consecuencia, la síntesis de proteínas que da como resultado respuestas de andrógenos. De este modo, la activación transcripcional del AR está gobernada por un gran número de correguladores cuya distribución tisular y modulación de la acción de los andrógenos aún no se conocen por completo (53,54).

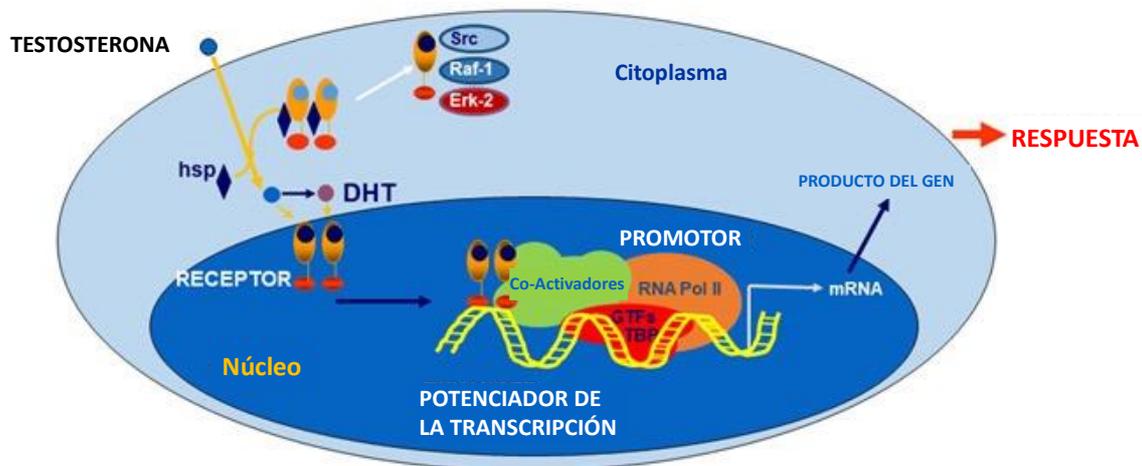


Figura 5. Modelo simplificado de la acción de los andrógenos en una célula diana de andrógenos. Tomado de McEwan y cols (55). Abreviaturas: DHT, dihidrotestosterona; hsp, proteína de choque térmico por sus siglas en inglés (heat shock protein); TBP, proteína de unión a TATA; GTFs, factores de transcripción generales; RNA Pol II, RNA polimerasa tipo II; Src, proteína tirosina quinasa no receptora; Raf-1, protooncogén serina/treonina-proteína quinasa; Erk-2, Extracellular Signal-Regulated Kinase 2.

La testosterona es el andrógeno más abundante en el suero. La testosterona es sintetizada por las células de Leydig de los testículos bajo el control de la LH (56,57). En los fetos masculinos, la testosterona se une al AR y promueve la diferenciación del

conducto de Wolff en los genitales internos masculinos, incluidos el epidídimo, los conductos deferentes y vesículas seminales. El complejo testosterona-AR también es esencial para inducir la psicosexualidad masculina que comienza durante la etapa temprana del desarrollo embrionario (58–60). Intracelularmente, testosterona se convierte en DHT, andrógeno más potente que tiene 2-5 veces mayor afinidad por AR y 10 veces más potente de inducir la señalización de AR que la testosterona. Lo que significa que sus efectos son diferentes pero complementarios (61,62). En el útero de la madre, la DHT es crucial para el crecimiento de la glándula prostática y para la diferenciación de los genitales externos masculinos (63,64)

Sin embargo, la testosterona puede compensar esta potencia androgénica "más débil" durante la diferenciación sexual y el desarrollo de las estructuras del conducto de Wolff a través de concentraciones locales elevadas debido a la difusión de los testículos situados cerca. En las estructuras más distales, como el seno urogenital y el tubérculo urogenital, la señal de testosterona se amplifica mediante la conversión a DHT. En otras palabras, la virilización de los genitales externos depende de AR en funcionamiento y DHT que, a su vez, depende de testosterona como sustrato para la conversión. Los esteroides son un tipo particular de lípidos, que se reducen en 5α a esteroides más potentes por las 5α -RDs (65). Básicamente, los sustratos para la 5α -RDs son los esteroides 3-oxo (3-ceto), Δ 4,5 C1/C21 que incluyen testosterona, progesterona, cortisol y aldosterona como ejemplos. La reacción implica una rotura estereoespecífica e irreversible del doble enlace entre los carbonos 4 y 5 (delta 4,5) con la ayuda del cofactor NADPH y la inserción de un anión hidruro en la cara α en el carbono C-5 (reducción 5α) (46,65). No obstante, aún se desconoce gran parte del papel fisiológico de los esteroides reducidos en 5α .

1.3.1.4. Mutaciones en el receptor de andrógenos

Las mutaciones en el AR son relativamente comunes con más de 1000 mutaciones diferentes registradas en 2012 en la base de datos de McGill (<http://androgendb.mcgill.ca/>) (66), lo que hace que la insensibilidad a los andrógenos sea la forma más frecuente de resistencia hormonal genética. Debido a que el AR es un gen cromosómico X, las mutaciones en este gen funcionalmente significativas se expresan de manera efectiva en todos los varones afectados porque son hemicigotos. Por el contrario, las mujeres que portan estas mutaciones (incluidas las madres heterocigóticas obligadas de

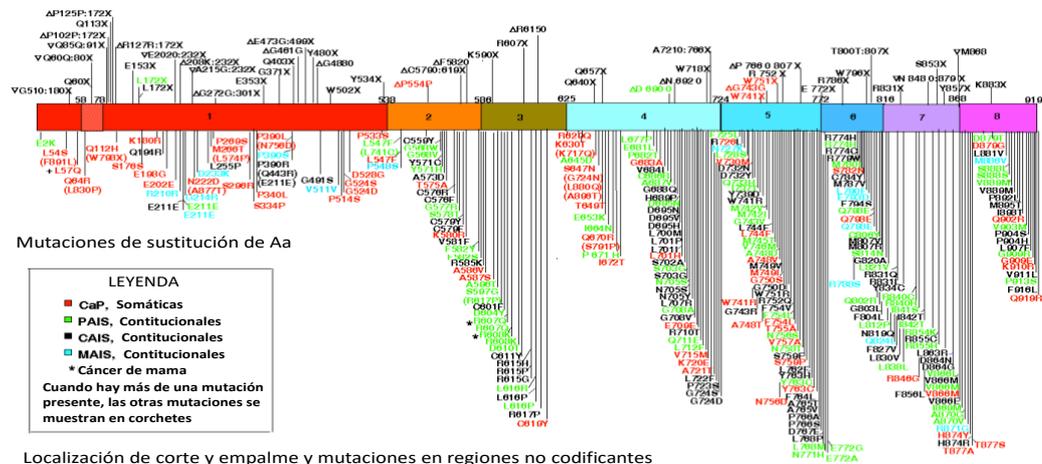
los varones afectados) son portadoras silenciosas sin ningún fenotipo evidente porque tienen un alelo de equilibrio y sus niveles de testosterona circulante nunca aumentan a niveles masculinos post-puberales, suficientes para activar a los andrógenos mediante su receptor.

Las mutaciones de AR en la línea germinal producen un espectro muy amplio de efectos, desde polimorfismos funcionalmente silenciosos hasta síndromes de insensibilidad a los andrógenos que muestran fenotipos proporcionales al deterioro de la función de AR y, por lo tanto, al grado de déficit en la acción de los andrógenos (67). Estas manifestaciones clínicas se extienden desde un síndrome de insensibilidad a los andrógenos completo (CAIS, antes conocido como feminización testicular) que produce un fenotipo externo femenino bien desarrollado en un espectro que abarca todos los grados de fenotipo masculino poco virilizado hasta, en el otro extremo, un fenotipo masculino prácticamente normal. La gravedad de la insensibilidad a los andrógenos se puede categorizar de manera más simple como completa, parcial y leve, aunque también se describe de acuerdo con la clasificación Quigley de siete etapas, basada en el grado de hipospadias, desarrollo fálico, fusión labioescrotal y vello púbico/axilar (68).

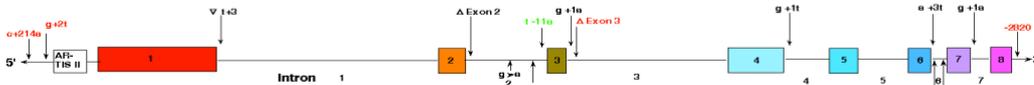
El grado de desarrollo derivado del seno urogenital junto con el descenso de los testículos proporciona pistas clínicas sobre el grado de sensibilidad a los andrógenos. Además, las mutaciones somáticas del AR, en particular generadas durante el tratamiento de privación de andrógenos en cáncer de próstata, dan como resultado la generación y expresión de mutaciones y variantes de corte y empalme del receptor de andrógenos en una forma de evolución molecular acelerada que puede resultar en resistencia a los efectos de los andrógenos y/o eficacia del tratamiento de privación de andrógenos (54,69).

MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Mutaciones de terminación prematura o 1-6 bp Δ or γ



Localización de corte y empalme y mutaciones en regiones no codificantes



Localización de mutaciones en intrones

Figura 6. Las mutaciones en el receptor de andrógenos son relativamente comunes con más de 1000 mutaciones diferentes registradas tomada en la base de datos (<http://androgendb.mcgill.ca/>).

1.3.1.5. Síndrome clínico: Deficiencia por 5α-reductasa tipo 2

Las isoenzimas 5α-RD1 y 5α-RD2 son enzimas asociadas a la membrana (microsomales). Ambas enzimas catalizan la misma reacción (reducción de 5α-esteroides), pero sólo comparten un grado limitado de homología en la secuencia de proteínas. Se encuentran ubicadas en diferentes cromosomas, desempeñan funciones bioquímicas distintivas y se expresan en diferentes tejidos (47,70). La enzima 5α-RD1 es expresado en cuero cabelludo fetal y piel no genital. La expresión de 5α-RD1 es de 5 a 50 veces mayor en adultos que en fetos, lo que sugiere que la enzima no está relacionada con el desarrollo fetal masculino (70). Por otro lado, la enzima 5α-RD2 se expresa altamente en próstata fetal. Después del nacimiento, la enzima 5α-RD1 se expresa en más tejidos, incluidos el hígado, la piel, el cuero cabelludo y la próstata, mientras que la enzima 5α-RD2 se expresa en la próstata, las vesículas seminales, el epidídimo y el hígado (22,65,71).

El primer ADNc aislado de esta enzima fue de hígado de rata y se denominó 5α-RD1 y el segundo ADNc (de próstata humana) se denominó 5α-RD2 (41,47). Las isoenzimas 5α-RD1 y 5α-RD2 están codificadas por los genes *SRD5A1* y *SRD5A2*,

respectivamente. Ambos genes tienen estructuras similares, con cinco exones codificantes separados por cuatro intrones (72,73). La posición de los intrones es esencialmente idéntica. Comparten aproximadamente el 60% de la identidad de secuencia, lo que indica la posibilidad de un gen precursor común durante la evolución (46).

Recientemente, con el desarrollo del análisis del perfil de expresión génica de todo el genoma, se identificó un tercer gen *SRD5A3* ubicado en 4q12 que codifica una proteína de 318 aminoácidos, la enzima 5 α -RD tipo 3. La deficiencia congénita de *SRD5A3* se ha relacionado con un trastorno autosómico recesivo clasificado como enfermedades raras, en el que los pacientes nacen con retraso mental y defectos cerebelosos y oftalmológicos. Esta alteración implica la reducción del doble enlace terminal de poliprenoles a dolicoles, un paso importante en la N-glicosilación de proteínas. La glicosilación de proteínas ligadas a N implica la adición de un glicano de 14 azúcares para seleccionar residuos de asparagina en una proteína naciente para facilitar el plegamiento y el tráfico adecuados de la proteína y ocurre en las membranas del retículo endoplásmico. Este trastorno forma parte de la familia de trastornos congénitos de la glicosilación y fue descrito por primera vez en una familia de los Emiratos Árabes Unidos (74).

El principal gen es *SRD5A2*, del que se han informado diversas variantes alélicas en individuos con deficiencia de 5 α -RD2, una rara afección de la diferenciación sexual entre individuos 46, XY resultante de una conversión defectuosa de testosterona a DHT (42,70,72,75,76). Estos hallazgos pusieron de manifiesto un defecto generalizado en la conversión de testosterona a DHT en individuos con un raro trastorno de diferenciación sexual masculina, denominado deficiencia de la enzima 5 α -RD2 (23,77).

El papel de las otras 5 α -RDs en las enfermedades en el humano aún no se comprende completamente. Las isoenzimas de las 5 α -RDs catalizan irreversiblemente la reducción del anillo A de los esteroides a base de pregneno, que incluyen glucocorticoides y andrógenos. Como 5 α -RD1 se expresa en gran medida en el hígado, la alteración de 5 α -RD1 podría afectar el metabolismo de los esteroides. En ratones hembra *knockout* para 5 α -RD1 (5 α RD1-KO) la deficiencia de 5 α -RD1 resultó en un deterioro del aclaramiento de glucocorticoides, lo que dio como resultado que los animales presentaran intolerancia a la glucosa y esteatosis hepática tras un reto

metabólico (78). Del mismo modo, la hipótesis de que la inhibición de 5 α -RD1 causa disfunción metabólica en humanos se probó en un estudio paralelo controlado, aleatorizado, doble ciego que comparó los efectos de la insulina del uso de finasterida (inhibidor específico de 5 α -RD2) y dutasterida (inhibidor de 5 α -RD1 y 5 α -RD2). La dutasterida pudo modular la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos humanos (79). El papel de 5 α -RD3 en enfermedades humanas es incluso más reciente. Se han reportado mutaciones bialélicas en el gen *SRD5A3* en individuos con trastornos congénitos de la glicosilación, eventualmente asociados con características oftalmológicas y neurológicas (Tabla 1) (80,81).

Tabla 3 Características de la familia de 5 alfa reductasas

PROPIEDADES	5 α RD-1	5 α RD-2 (MIM607306)	5 α RD-3
Tamaño	259 aa	254 aa	318 aa
Peso Molecular	29.5 kDa	28.4 kDa	36.5 kDa
pH óptimo	6-8.5	5-5.5	6.5-6.9
Estado Bioquímico	Hidrofóbica	Hidrofóbica	Hidrofóbica
Distribución Tisular	Glándulas Sebáceas de la piel, cáncer de próstata, fibroblastos, folículo capilar, hígado y cerebro	Próstata, epidídimo, vesículas seminales, piel de los genitales,	Próstata maligna, cancer de próstata, cancer de mama, carcinoma hepático, cerebro, entre otros tejidos
Expresión en Próstata	(alta en HPB y cáncer	Alta en desarrollo fetal	Alta en adulto
Nombre del gen	SRD5A1	SRD5A2	SRDA3
Localización cromosomal	5p15	2p23	4q12

Stikes, Rusell, 2010, Batista 2020, Xio 2021, Thigpen, 1992, Anderson, 1991, Azzouni 2012

En 1961, Nowakowski y Lenz nombraron como pseudovaginal, hipospadias perineoescrotal a un trastorno del desarrollo sexual que afecta a individuos con cariotipo 46, XY. El fenotipo informado incluyó genitales externos similares a los femeninos, testículos bilaterales y tractos urogenitales masculinos en los que los conductos eyaculadores terminaban en una vagina ciega (82).

La deficiencia de 5 α -RD2, fue reportada en 13 familias de una pequeña comunidad de la República Dominicana y dos hermanos de América del Norte (23,77). Todos los afectados eran varones con ambigüedad de genitales externos, caracterizados por la presencia de genitales externos ambiguos con un falo de aspecto clitoriano, hipospadias, escroto bífido y seno urogenital persistente con un orificio vaginal perineal ciego; por lo que al nacer fueron educados como niñas. Sin embargo, todos presentaron cambios importantes al llegar a la pubertad de fenotipo masculino (incremento de masa muscular, cambio de voz, alargamiento del falo, descendencia testicular y ausencia de ginecomastia). Ambos estudios caracterizaron este síndrome con un patrón de herencia autosómico recesivo, resultante de la incapacidad para convertir la testosterona en DHT, con una amplia gama de ambigüedad genital al nacer y virilización pronunciada en la pubertad. Posteriormente, se descubrió que los defectos en la enzima 5 α -RD2 surgen de mutaciones en el gen *SRD5A2*. Gracias a estos estudios, se caracterizó al gen, conformado por cinco exones y cuatro intrones, asimismo se observaron variantes alélicas en todo el gen (42,72).

1.3.1.5.1. Características clínicas del síndrome de deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2

Los individuos 46, XY con deterioro de la 5 α -RD2 2 tienen estructuras derivadas del conducto de Wolff normalmente virilizadas, con vesículas seminales (aunque también se han informado pequeñas vesículas seminales), con conductos deferentes, epidídimos y conductos eyaculatorios y sin estructuras derivadas del conducto de Müller (64). Sin embargo, no se observa diferenciación del seno urogenital y el tubérculo genital, lo que resulta en ausencia de próstata y en genitales externos ambiguos o femeninos al nacer. Por lo tanto, las personas afectadas de 46, XY a menudo son educadas como niñas. En la pubertad, todos los individuos afectados muestran algún un grado de virilización que a menudo resulta en un tono de voz más grave, un aumento de la masa muscular, crecimiento del pene, desarrollo escrotal, descenso testicular y, en ocasiones, conduce a un cambio de género.

1.3.1.5.2. Base molecular del síndrome de deficiencia de 5 α -reductasa tipo 2

El análisis genético de la deficiencia de 5 α -RD2 se hizo posible gracias a la clonación del ADNc. La enzima está codificada por cinco exones y el método más confiable para detectar mutaciones genéticas es a través de la secuenciación de cada exón (45).

Es interesante que en todo el mundo se hayan detectado 124 mutaciones diferentes en el gen *SRD5A2* en pacientes con el síndrome de deficiencia de 5 α -RD2 en varios grupos étnicos (Figura 7) (83–93). Se han informado mutaciones idénticas en diferentes grupos étnicos y se puede considerar que algunas de ellas se deben a un efecto fundador y otras se han producido de *nov*o (89). Las mutaciones se han encontrado a lo largo de los cinco exones del gen y comprenden 33 sustituciones de aminoácidos (78.5% de los casos reportados), una delección completa del gen (12), dos pequeñas delecciones que resultan en un codón de parada prematuro o en una delección de residuo de aminoácido inferior, cinco mutaciones sin sentido y una mutación del sitio donante de empalme en el intrón 4, lo que resulta en un empalme aberrante (Figura 7). La mayoría de los pacientes identificados fueron homocigotos para una de las mutaciones. Un número menor de pacientes parecía ser heterocigoto compuesto, mientras que también un pequeño grupo de pacientes era heterocigoto. En general, los varones portadores de un solo alelo mutante tienen una fertilidad normal, como es el caso de las portadoras. Las familias más grandes investigadas se encontraron en la República Dominicana, Turquía y Nueva Guinea (19). En las tres familias, la alta incidencia puede estar directamente relacionada con un efecto fundador y en poblaciones geográficas aisladas con un alto grado de endogamia.

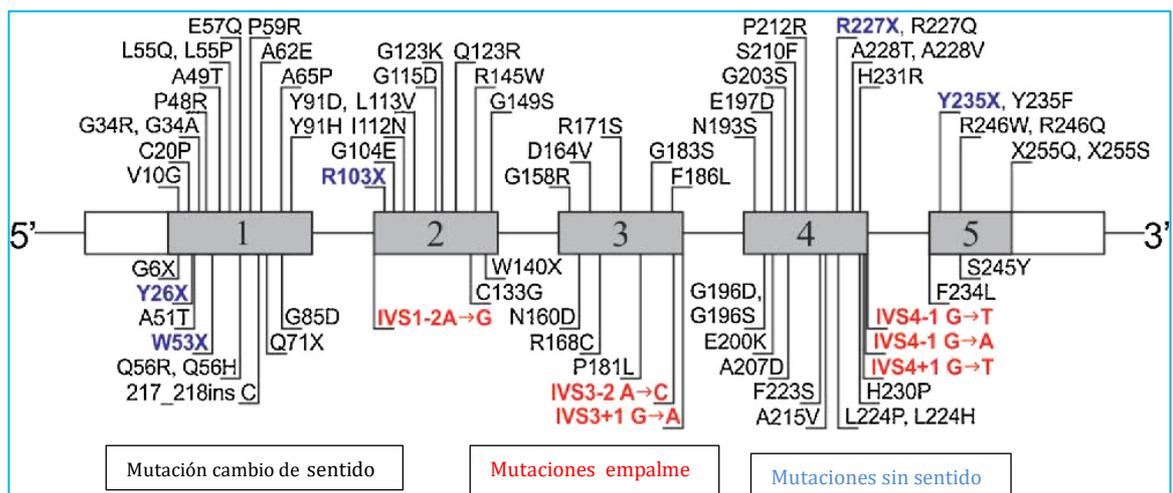


Figura 7. Mutaciones reportadas en el gen codificante para la enzima 5 α -reductasa tipo 2 en pacientes con síndrome de deficiencia de 5 α -RD2. Se han reportado mutaciones y variaciones genéticas en los 5 exones que conforman el gen. Tomado de RamosL. 2020, Lujun Fan, 2020

La actividad enzimática alterada de 5 α -RD2 resulta de homocigotos o variantes alélicas heterocigotas compuestas. Inicialmente, este trastorno se informó en grupos de todo el mundo en individuos de grupos étnicos específicos. Actualmente existen una gran variedad de informes de individuos afectados con una diversidad de orígenes étnicos y provenientes de varias áreas geográficas, lo que sugiere que la deficiencia de 5 α -RD2 tiene una distribución mundial. Los defectos en la enzima 5 α -RD2 se han informado en individuos con varios grados de subvirilización, que van desde los genitales externos femeninos típicos hasta hipospadias o micropene aislado. Las causas de los fenotipos divergentes aún no están claras. De manera interesante, se sabe que la deficiencia de 5 α -RD2 cuenta con una amplia variabilidad fenotípica, incluso en individuos afectados portadores de la misma mutación en *SRD5A2* (76,94).

Actualmente se han identificado alrededor de 450 casos de deficiencias de 5 α -RD2 en 44 países. La mayoría son de Turquía (23%), China (17%), Italia (9%) y Brasil (7%). Sesenta y nueve por ciento fueron asignados como mujer. Encontrándose un 70% de variantes alélicas homocigóticas y un 30% de heterocigóticas compuestas. La mayoría eran variantes sin sentido (76%). Sin embargo, se han reportado pequeñas deleciones (11%), empalmes (5%) y deleciones grandes (4%). Se distribuyeron junto con todos los exones con exón 1 (33%) y predominio del exón 4 (25%). La tasa general de cambio de género de mujer a hombre se ha reportado entre 16% al 70%. La tasa más baja de cambio de género de mujer a hombre ocurre en Turquía y el más alto en Brasil. La gran mayoría de los casos (86%) fueron reportados por países con economías altas y medias-altas. La ausencia de informes de países de bajos ingresos es tal vez debido a varias razones, como las barreras para el diagnóstico molecular, el acceso científico y la atención de asistencia médica especializada.

2. Objetivo

Identificar y caracterizar a nivel genómico las mutaciones en dos pacientes mexicanos con alteraciones en la diferenciación sexual masculina por deficiencia de 5 α -RD2.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros hormonales en pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual por deficiencia de 5 α -RD2
- Caracterizar mediante estudios moleculares las posibles mutaciones del gen de la enzima 5 α -RD2 en pacientes con trastornos en la diferenciación sexual masculina
- Correlacionar las alteraciones en la secuencia encontradas en el gen *SRD5A2* con la actividad enzimática mediante mutagénesis dirigida
- Predecir mediante modelos *in silico* el impacto de las mutaciones genéticas encontradas en la estructura terciaria de la enzima 5 α -RD2

3. Hipótesis

Las mutaciones en el gen *SRD5A2* darán como resultado una baja actividad de la enzima, provocando una correlación genotipo-fenotipo congruente con la alteración presente en los pacientes con DSD.

4. Justificación

Los DSD son condiciones congénitas con discrepancias entre el sexo cromosómico, gonadal y fenotípico del individuo. Estos trastornos históricamente han sido difíciles de precisar, ocasionando diagnósticos imprecisos que resultan en un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes y sus familiares. Las alteraciones de los genitales externos son condiciones que deben considerarse una emergencia médica y social por los serios problemas psicológicos que pueden ocasionar al individuo y a su entorno familiar, pues dependiendo del sexo que se le asigne al nacimiento se condicionará su adecuado desarrollo desde el punto de vista sexual, psicológico y social.

Muchos factores juegan un papel importante en el desarrollo de la psicosexualidad humana, tales como exposición a andrógenos, sexo de crianza, factores socioculturales y ambientales. Para la mayoría de los pacientes con condiciones de DSD, dar un diagnóstico molecular y genético en etapas temprana de la vida permitirá una vida saludable e identidad de género confiable, permitiendo un mejor desarrollo para la vida adulta.

El genotipo asociado a una incongruencia fenotípica ocurre incluso en individuos portadores de la misma variante y también en individuos de la misma familia, lo que sugiere que otros factores más allá de la enzima 5 α -RD2 juegan un papel en el fenotipo. Estos factores aún no están claros y constituyen un campo relevante para investigación futura.

Es por ello, relevante llevar a cabo un diagnóstico molecular temprano en pacientes con DSD y caracterizar las consecuencias de las alteraciones producidas, con el objeto de tomar decisiones al nacimiento de los afectados y que éstos puedan desarrollarse mejor sexual, psicológica y socialmente. De este modo, gracias a las nuevas tecnologías genéticas y genómicas podemos generar un mayor conocimiento del mecanismo subyacente de los DSD, abriendo nuevas vías para el diagnóstico clínico en etapas cada vez más tempranas del recién nacido.

5. Material y métodos

5.1. Participantes

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Juárez de México (HJM-225/96) y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes o tutores legales correspondientes.

Sujeto 1. Este paciente pertenecía a una familia originaria de Altotonga, Veracruz. La familia estaba conformada por: cinco hijas, un hombre sano y tres afectados (de 20, 18 y 8 años). El sujeto 1 tenía 8 años. Fue evaluado después de obtener el consentimiento informado voluntario de sus padres y el consentimiento del participante que era menor de 18 años. Fue remitido para estudios moleculares debido a manifestaciones de ambigüedad genital y características de laboratorio indicativas de deficiencia de 5α - RD2 (Figura 8A).

Sujeto 2. Este paciente tenía una edad de 50 años al momento de ingresar al Hospital Juárez de México, la familia a la que pertenecía es originaria de Hidalgo.

La familia estaba conformada 13 hijos (seis hijas y siete hijos), de los cuales tres se vieron afectados (de 50, 40 y 28 años) y se criaron como mujeres (Figura 8B). En particular, no hubo consanguinidad conocida o antecedentes de la enfermedad en las familias de los dos pacientes estudiados

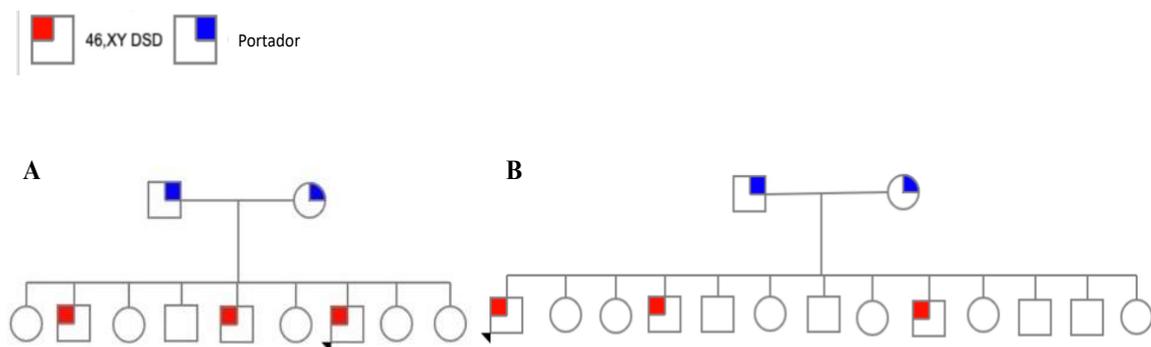


Figura 8. Pedigrees de las familias participantes. A Pedigree de familia 1. B Pedigree de familia 2.

5.2. Caracterización clínica

El diagnóstico de deficiencia de 5 α -RD2 se estableció en todos los pacientes mediante examen físico, mediciones de testosterona plasmática (T) y DHT. Se calculó la relación T/DHT y se determinó la presencia del cariotipo 46, XY (95).

5.3. Ensayo hormonal

Las mediciones de T total y DHT se realizaron utilizando kits comerciales de radioinmunoensayo (Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, CA, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de T y DHT se midieron antes y 48 h después de tres inyecciones intramusculares de gonadotropina coriónica humana (hCG) aplicadas cada tercer día usando 1000 UI (muestreo en los días 0, 3 y 5) (95,96). Con los datos de concentraciones de T y DHT en plasma se calculó el cociente T/DHT.

5.4. Análisis molecular del gen SRD5A2

5.4.1. Extracción de ADNg

Se recolectó una muestra de sangre periférica (5 mL) de todos los participantes en tubos con EDTA (0.5 M, pH = 8) y se almacenó en hielo durante el transporte al laboratorio. Se extrajo ADN genómico (ADNg) de las muestras de sangre total, por el método de Miller y cols. (97). El ADNg extraído se disolvió en 300 μ L de amortiguador TE (Tris 1.0 M, EDTA 0.5 M, pH = 8) y se determinó la pureza utilizando un espectrofotómetro, las lecturas se realizaron a 260 nm y 280 nm (se consideró aceptable un cociente 260 nm/280 nm mayor a 1.8) y la integridad se confirmó mediante electroforesis en agarosa al 1%. Las muestras de ADNg se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

5.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la realización de la PCR, se emplearon los oligonucleótidos sintéticos descritos por Labrie y colaboradores en 1992, derivados del gen *SRD5A2* (Tabla 4) (44). En cada uno de los casos se realizó una reacción estándar de 25 μ L que contenía 0.5 μ g de DNAg, 1.2 μ M de cada primer y 15 μ M de dNTP's, ddH₂O, DMSO, amortiguador 10X

(Tris-HCl mM, pH 8.3, KCl 50mM, y Mg₂Cl) y Taq polimerada 1 U (Perkin Elmer). Todos los exones fueron amplificados en un termociclador por PCR punto final en un programa de 25 ciclos (94°C/1 min, 54-65°C /1min y 72°C/1 min) y un ciclo de extensión de 72°C por un periodo de 5 min.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para cada exón del gene SRD5A2 (Labrie, 1992) (44)

	Primer	Secuencia (5'-3')	Fragmento de PCR, (pb)	Temperatura de Alineación
Exón 1	501	5' GCAGCGGCCACCGGCGAGG3'	358	65 °C
	502	5'AGCAGGGCAGTGCGTGCACT3'		
Exón 2	503	5'TGAATCCTAACCTTTCCTCCC 3'	235	58 °C
	504	5' AGCTGGGAAGTAGGTGAGAA 3'		
Exón 3	505	5' TGTGAAAAAGCACCACAATCT 3'	208	58 °C
	506	5' CAGGGAAGAGTGAGAGTCTGG3'		
Exón 4	507	5'TGATTGACCTTCCGATTCTT 3'	232	54 °C
	508	5' TGGAGAAGAAGAAAGCTACGT3'		
Exón 5	509	5' TCGCCACTGCTCCATTATAT 3'	166	58 °C
	510	5' CAGTTTTTCATCAGCATTGTGG 3'		

5.4.3. Polimorfismo conformacional de cadena simple de DNA (SSCP siglas en inglés)

Esta técnica nos permite conocer de manera muy general en dónde se encuentran las mutaciones del gen *SRD5A2*, de acuerdo al procedimiento descrito por Orita y cols (98). Se utilizaron las mismas condiciones descritas para la PCR de punto final, excepto que se añadieron 12 µCi de α³²P dCTP y 12 µM de CTP. La separación de las cadenas de ADN se llevó a cabo en geles neutros de poliacrilamida al 5.4% y al 8%. Un volumen de producto PCR se mezcló con otra cantidad igual de amortiguador de carga (95% de formamida, 89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico y 2 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0.1% de azul de bromofenol, 0,1% de cianol-xileno); esta mezcla fue desnaturalizada a 95°C por 5 min. y se mantuvo en hielo durante 10 min. Los ensayos electroforéticos se realizaron a 280 V, durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente se secó el gel durante una hora a 75-80°C y se expuso por 4 h en placas radiográficas, en pantallas amplificadoras para su posterior revelación.

5.4.4. Secuenciación

Las diferencias de secuencia de codificación en el gen *SRD5A2* se identificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica del exón y el análisis de secuenciación. Los exones 1 a 5 del gen *SRD5A2* se amplificaron mediante PCR utilizando pares de cebadores específicos para cada exón (Tabla 4); los primers utilizados fueron de acuerdo con el diseño de Labrie y cols. (44). Las condiciones del ciclo fueron las siguientes: desnaturalización de 5 min a 95 °C, luego 25 ciclos de 94°C durante 1 min, 54–65°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. El ciclo final fue de 72°C durante 5 min. Los productos de la PCR se analizaron para verificar el tamaño correcto de los fragmentos utilizando electroforesis en agarosa al 1%. Los productos de PCR se secuenciaron usando AmpliCycle Sequencing (Perkin Elmer, EE. UU.), después de ser purificados mediante columnas (columnas Centricon-100; Amicon Inc., Beverly, MA, EE. UU.). Las secuencias resultantes obtenidas de pacientes, controles y padres se compararon con la secuencia de referencia humana NCBI del gen *SRD5A2* (Laboratorio Europeo de Biología Molecular, EMBL; GenBank; y Banco de Datos de ADN de Japón, DDBJ; bases de datos de secuencias de nucleótidos con el número de acceso M74047).

5.4.5. Mutagénesis Dirigida

Se evaluó el papel de la variación genética en la actividad enzimática por mutagénesis dirigida utilizando células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) (American Type Culture Collection, CRL 1573). El ADNc se transfectó en células HEK293. Un vector de expresión comercial que contenía el ADNc de *SRD5A2* de longitud completa humana [GenBank NC_000002.12 (NM_000348.4)] pCMV6-XL1 (Invitrogen) se utilizó como molde de las mutaciones p.Glu197Asp y p.Pro212Arg. Las mutaciones se construyeron utilizando el Kit de mutagénesis dirigida QuikChange™ (Stratagene Ltd., Cambridge, Reino Unido) y cebadores altamente purificados, según las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados fueron 197DF (5'-AATTCCTCGGTGATATCATT GAATGG-3'), 197D (5'-ATTCAATGATATCACCGAGGA AATTGGC-3'), y 212F (5'-TTGGTCCCTCCCGAGCACT TGCATTTGC-3') y 212R (5'-GCAAGTGCTCGGAGG GACCAAGTGG-3') de tipo silvestre y mutante. Los plásmidos se aislaron y purificaron utilizando QIAfilter Protocolo Plasmid Midi y QIAfilter Plasmid Maxi (Qiagen, GmbH, Alemania), de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se

utilizaron enzimas de restricción Sall y NotI para digerir el ADNc de *SRD5A2*, y las digestiones se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los productos mutados fueron transformados en células competentes DH5 α -T1. Los clones positivos fueron recogidos y secuenciados para corroborar que se tenían los clones las variaciones deseadas. Las secuencias de nucleótidos de las construcciones de tipo silvestre fueron verificadas por secuenciación de ADN (AmpliCycle Sequencing, Perkin Elmer, Q). Todos los ADNc de pCMV6-XL1 mutados de longitud completa fueron confirmados por secuenciación de ADN tanto en el sentido como en el antisentido, para validar la mutagénesis específica del sitio y para confirmar que no hubo sustituciones fuera del objetivo.

5.4.6. Transfección y ensayos de actividad de 5 α -reductasa

Las células HEK-293 se conservaron en medio Eagle modificado por Dulbecco y suplementado con suero de ternera fetal al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina. Las transfecciones fueron realizadas en células HEK subconfluentes (2.9×10^6 células/placa), las cuales fueron provistas de 5% de CO₂ a 37°C. Los plásmidos de tipo silvestre y mutantes se transfectaron en las células a una concentración de 2.0 μ g por placa usando DOTAP (reactivo de transfección liposomal, Boehringer Mannheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron enjuagadas con solución salina amortiguada de fosfatos (PBS), 48 h después fueron cosechadas y procesadas para ensayos enzimáticos. La actividad de 5 α -RD2 fue determinada en extractos celulares en amortiguador de Tris-citrato 0.1 M al pH indicado con hormona marcada ¹⁴C-testosterona a una concentración de 1 nM (120 d.p.m. pmol⁻¹) como sustrato, y como cofactor NADPH a 10 mM, con concentraciones en incremento de testosterona (0.125–8.0 μ mol/L) (41). La medición de la actividad de 5 α -RD2 fue realizada por triplicado, y las actividades fueron determinadas de manera indirecta como porcentaje de DHT detectado por HPLC; los resultados se representaron como el porcentaje de conversión de testosterona a DHT (99).

5.4.7. Predicción de efectos funcionales de mutantes y estructurado molecular de *SRD5A2*

La predicción funcional de sustituciones en el gen *SRD5A2* humano fue analizada usando los siguientes programas: PolyPhen2 (Fenotipado de polimorfismo; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), PROVEAN (analizador de efectos de

variación de proteínas; http://provean.jcvi.org/seq_submit.php), SIFT (Clasificación de intolerantes de Sustituciones de aminoácidos tolerantes; http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html), y MUpro (predicciones de estabilidad de cambios de proteínas sobre variaciones genéticas; <http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>).

5.4.8. Modelo conformacional

El modelo humano polimórfico *SRD5A2* fue generado por modelado de homología usando Modeller 10.1, usando los datos de la cristalografía de la proteína *SRD5A2* del banco de datos de proteínas (Protein Data Bank 7bw1) como plantilla (100).

5.4.9. Análisis estadístico

Los datos de actividad fueron evaluados considerando al menos tres réplicas independientes usando el software GraphPad Prism (Versión 9.0; GraphPad Software, Inc.; San Diego, CA, Estados Unidos). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de una vía. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1. Caracterización clínica

6.1.1. Sujeto 1

La familia 1 incluía dos hermanos, de 20 y 18 años, con genitales externos ambiguos. Ninguno de los familiares presentó antecedentes informados de ginecomastia. Según los padres, sus matrimonios no eran consanguíneos. Otros antecedentes relevantes de la condición fueron negados por los padres. El participante fue un niño de 8 años, educado como niña, su situación comenzó desde el nacimiento con la presencia de dos nodulaciones, una a cada lado del tubérculo vaginal, y la presencia del engrosamiento del clítoris, y sin tratamiento. La familia visitó el hospital, donde se realizaron estudios hormonales en el servicio de Reproducción Humana en el Laboratorio de Biología, integrando el diagnóstico del varón con DSD, en el Hospital Juárez de México. El niño presentaba falo corto (longitud 1.5 cm), penoescrotal hipospadias con pseudovagina, hernia inguinal bilateral (testículos bilaterales) dentro de los pliegues labio escrotales, genitales externos con introito vaginal hipoplásico y engrosamiento de los pliegues vaginales y labios mayores, e hipertrofia

del clítoris. escrotal no fusionado se observaron pliegues de bolsa, divididos por una hendidura perineoescrotal, que cuando se introduce una sonda de alimentación infantil se llega a la vejiga. En las bolsas escrotales, se palpaban unas pequeñas nodulaciones (una por bolsa), que era compatible con una gónada de aproximadamente 1 × 1 × 1.2 cm. En los genitales no se observó hiperpigmentación.

6.1.2. Sujeto 2

La paciente 2 es una mujer de 50 años educada como una niña. La ecografía pélvica y la resonancia magnética no revelaron estructuras müllerianas. El paciente fue sometido a gonadectomía.

Los dos participantes fueron asignados al sexo femenino al nacer. El resumen y comparación de los parámetros clínicos y bioquímicos de los dos sujetos se presenta en la Tabla 5. La proporción de T:DHT después de la estimulación con hCG fue elevada en los dos sujetos afectados, que tenían una relación T:DHT >10 (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros bioquímicos y hormonales de los sujetos participantes

	LH (UI/L)	FSH (UI/L)	TESTOSTERONA (NMOL/L)	DHT (NMOL/L)	TASA T/DHT
FAMILIA 1					
SUJETO 1	0.70	0.099	7.6	0.4	18.5
FAMILIA 2					
SUJETO 2	8.0	12.1	22.3	0.5	43.0

6.2. Análisis molecular del gen SRD5A2

El análisis de secuenciación del exón 4 en ambas familias mostró la presencia de dos variantes genéticas en los codones 197 (GAG/GAT) y 212 (CCA/CGA) (Figura 9A). El sujeto 1 era heterocigoto para las variantes genéticas. Ambos padres eran portadores; el padre tuvo un cambio en el codón p.Glu197Asp, y la madre tuvo un cambio en el codón p.Pro212Arg. En particular, el sujeto 2 era homocigoto para la variante genética p.Glu197Asp. En cada familia, los padres eran portadores de las variantes genéticas correspondientes.

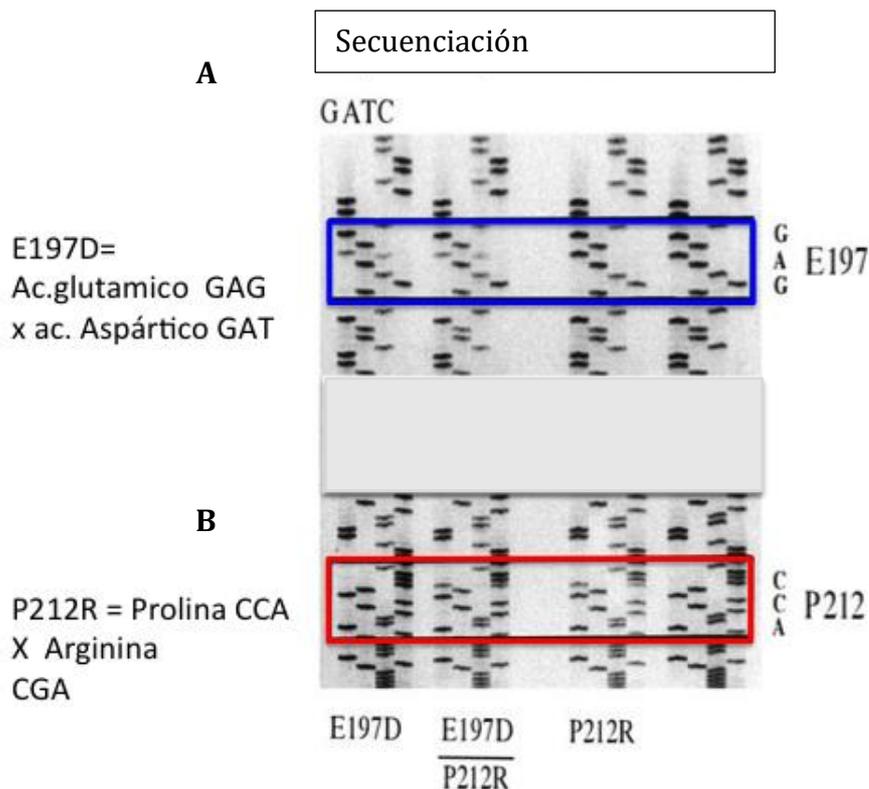


Figura 9. Análisis de secuenciación del exón 4. A. Presencia de la variante genética en el codones 197 (GAG/GAT) y B. 212 (CCA/CGA).

6.3. Actividad biológica de la 5 α -reductasa

Para determinar el efecto de estas variantes genéticas sobre la actividad de 5 α -RD2, se transfectaron construcciones de ADNc que codifican enzimas normales y mutadas en células HEK-293 cultivadas.

En la Figura 10 se presenta una curva representativa que muestra la actividad biológica de las mutaciones en *SRD5A2* para convertir T en DHT. La técnica de mutagénesis dirigida reveló que la presencia de las variantes p.Glu197Asp o p.Pro212Arg conducía a una pérdida total de actividad enzimática. Este estudio describió una familia afectada por una variante homocigota para p.Glu197Asp, que resultó en una pérdida total de la actividad 5 α -RD2 y, en consecuencia, un desarrollo genital anormal en estos pacientes. Las variantes p.Glu197Asp y p.Pro212Arg llevadas en forma de heterocigoto compuesto presentó un total agotamiento de la actividad enzimática (Figura 11).

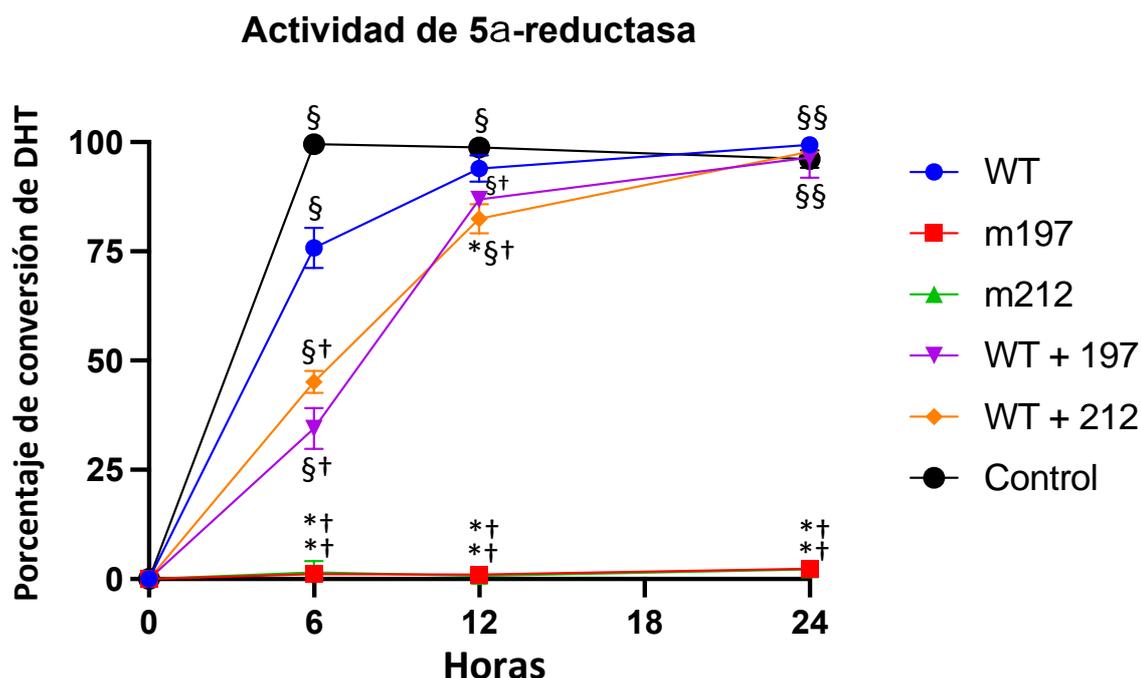


Figura 10. Actividad de la enzima 5 α -reductasa 2 expresada en células HEK293. Las Curvas de saturación de mutantes fueron determinadas mediante la conversión de T [1,2,6,7-3H(N)] a DHT con concentraciones en incremento de T no marcada (0.125–8.0 mmol/L). Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado P < 0.05 *vs. WT; † vs. Control; § vs. m197, m212.

6.4. Predicción de los efectos funcionales de las mutaciones en *SRD5A2* y modelado de estructuras

La mayoría de las predicciones funcionales fueron deletéreas, probablemente dañinas o que afectan a la proteína (Tabla 6). Ambas variantes se encontraron en regiones conservadas (Figura 11). El modelado estructural mostró que el residuo 197 se encuentra en la hélice transmembranal 6 e interactúa con la nicotinamida de NADPH. Por el contrario, el residuo 212 se encuentra en la hélice transmembranal 7 cerca del terminal amino que mira hacia el lumen del retículo endoplásmico (Figura 12). El Consorcio de agregación del exoma (ExAc) informó una frecuencia de 3.5×10^{-4} para la variante genética p.Glu197Asp (rs121434253), y la base de datos de agregación del genoma (gnomAD) informó una frecuencia de 9×10^{-5} . Por el contrario, el ExAc informó una frecuencia de 3.3×10^{-5} para la variante genética p.Pro212Arg (rs121434252), y el gnomAD informó una frecuencia de 1.2×10^{-5} . Las dos variantes patogénicas son raras y se han observado solo en la población mexicana.

Tabla 6. Predicciones funcionales de cambios de aminoácidos detectados en 5a-R2 en las familias estudiadas.

Cambio de aminoácido	Polyphen-2 (Puntaje cercano a 1.0)	PROVEAN (Puntaje < -2.5)	SIFT (Puntaje < 0.05)	CADD (Puntaje)	MUpro (Puntaje < 0)
p.Glu197Asp	Probablemente dañina (0.934)	Deletérea (-2.906)	Afecta la función de la proteína (0.00)	Probablemente benigna (24)	Estabilidad disminuida (-0.788)
p.Pro212Arg	Probablemente dañina (0.988)	Deletérea (-4.997)	Tolerado (0.32)	Probablemente benigna (24)	Estabilidad disminuida (-0.393)



Figura 11. Comparación entre la alineación de secuencias múltiples de la enzima esteroide 5 α -reductasa humana tipo 2 y otras proteínas de secuencia de reductasas de vertebrados. Las mutaciones reportadas en este estudio están sombreadas en azul. Los alineamientos se realizaron con el programa ClustalW (<http://clustalw.genome.jp/>).

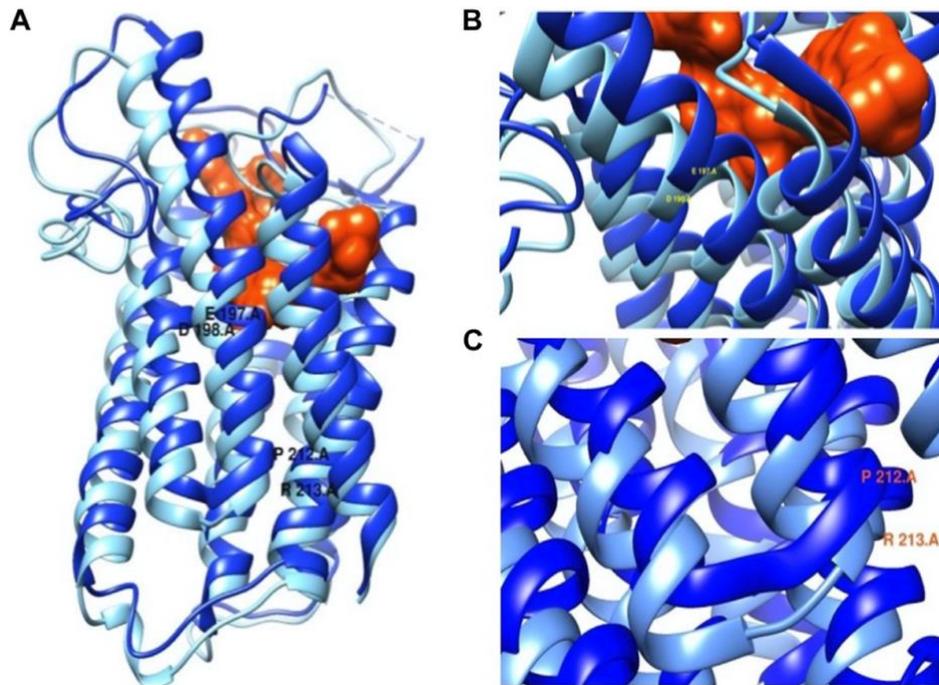


Figura 12. (A) Estructura de la proteína SRD5A2. (B) Acercamiento de la mutación p.Glu197Asp. (C) Acercamiento de la mutación p.Pro212Arg. En azul rey se muestra la proteína no mutada y en azul cielo la proteína mutada. La molécula de finasterida se encuentra unida a la proteína y coloreada en naranja.

7. Discusión

Las alteraciones de los genitales externos son condiciones que deben considerarse una emergencia médica y social por los serios problemas psicológicos que puede ocasionar al individuo y a su entorno familiar, dependiendo del sexo que se le asigne se condicionará si evoluciona adecuadamente desde el punto de vista sexual, psicológico y social (101,102).

La deficiencia primaria de 5 α -RD2 fue originalmente descrita en 1974, desde entonces se han descrito varios casos de pacientes con trastornos de DSD por deficiencia de 5 α -RD2. Actualmente se han reportado 129 variantes alélicas diferentes en el gen *SRD5A2* en la literatura entre individuos con deficiencia de 5 α -RD2. La mayoría son mutaciones sin sentido (n = 83), pequeñas deleciones (n = 12), mutaciones splicing (n = 6), codones de paro (n = 4), pequeñas indels (n = 20) y deleciones mayores (n = 4) (Human Gene Mutation Database en el Instituto de Genética Médica en Cardiff, Gales, Reino Unido: gen *SRD5A2*: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Estas variantes han sido reportadas a lo largo

de todo el gen. Interesantemente, la mayoría de las mutaciones se sitúan en los exones 1 (33 %) y en el exón 4 (25 %) (73,103). En el presente estudio, mostramos dos casos de individuos masculinos con un defecto enzimático de 5 α -RD2 manifestado por ambigüedad de genitales externos al nacer. En ambos casos los pacientes fueron educados como niñas. Las familias de los sujetos residían en áreas geográficas diferentes. La familia 1 de origen del Municipio de Altotonga, del Estado de Veracruz y la segunda familia del Estado de Hidalgo. Cada familia tenía tres hijos afectados, los cuales presentaban DSD 46, XY. Los dos sujetos participantes tenían cariotipo 46, XY y diagnóstico probable de deficiencia de 5 α -RD2.

Desafortunadamente, en México es frecuente encontrar pacientes que tienen muy poca información sobre su ascendencia, lo cual dificulta el diagnóstico del patrón de herencia y la inferencia de la homocigosidad para genes poco frecuentes en los trastornos de diferenciación sexual. El asesoramiento genético ocupa un lugar relevante en la atención de los DDS, ya que implica el manejo de información que la mayoría de las veces resulta muy compleja, por lo tanto, es necesario utilizar un lenguaje adaptado al paciente y al grupo familiar. Para todo recién nacido con DSD la evaluación comienza con un buen interrogatorio desde la historia obstétrica, que debe recoger la presencia de cualquier evidencia de trastorno hormonal durante la gestación, el interrogatorio sobre la historia familiar de muertes fetales (hiperplasia suprarrenal congénita) y la historia de consanguinidad (104). En los niños, la inspección de genitales externos permite determinar el grado de ambigüedad sexual. Por otra parte, en todos los casos los estudios citogenéticos tienen un gran valor en la identificación sexual y permite reconocer o clasificar las DSD en pacientes con cariotipo 46, XY que requieren estudios bioquímicos, para definir si se trata de déficit de la 5 α -RD2. En el caso del recién nacido masculino los hallazgos pueden ser: si tiene testículos no palpables bilateralmente, hipospadias asociadas con separación de bolsas escrotales y testículos no descendidos. Los estudios de biología molecular son una valiosa herramienta para determinar el sexo en aquellos pacientes cuyos estudios clínicos y bioquímicos por sí solo no lo precisan y definen el diagnóstico orientando y el asesoramiento.

Los casos estudiados en este trabajo dan cuenta de las carencias en los alcances de los servicios de salud a comunidades rurales, en el primer caso, el niño afectado, tenía dos hermanos mayores afectados que por su condición buscaron alejarse de su

comunidad, el mayor acudió por ayuda al HJM donde recibió atención médica sin tener el diagnóstico molecular, el paciente salió del hospital y no se tuvo comunicación ni posibilidad de localizarlo, con esa información fuimos a buscar a sus hermanos y nos encontramos con el niño de 9 años afectado por DSD al cual estudiamos y dimos la orientación a los padres de familia, quienes nos informaron que existen más familias con fenotipo de DSD en el pueblo pero que no quieren tener apoyo de salud por razones religiosas.

La deficiencia de 5α -RD2 se hereda como un patrón autosómico recesivo. Al igual que en otras enfermedades, la población consanguínea presenta una mayor frecuencia de este padecimiento. Sin embargo, pese a que en ambas familias no confirman consanguinidad y son de lugares apartados, en este tipo de zonas se presenta, sin embargo, una gran endogamia. Existe una necesidad por lo tanto de investigar cuidadosamente el antecedente de la consanguinidad, puesto que la probabilidad de presentar padecimientos autosómicos recesivos aumenta en relación con el grado de parentesco.

La deficiencia de 5α -RD2 se debe a defectos homocigotos en el gen *SRD5A2* o heterocigosidad compuesta. En el mundo se han descrito que las variantes alélicas en homocigosis son más frecuentes que en heterocigotos compuestos entre los individuos afectados con deficiencia de 5α -RD2 (70% y 30%), respectivamente (105). Se examinó el gen *SRD5A2* de los padres y los sujetos. Las variantes p.Glu197Asp y p.Pro212Arg se identificaron en regiones conservadas, lo que sugiere que estas posiciones son cruciales para la actividad enzimática. En particular, la variante p.Glu197Asp se ha descrito en formas heterocigotas y homocigotas en familias no relacionadas (100,106). Por otro lado, las posiciones 196, 227, 235 y 246 son puntos calientes del gen *SRD5A2* que han sido previamente reportados en la literatura. Estos puntos críticos se sugieren con base a algunas mutaciones del gen *SRD5A2* que se han informado en personas de diferentes países y de diferentes etnias. Como ejemplo, la mutación p.Arg246Gln fue descrita en India, Austria, Brasil, Italia, Corea, Pakistán, República Dominicana, Egipto, China, Arabia Saudita y México (42,88,107-111) así como la p.Gly196Ser en Turquía, China, Bulgaria, Italia y Reino Unido (76,112-115). En conjunto, constituyen el 25% de todas las alteraciones informadas como causantes de la deficiencia de 5α -RD2. Por otro lado, quedan muchas mutaciones en *SRD5A2* de etnias específicas, como p.Pro59Arg de Argelia, p.Asn160Asp de Egipto,

c.188_189insTA de India, c.453delC de Italia, p.Gly183Ser de Brasil y p.Ala65Pro de Turquía (90,93,103,112,116). Por lo tanto, la etnicidad no parece afectar la correlación fenotipo-genotipo.

El patrón de herencia corresponde a un trastorno autosómico recesivo. El estudio de mutagénesis dirigida mostró que p.Glu197Asp y p.Pro212Arg son patógenos y que juntos conducen a una pérdida total de actividad enzimática y, en consecuencia, al desarrollo anormal de genitales en los pacientes. En este estudio, por primera vez, se demostró que se reduce la actividad enzimática con la variante genética p.Glu197Asp en un modelo *in vitro* en células HEK293, asimismo, cuando esta variante está presente de manera homocigótica, la actividad de la enzima se pierde por completo (Figura 10), provocando una virilización más baja. La virilización de los genitales influyó en la asignación de sexo, pero no en el cambio de género, que estuvo influenciado por aspectos culturales. Estos hallazgos, concuerdan con otras investigaciones previamente reportadas en la literatura encontrándose que las variantes alélicas en el exón 4 (unión de NADPH dominio) da como resultado una virilización más baja ($p < 0.0001$). Los codones 55, 65, 196, 235 y 246 son puntos críticos que constituyen el 25% de todas las variantes alélicas. La mayoría de ellas (76%) están ubicadas en zonas de aminoácidos muy conservada. Sin embargo, las variantes alélicas en aa no conservadas fueron más frecuentemente indels (28% frente a 6%; $p < 0,01$).

Estos hallazgos son consistentes con los de Vilchis y cols. Además, nuestros experimentos *in vitro* usando mutagénesis dirigida al sitio revelaron que las enzimas mutantes p.Pro212Arg y p.Glu197Asp presentaron una pérdida completa de la actividad catalítica de 5α -RD2 (Figura 10) porque esta figura q es la ruta metabólica. Estas dos variantes patógenas provocan la sustitución de aminoácidos. En la variante p.Glu197Asp, la sustitución es un aminoácido polar por otro aminoácido polar, y las estructuras de Glu y Asp son similares, diferenciándose por un grupo metilo; por tanto, la primera hipótesis es que este cambio no afectaría la función de la proteína. No obstante, el residuo 197 está cerca de la unión de NADPH, lo que puede desestabilizar la unión de NADPH. Con respecto a p.Pro212Arg, la sustitución es un cambio en un aminoácido cíclico de la cadena lateral (apolar) por un aminoácido cargado positivamente. La variante patogénica condujo a un reemplazo desestabilizador estructural (Figura 5) 21. Por lo tanto, las variantes patogénicas

p.Pro212Arg / p.Glu197Asp producen enzimas con actividad alterada y son incapaces de catalizar la síntesis de DHT durante la embriogénesis, lo que explica las posibles alteraciones fenotípicas observadas en los pacientes con 46, XY DSD. Los estudios han demostrado que estas variantes patogénicas son altamente recurrentes en la población mexicana; por lo tanto, los autores han sugerido que se derivan de un ancestro común por un efecto del gen fundador responsable de la distribución de la actividad enzimática defectuosa de 5 α -RD2 (19,20,22-25). En particular, los primeros estudios han sugerido la existencia de puntos calientes de variantes genéticas en esta región de ADN (20,25). Ambas variantes del gen *SRD5A2* se ubicaron dentro de los codones 197-230. Wilson y col. demostraron que la variación en esta región provocó la inactivación completa de 5 α -RD2. Esta región contiene una secuencia de 21 aminoácidos (residuos 206-226), que corresponde a uno de los cuatro dominios transmembrana de la enzima 5 α -RD2 (<http://ca.expasy.org/uniprot/P31213>) 26. El impacto de variantes en este sitio indica la importancia del exón 4 de *SRD5A2*, que codifica parte de los dominios transmembrana como región fundamental para el correcto funcionamiento de 5 α -RD2.

Aunque se han informado y descrito muchas variantes del gen *SRD5A2* en todo el mundo, la correlación genotipo-fenotipo entre pacientes no se ha revelado definitivamente, incluso para individuos portadores de la misma variante. Encontramos que los pacientes estudiados de origen mexicano con las variantes p.Pro212Arg y p.Glu197Asp presentaban hipospadias perineoescrotal, microfalo, criptorquidia y sexo femenino de crianza, lo que demuestra una posible correlación genotipo-fenotipo para estas variantes particulares, lo que resulta en una ausencia de actividad enzimática cuando están presentes juntos o en forma homocigota

Este trabajo realizado en el HJM constituye un esfuerzo para la implementación de metodologías moleculares que oferten servicios de diagnóstico especializados a personas de bajos recursos, esto mediante la promoción de una mayor interacción entre el servicio clínico y los laboratorios de investigación del hospital.

En todos los casos, se requiere del apoyo del equipo de salud multidisciplinario para la corrección hormonal, quirúrgica o ambas que necesite el paciente, así como la orientación sexual y el riesgo de recurrencia familiar entre otros. Es muy probable que en un futuro próximo podamos disponer de microarreglos diseñados para el diagnóstico de anomalías en varios de los genes que regulan la diferenciación sexual.

Ello facilitará enormemente el trabajo de los laboratorios de diagnóstico molecular y proporcionará una herramienta precisa y expedita en el diagnóstico y manejo de los pacientes con DSD.

8. Conclusiones

La deficiencia de 5 α -RD2 es una condición rara con una distribución mundial que debe ser considerada como un diagnóstico frente a todo recién nacido 46, XY con genitales atípicos.

Las variantes alélicas en la región del ligando NADPH provocan una virilización más baja. La virilización de los genitales influyó en la asignación de sexo, pero no en el cambio de género, que estuvo influenciado por aspectos culturales en todos los países. El diagnóstico molecular influyó en la asignación de sexo, favoreciendo la asignación de sexo masculino en recién nacidos con deficiencia de 5 α -RD2.

En este estudio, identificamos dos variantes patogénicas en el gen *SRD5A2* en dos pacientes con 46, XY de dos familias mexicanas. Los sujetos eran heterocigotos y homocigotos para las variantes de *SRD5A2*. Las variantes genéticas en los codones 197 (GAG / GAT) y 212 (CCA / CGA) se ubicaron dentro del exón 4 de la región considerada dominio funcional para la unión a NADPH. El análisis molecular del estudio de mutagénesis dirigida al sitio de estas familias indicó que los pacientes afectados tenían una forma rara de deficiencia de 5 α -RD2, causada por una síntesis alterada de DHT. Los resultados de este estudio nos permitieron concluir que la causa de que estos pacientes presentaran la forma clásica de deficiencia de 5 α -RD2 fueron las variantes genéticas en el exón 4 del gen *SRD5A2*. Finalmente, el diagnóstico molecular de la DSD 46, XY es una herramienta ventajosa para el diagnóstico y subclasificación de la deficiencia de 5 α -RD2. Aunque la apariencia externa de los genitales sigue siendo la elección del sexo asignado, hay factores adicionales que influyen en el desarrollo sexual desde el nacimiento hasta la pubertad.

El diagnóstico de las DSD es multidisciplinario y requiere primero la conjunción de los estudios clínicos (antecedentes personales y familiares, exploración clínica y de imagen) y bioquímicos (bioquímica general y análisis hormonales) a los que debe añadirse la determinación del cariotipo y estudios moleculares. Para ello es necesario utilizar técnicas de biología molecular. Las mutaciones detectadas pueden ir desde la delección total del gen, que a veces incluye material genético contiguo, pasando por

deleciones parciales (desde varios exones hasta una sola base) e inserciones hasta cambios puntuales de un solo nucleótido que puede provocar desde una parada en la pauta de lectura hasta una proteína con estructura anómala y pérdida de función. Por lo tanto, es necesario mejorar la comprensión de la fisiopatología subyacente a partir de estos estudios, y que sea posible involucrar a un equipo multidisciplinario de trabajadores de la salud, que puedan brindar la orientación correcta y oportuna.

9. Bibliografía

1. Warne GL, Zajac JD. Disorders of sexual differentiation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998 Dec;27(4):945–67, x.
2. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990 Jul;346(6281):240–4.
3. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature.* 1990 Nov;348(6300):450–2.
4. MacLaughlin DT, Donahoe PK. Sex determination and differentiation. *N Engl J Med.* 2004 Jan;350(4):367–78.
5. Ahmed SF, Hughes IA. The genetics of male undermasculinization. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002 Jan;56(1):1–18.
6. Wilhelm D, Englert C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 2002 Jul;16(14):1839–51.
7. Cetinkaya E, Ocal G, Berberoğlu M, Adiyaman P, Ekim M, Yalçinkaya F, et al. Association of partial gonadal dysgenesis, nephropathy and WT1 gene mutation without Wilms' tumor: incomplete Denys-Drash syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001 May;14(5):561–4.
8. Biason-Lauber A, Konrad D, Meyer M, DeBeaufort C, Schoenle EJ. Ovaries and female phenotype in a girl with 46,XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *Am J Hum Genet.* 2009 May;84(5):658–63.
9. Polanco JC, Koopman P. Sry and the hesitant beginnings of male development. *Dev Biol.* 2007 Feb;302(1):13–24.
10. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.* 2009 Jan;25(1):19–29.
11. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet.* 1996 Sep;14(1):62–8.
12. Biason-Lauber A. Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010 Apr;24(2):163–86.
13. Houmard B, Small C, Yang L, Nalwai-Cecchini T, Cheng E, Hassold T, et al. Global gene expression in the human fetal testis and ovary. *Biol Reprod.* 2009 Aug;81(2):438–43.
14. Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh J-S, Fu P, Wade JD, et al. INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *J Biol Chem.* 2002 Aug;277(35):31283–6.
15. Oakes MB, Eyvazzadeh AD, Quint E, Smith YR. Complete androgen insensitivity syndrome--a review. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2008 Dec;21(6):305–10.
16. Choi J-H, Kim G-H, Seo E-J, Kim K-S, Kim SH, Yoo H-W. Molecular analysis of the AR and SRD5A2 genes in patients with 46,XY disorders of sex development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008 Jun;21(6):545–53.
17. León NY, Reyes AP, Harley VR. A clinical algorithm to diagnose differences of sex development. *lancet Diabetes Endocrinol.* 2019 Jul;7(7):560–74.

18. Park SY, Jameson JL. Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology*. 2005 Mar;146(3):1035–42.
19. Imperato-McGinley J, Zhu Y-S. Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Dec;198(1–2):51–9.
20. Barberá Belda B. Diferenciación sexual y su patología. 2010.
21. Gomes NL, Chetty T, Jorgensen A, Mitchell RT. Disorders of Sex Development- Novel Regulators, Impacts on Fertility, and Options for Fertility Preservation. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar;21(7).
22. Wilson JD. Recent studies on the mechanism of action of testosterone. *N Engl J Med*. 1972 Dec;287(25):1284–91.
23. Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*. 1974 Dec;186(4170):1213–5.
24. Klonisch T, Fowler PA, Hombach-Klonisch S. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Dev Biol*. 2004 Jun;270(1):1–18.
25. Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns CF. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev*. 1997 Apr;18(2):259–80.
26. Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocr Rev*. 2008 Aug;29(5):560–80.
27. Barthold JS, Kumasi-Rivers K, Upadhyay J, Shekarriz B, Imperato-Mcginley J. Testicular position in the androgen insensitivity syndrome: implications for the role of androgens in testicular descent. *J Urol*. 2000 Aug;164(2):497–501.
28. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*. 2006 Aug;118(2):e488-500.
29. Grino PB, Griffin JE, Wilson JD. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*. 1990 Feb;126(2):1165–72.
30. El-Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaniemi I. Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod*. 1998 Jan;58(1):116–23.
31. Brinkmann AO, van Straalen RJ. Development of the LH-response in fetal guinea pig testes. *Biol Reprod*. 1979 Nov;21(4):991–7.
32. O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM, Huhtaniemi I. Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology*. 1998 Mar;139(3):1141–6.
33. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*. 1996 Jun;17(3):221–44.
34. Curtin D, Jenkins S, Farmer N, Anderson AC, Haisenleder DJ, Rissman E, et al. Androgen suppression of GnRH-stimulated rat LHBeta gene transcription occurs through Sp1 sites in the distal GnRH-responsive promoter region. *Mol Endocrinol*. 2001 Nov;15(11):1906–17.
35. Schiffer L, Kempegowda P, Arlt W, O'Reilly MW. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: The sexually dimorphic role of androgens in human metabolic disease. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2017;177(3):R125–43. Available from: <https://eje.bioscientifica.com/view/journals/eje/177/3/EJE-17-0124.xml>

36. Fukami M, Homma K, Hasegawa T, Ogata T. Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Dev Dyn an Off Publ Am Assoc Anat*. 2013 Apr;242(4):320–9.
37. O’Shaughnessy PJ, Antignac JP, Le Bizec B, Morvan M-L, Svechnikov K, Söder O, et al. Alternative (backdoor) androgen production and masculinization in the human fetus. *PLoS Biol*. 2019 Feb;17(2):e3000002.
38. Reisch N, Taylor AE, Nogueira EF, Asby DJ, Dhir V, Berry A, et al. Alternative pathway androgen biosynthesis and human fetal female virilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Oct;116(44):22294–9.
39. Aumüller G, Eicheler W, Renneberg H, Adermann K, Vilja P, Forssmann WG. Immunocytochemical evidence for differential subcellular localization of 5 alpha-reductase isoenzymes in human tissues. *Acta Anat (Basel)*. 1996;156(4):241–52.
40. Rojas-Durán F, Manzo-Denes J, Soto-Cid, Abraham Heriberto Aranda-Abreu GE, Juárez-Aguilar E, Coria-Ávila GA, Toledo-Cárdenas R, et al. The androgen receptor in the prostate physiopathology. *eNeurobiologia, Cent Investig Cerebrales, UV*. 2011;2.
41. Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*. 1991 Nov;354(6349):159–61.
42. Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, et al. Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Invest*. 1992 Sep;90(3):799–809.
43. Srivilai J, Minale G, Scholfield CN, Ingkaninan K. Discovery of Natural Steroid 5 Alpha-Reductase Inhibitors. *Assay Drug Dev Technol*. 2019;17(2):44–57.
44. Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V, Simard J, Lachance Y, Bachvarov D, et al. Structure of human type II 5 alpha-reductase gene. *Endocrinology*. 1992 Sep;131(3):1571–3.
45. Thigpen AE, Davis DL, Gautier T, Imperato-McGinley J, Russell DW. Brief report: the molecular basis of steroid 5 alpha-reductase deficiency in a large Dominican kindred. *N Engl J Med*. 1992 Oct;327(17):1216–9.
46. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:25–61.
47. Andersson S, Russell DW. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 May;87(10):3640–4.
48. Gronemeyer H, Gustafsson J-A, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Nov;3(11):950–64.
49. Shi Y. Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2007 Jun;12(11–12):440–5.
50. Prescott J, Coetzee GA. Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett*. 2006 Jan;231(1):12–9.
51. Heemers H V, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev*. 2007 Dec;28(7):778–808.
52. Wang Q, Li W, Zhang Y, Yuan X, Xu K, Yu J, et al. Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell*. 2009 Jul;138(2):245–56.

53. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev.* 2002 Apr;23(2):175–200.
54. Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev.* 2004 Feb;25(1):45–71.
55. McEwan IJ, Brinkmann AO. Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. South Dartmouth (MA); 2000.
56. Atta I, Ibrahim M, Parkash A, Lone SW, Khan YN, Raza J. Etiological diagnosis of undervirilized male/XY disorder of sex development. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2014 Oct;24(10):714–8.
57. Achermann JC, Domenice S, Bachega TASS, Nishi MY, Mendonca BB. Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Aug;11(8):478–88.
58. Loch Batista R, Inácio M, Prado Arnhold IJ, Gomes NL, Diniz Faria JA, Rodrigues de Moraes D, et al. Psychosexual Aspects, Effects of Prenatal Androgen Exposure, and Gender Change in 46,XY Disorders of Sex Development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 Apr;104(4):1160–70.
59. Berenbaum SA, Beltz AM. How Early Hormones Shape Gender Development. *Curr Opin Behav Sci.* 2016 Feb;7:53–60.
60. Berenbaum SA, Beltz AM. Sexual differentiation of human behavior: effects of prenatal and pubertal organizational hormones. *Front Neuroendocrinol.* 2011 Apr;32(2):183–200.
61. Saartok T, Dahlberg E, Gustafsson JA. Relative binding affinity of anabolic-androgenic steroids: comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin. *Endocrinology.* 1984 Jun;114(6):2100–6.
62. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 1989 Feb;56(3):335–44.
63. Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR, Zirkin BR. Androgen action in prostate function and disease. *Am J Clin Exp Urol.* 2018;6(2):62–77.
64. Imperato-McGinley J. 5alpha-reductase-2 deficiency and complete androgen insensitivity: lessons from nature. *Adv Exp Med Biol.* 2002;511:121–4.
65. Azzouni F, Godoy A, Li Y, Mohler J. The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases. *Adv Urol.* 2012;2012:530121.
66. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat.* 2012 May;33(5):887–94.
67. 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 Jun;16(3):271–321.
68. Rajender S, Singh L, Thangaraj K. Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J Androl.* 2007 Mar;9(2):147–79.
69. McCrea E, Sissung TM, Price DK, Chau CH, Figg WD. Androgen receptor variation affects prostate cancer progression and drug resistance. *Pharmacol Res.* 2016 Dec;114:152–62.
70. Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev.* 1993 Oct;14(5):577–93.
71. Wilson JD, Lasnitzki I. Dihydrotestosterone formation in fetal tissues of the

- rabbit and rat. *Endocrinology*. 1971 Sep;89(3):659–68.
72. Mendonca BB, Inacio M, Costa EM, Arnhold IJ, Silva FA, Nicolau W, et al. Male pseudohermaphroditism due to steroid 5 α -reductase 2 deficiency. Diagnosis, psychological evaluation, and management. *Medicine (Baltimore)*. 1996 Mar;75(2):64–76.
 73. Mendonca BB, Batista RL, Domenice S, Costa EMF, Arnhold IJP, Russell DW, et al. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 Oct;163:206–11.
 74. Cantagrel V, Lefeber DJ, Ng BG, Guan Z, Silhavy JL, Bielas SL, et al. SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. *Cell*. 2010 Jul;142(2):203–17.
 75. Costa EMF, Domenice S, Sircili MH, Inacio M, Mendonca BB. DSD due to 5 α -reductase 2 deficiency - from diagnosis to long term outcome. *Semin Reprod Med*. 2012 Oct;30(5):427–31.
 76. Andonova S, Robeva R, Vazharova R, Ledig S, Grozdanova L, Stefanova E, et al. New Territory for an Old Disease: 5-Alpha-Reductase Type 2 Deficiency in Bulgaria. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol sex Determ Differ*. 2017;11(1):21–8.
 77. Walsh PC, Madden JD, Harrod MJ, Goldstein JL, MacDonald PC, Wilson JD. Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *N Engl J Med*. 1974 Oct;291(18):944–9.
 78. Livingstone DEW, Di Rollo EM, Mak TC-S, Sooy K, Walker BR, Andrew R. Metabolic dysfunction in female mice with disruption of 5 α -reductase 1. *J Endocrinol*. 2017 Jan;232(1):29–36.
 79. Upreti R, Hughes KA, Livingstone DEW, Gray CD, Minns FC, Macfarlane DP, et al. 5 α -reductase type 1 modulates insulin sensitivity in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Aug;99(8):E1397-406.
 80. Taylor RL, Arno G, Poulter JA, Khan KN, Morarji J, Hull S, et al. Association of Steroid 5 α -Reductase Type 3 Congenital Disorder of Glycosylation With Early-Onset Retinal Dystrophy. *JAMA Ophthalmol*. 2017 Apr;135(4):339–47.
 81. Kara B, Ayhan Ö, Gökçay G, Başboğaoğlu N, Tolun A. Adult phenotype and further phenotypic variability in SRD5A3-CDG. *BMC Med Genet*. 2014 Jan;15:10.
 82. Nowakowski H, Lenz W. Genetic aspects in male hypogonadism. *Recent Prog Horm Res*. 1961;17:53–95.
 83. Maimoun L, Philibert P, Cammas B, Audran F, Pienkowski C, Kurtz F, et al. Undervirilization in XY newborns may hide a 5 α -reductase deficiency: report of three new SRD5A2 gene mutations. *Int J Androl*. 2010 Dec;33(6):841–7.
 84. Mazen I, Gad YZ, Hafez M, Sultan C, Lumbroso S. Molecular analysis of 5 α -reductase type 2 gene in eight unrelated egyptian children with suspected 5 α -reductase deficiency: prevalence of the G34R mutation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 May;58(5):627–31.
 85. Zhu H, Liu W, Han B, Fan M, Zhao S, Wang H, et al. Phenotypic and molecular characteristics in eleven Chinese patients with 5 α -reductase Type 2 deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014 Nov;81(5):711–20.
 86. Bahceci M, Ersay AR, Tuzcu A, Hiort O, Richter-Unruh A, Gokalp D. A novel missense mutation of 5-alpha reductase type 2 gene (SRD5A2) leads to severe male pseudohermaphroditism in a Turkish family. *Urology*. 2005

- Aug;66(2):407–10.
87. Chan AOK, But BWM, Lau GTC, Lam ALN, Ng KL, Lam YY, et al. Diagnosis of 5alpha-reductase 2 deficiency: a local experience. *Hong Kong Med J = Xianggang yi xue za zhi*. 2009 Apr;15(2):130–5.
 88. Sahu R, Boddula R, Sharma P, Bhatia V, Greaves R, Rao S, et al. Genetic analysis of the SRD5A2 gene in Indian patients with 5alpha-reductase deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009 Mar;22(3):247–54.
 89. Vilchis F, Valdez E, Ramos L, García R, Gómez R, Chávez B. Novel compound heterozygous mutations in the SRD5A2 gene from 46,XY infants with ambiguous external genitalia. *J Hum Genet*. 2008;53(5):401–6.
 90. Di Marco C, Bulotta AL, Varetta C, Dosa L, Michelucci A, Baldinotti F, et al. Ambiguous external genitalia due to defect of 5- α -reductase in seven Iraqi patients: prevalence of a novel mutation. *Gene*. 2013 Sep;526(2):490–3.
 91. Zhang M, Yang J, Zhang H, Ning G, Li X, Sun S. A novel SRD5A2 mutation with loss of function identified in Chinese patients with hypospadias. *Horm Res Paediatr*. 2011;76(1):44–9.
 92. Tsai M-C, Chou Y-Y, Lin S-J, Tsai L-P. A novel SRD5A2 mutation in a Taiwanese newborn with ambiguous genitalia. *Kaohsiung J Med Sci*. 2012 Apr;28(4):231–5.
 93. Shabir I, Khurana ML, Joseph AA, Eunice M, Mehta M, Ammini AC. Phenotype, genotype and gender identity in a large cohort of patients from India with 5 α -reductase 2 deficiency. *Andrology*. 2015 Nov;3(6):1132–9.
 94. Maimoun L, Philibert P, Bouchard P, Ocal G, Leheup B, Fenichel P, et al. Primary amenorrhea in four adolescents revealed 5 α -reductase deficiency confirmed by molecular analysis. *Fertil Steril*. 2011 Feb;95(2):804.e1-5.
 95. Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen A, Conway G, Edwards Z, et al. Society for Endocrinology UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development (Revised 2015). Vol. 84, *Clinical endocrinology*. 2016. p. 771–88.
 96. Grant DB, Laurance BM, Atherden SM, Ryness J. HCG stimulation test in children with abnormal sexual development. *Arch Dis Child*. 1976 Aug;51(8):596–601.
 97. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb;16(3):1215.
 98. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(8):2766–70.
 99. Dallob AL, Sadick NS, Unger W, Lipert S, Geissler LA, Gregoire SL, et al. The effect of finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Sep;79(3):703–6.
 100. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993 Dec;234(3):779–815.
 101. Sandberg DE, Gardner M, Cohen-Kettenis PT. Psychological aspects of the treatment of patients with disorders of sex development. *Semin Reprod Med*. 2012 Oct;30(5):443–52.
 102. Paris F, Gaspari L, Philibert P, Maïmoun L, Kalfa N, Sultan C. Disorders of sex development: neonatal diagnosis and management. *Endocr Dev*. 2012;22:56–

- 71.
103. Maimoun L, Philibert P, Cammas B, Audran F, Bouchard P, Fenichel P, et al. Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5 α -reductase deficiency: an extensive international experience of 55 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Feb;96(2):296–307.
 104. Erdoğan S, Kara C, Uçaktürk A, Aydın M. Etiological classification and clinical assessment of children and adolescents with disorders of sex development. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2011;3(2):77–83.
 105. Avendaño A, Paradisi I, Cammarata-Scalisi F, Callea M. 5- α -Reductase type 2 deficiency: is there a genotype-phenotype correlation? A review. *Hormones (Athens).* 2018 Jun;17(2):197–204.
 106. Chávez B, Valdez E, Vilchis F. Uniparental disomy in steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep;85(9):3147–50.
 107. Alswailem MM, Alzahrani OS, Alghofaili L, Qasem E, Almohanaa M, Alsagheir A, et al. Molecular genetics and phenotype/genotype correlation of 5- α reductase deficiency in a highly consanguineous population. *Endocrine.* 2019 Feb;63(2):361–8.
 108. Ko JM, Cheon C-K, Kim G-H, Kim SH, Kim KS, Yoo H-W. Clinical characterization and analysis of the SRD5A2 gene in six Korean patients with 5 α -reductase type 2 deficiency. *Horm Res Paediatr.* 2010;73(1):41–8.
 109. Yuan S, Meng L, Zhang Y, Tu C, Du J, Li W, et al. Genotype-phenotype correlation and identification of two novel SRD5A2 mutations in 33 Chinese patients with hypospadias. *Steroids.* 2017 Sep;125:61–6.
 110. Vilchis F, Méndez JP, Canto P, Lieberman E, Chávez B. Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 Mar;52(3):383–7.
 111. Samtani R, Bajpai M, Ghosh PK, Saraswathy KN. SRD5A2 gene mutations--a population-based review. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2010 Sep;8(1):34–40.
 112. Abacı A, Çatlı G, Kırbıyık Ö, Şahin NM, Abalı ZY, Ünal E, et al. Genotype-phenotype correlation, gonadal malignancy risk, gender preference, and testosterone/dihydrotestosterone ratio in steroid 5- α -reductase type 2 deficiency: a multicenter study from Turkey. *J Endocrinol Invest.* 2019 Apr;42(4):453–70.
 113. Cheng T, Wang H, Han B, Zhu H, Yao H-J, Zhao S-X, et al. Identification of three novel SRD5A2 mutations in Chinese patients with 5 α -reductase 2 deficiency. *Asian J Androl.* 2019;21(6):577–81.
 114. Bertelloni S, Baldinotti F, Russo G, Ghirri P, Dati E, Michelucci A, et al. 5 α -Reductase-2 Deficiency: Clinical Findings, Endocrine Pitfalls, and Genetic Features in a Large Italian Cohort. *Sex Dev Genet Mol Biol Evol Endocrinol Embryol Pathol sex Determ Differ.* 2016;10(1):28–36.
 115. Berra M, Williams EL, Muroli B, Creighton SM, Honour JW, Rumsby G, et al. Recognition of 5 α -reductase-2 deficiency in an adult female 46XY DSD clinic. *Eur J Endocrinol.* 2011 Jun;164(6):1019–25.
 116. Hackel C, Oliveira LEC, Ferraz LFC, Tonini MMO, Silva DN, Toralles MB, et al. New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5 α -reductase deficiency type 2. *J Mol Med (Berl).* 2005 Jul;83(7):569–76.

