

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
POSTGRADO EN BIOLOGÍA CELULAR

**Caracterización molecular del gen *SRD5A2* en pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -  
reductasa tipo 2 y testigos provenientes de la población de Pueblo Nuevo del Sur**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Autora:** MsC. Andrea R. Avendaño V.

**Tutora:** Dra. Irene Paradisi

**Co-Tutora:** Prof. Mercedes González-Coira

Mérida, octubre 2021

C.C.Reconocimiento

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por siempre apoyarme e impulsarme a ser cada día mejor.

A mi tutora la dra. Irene Paradisi, a mi Co-tutora la profesora Mercedes González-Coira y al Prof. Ascanio Rojas, por su continua orientación en este largo camino.

A mis compañeros del laboratorio de Genética Humana (IVIC) por haberme acompañado y orientado durante todo el tiempo que compartí con ellos, más que compañeros fueron unos reales amigos para mí.

A mis compañeros del laboratorio de Genética Médica (ULA), como familia siempre me apoyaron cuando los necesité.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y al Laboratorio de Genética Humana del Centro de Medicina experimental y el Centro de estudios Avanzados (CEA-IVIC), por permitirme desarrollar este trabajo de investigación.

A la Universidad de Los Andes, toda mi carrera se ha construido en sus espacios, por lo que siempre seré una ULAndina de corazón.

A todos mis amigos que de alguna u otra manera me acompañaron durante esta etapa.

## INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	ii
INDICE DE CONTENIDO .....	iii
INDICE DE FIGURAS .....	vii
INDICE DE TABLAS .....	viii
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	4
3. MARCO TEÓRICO .....	5
3.1. Desarrollo embrionario del sistema genital .....	5
3.2. Vías genéticas de la diferenciación sexual .....	8
3.2.1 Determinantes genéticos de la gónada bipotencial .....	10
3.2.2 Determinación genética de testículo .....	14
3.2.3 Determinación genética de ovario .....	19
3.2.4 Interacción entre las vías de determinación sexual .....	20
3.3. Vías hormonales en la diferenciación sexual .....	21
3.4. Alteraciones del desarrollo sexual .....	23
3.4.1 Alteraciones del desarrollo sexual 46,XY (DSD 46,XY) .....	26
3.5. Deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 .....	34
3.5.1 Definición .....	34
3.5.2 Actividad enzimática 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 .....	35
3.5.3 Bases moleculares de la 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 .....	40
3.5.4 Relación Genotipo-Fenotipo .....	44

3.5.5 Clasificación Fenotípica de Pacientes .....	44
3.5.6 Diagnósticos Diferenciales .....	45
3.5.7 Métodos Diagnóstico .....	48
3.6. Epidemiología .....	49
3.7. Efectos de la Consanguinidad en las poblaciones humanas .....	50
4. HIPÓTESIS .....	52
5. OBJETIVOS .....	53
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	53
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	53
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	54
Pacientes .....	54
Cálculo de consanguinidad de los pacientes .....	55
Consentimiento informado de los pacientes .....	56
6.1. Identificación de la mutación en pacientes con ambigüedad genital .....	56
6.1.1 Toma de muestra de sangre .....	56
6.1.2 Extracción de ADN .....	56
6.1.3 Amplificación de los exones del gen SRD5A2 .....	57
6.1.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	58
6.1.5 Tinción con nitrato de plata .....	58
6.1.6 Análisis por polimorfismos de conformación de hebra única (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) .....	59
6.1.7 Secuenciación de amplificadas con migración diferencial en SSCP .....	60
6.2. Relación genotipo-fenotipo en pacientes con ambigüedad genital .....	60
6.2.1 Clasificación fenotípica de los pacientes .....	60

6.2.2 Genotipificación del polimorfismo p.L89V .....	61
6.2.3 Clasificación fenotípica de casos publicados .....	61
6.3. Frecuencia de la mutación en el foco geográfico .....	62
6.3.1 Establecimiento del foco geográfico .....	62
6.3.2 Población de estudio .....	62
6.3.3 Criterios de inclusión de la población testigo .....	63
6.3.4 Tamaño de la muestra poblacional .....	65
6.3.5 Toma de muestra de Sangre .....	65
6.3.6 Extracción de ADN .....	65
6.3.7 Análisis por polimorfismos de conformación de hebra única (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) .....	66
6.4. Coeficiente de consanguinidad del foco geográfico .....	66
6.5. Origen ancestral de la mutación .....	68
6.5.1 Selección de Polimorfismos de nucleótido único (SNP) .....	68
6.5.2 Genotipificación de los pacientes .....	68
6.5.3 Estudio de la estructura poblacional .....	69
7. RESULTADOS .....	72
7.1. Identificación de la mutación .....	72
7.2. Relación genotipo-fenotipo en pacientes con ambigüedad genital .....	74
7.3. Frecuencia de la mutación en el foco geográfico .....	77
7.4. Consanguinidad de la población del foco .....	79
7.5. Origen ancestral de la mutación .....	81
8. DISCUSIÓN .....	87
9. CONCLUSIONES .....	112

10. REFERENCIAS ..... 114

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principales genes involucrados en el desarrollo del aparato genital masculino y femenino .....	10
<b>Figura 2.</b> Vías enzimáticas para la síntesis <i>de novo</i> de las hormonas sexuales .....	23
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica de los estadios en la clasificación de Prader .....	28
<b>Figura 4.</b> Reacción enzimática catalizada por la 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 .....	36
<b>Figura 5.</b> Localización en los diferentes tejidos de la actividad 5- $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 .....	41
<b>Figura 6.</b> Esquema general del gen <i>SRD5A2</i> y las principales mutaciones reportadas en la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 .....	42
<b>Figura 7.</b> Clasificación de los fenotipos en pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 .....	45
<b>Figura 8.</b> Genealogía de las familias con individuos que presentaron ambigüedad genita estudiadas en la Unidad de Genética .....	54
<b>Figura 9.</b> Foco geográfico de la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa en el estado Mérida .....	62
<b>Figura 10.</b> Resultados de SSCP y secuenciación de Sanger para los pacientes IV-24, V-5, padres y controles .....	73
<b>Figura 11.</b> Resultados obtenidos en Polyphen-2 al analizar la mutación p.N193S en el gen <i>SRD5A2</i> .....	74
<b>Figura 12.</b> Secuenciación del exón 1 del gen <i>SRD5A2</i> donde se muestra el polimorfismo p.L89V .....	75
<b>Figura 13.</b> SSCP del exón 4 del gen <i>SRD5A2</i> de muestras de individuos sano pertenecientes al foco geográfico .....	79

**Figura 14.** Electroferogramas de cada uno los SNP que constituyen el haplotipo seleccionado para identificar el origen de la mutación ..... 82

**Figura 15.** Representación en triángulo de la distribución de los clusters con mayor probabilidad. Las flechas negras señalan los tres pacientes y los puntos rojos representan los individuos de origen africano ..... 84

**Figura 16.** Representación gráfica del Análisis de Componentes Principales usando los datos de la matriz Q de población arrojada por Structure ..... 85

**Figura 17.** Análisis de Coordenadas Principales de los pacientes (Ven) y todas las poblaciones de referencia ..... 85

**Figura 18.** Porcentaje de Varianza Molecular (AMOVA) usando los pacientes y las poblaciones de referencia ..... 86

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Nomenclatura implementada a partir del Consenso de Chicago .....	24
<b>Tabla 2.</b> Puntaje de Masculinización externa (EMS) .....	28
<b>Tabla 3.</b> Principales causas de los DSD 46,XY .....	31
<b>Tabla 4.</b> Clasificación fenotípica de pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 propuesta por Sinnecker y colaboradores .....	46
<b>Tabla 5.</b> Secuencias de los cebadores de cada uno de los exones del gen <i>SRD5A2</i> junto con sus Tm ( $^{\circ}$ C) y longitud del fragmento amplificado correspondientes .....	59
<b>Tabla 6.</b> Secuencias de los cebadores para cada uno de los polimorfismos del gen <i>SRD5A2</i> junto con sus Tm ( $^{\circ}$ C) y longitudes correspondientes .....	69
<b>Tabla 7.</b> Características fenotípicas de los individuos afectados incluidos en el estudio .....	74
<b>Tabla 8.</b> Puntaje de masculinización externa para mutaciones que afectan el <i>Km</i> de la enzima para la testosterona (T) .....	76
<b>Tabla 9.</b> Puntaje de masculinización externa para mutaciones que afectan el <i>Km</i> de la enzima para el cofactor NADPH .....	78
<b>Tabla 10.</b> Puntaje de masculinización externa para mutaciones que afectan la actividad enzimática .....	78
<b>Tabla 11.</b> Frecuencia de los apellidos más abundantes en Pueblo Nuevo del sur y sus villas aledañas en el año 2012 y 1991 según los datos obtenidos por el CNE .....	80
<b>Tabla 12.</b> Valores de D' y r <sup>2</sup> para cada SNP incluido en el estudio con respecto a rs12470196 en cada una de las poblaciones de referencia .....	83

**Tabla 13.** Clúster más probable para determinar la estructura de la población calculados a través de Harvester ..... 84

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## RESUMEN

La deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 causa una alteración del desarrollo sexual 46,XY (46,XY DSD, del inglés Disorder of Sex Development) caracterizado por genitales externos ambiguos, una próstata rudimentaria y genitales internos normales. La prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial es baja, sin embargo, en los Andes venezolanos se detectó un foco con una mayor incidencia. En este trabajo se realizó un análisis molecular exhaustivo del gen *SRD5A2* en tres individuos consanguíneos diagnosticados con DSD 46,XY. Mediante secuenciación de Sanger se analizó toda la secuencia codificante del gen, el polimorfismo p.L89V (rs523349) y cinco SNP intragénicos (rs2300702, rs2268797, rs2268796, rs4952220, rs12470196). Asimismo, se estudió la relación genotipo – fenotipo mediante una revisión exhaustiva de casos publicados hasta la fecha. El grado de consanguinidad del foco geográfico fue obtenido mediante isonimia. Para identificar el probable origen étnico de la mutación se emplearon dos aproximaciones estadísticas diferentes para determinar la estructura poblacional. En todos los pacientes examinados se encontró la mutación p.N193S en homocigosis, con una frecuencia de mutación en el foco geográfico de 1:80 cromosomas, sugiriendo un efecto fundador. El análisis de la relación genotipo – fenotipo en los pacientes no fue absoluta, siendo la hipospadía y la criptorquidia las principales características que diferencian a los individuos afectados. A su vez, se determinó que dependiendo del tipo de mutación el grado de variabilidad entre los fenotipos puede ser mayor o menor. Al evaluar la consanguinidad por isonimia en el foco geográfico se obtuvo un valor elevado de 0,0178. Por último, los resultados de la estructura poblacional sugirieron un origen cercano de la mutación a la población española.

**Palabras claves:** deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2, *SRD5A2*, DSD 46,XY, p.N193S, origen étnico, efecto fundador, , isonimia, estructura poblacional.

## ABSTRACT

5- $\alpha$ - reductase type 2 deficiency causes a 46,XY disorder of sex development (DSD 46,XY) characterized by ambiguous external genitalia, rudimentary prostate, and normal internal genitalia. The disease prevalence worldwide is low, but in the Venezuelan Andes, a higher incidence has been found. An extensive molecular analysis of the *SRD5A2* gene was performed in three inbred affected individuals clinically diagnosed with DSD 46,XY. The entire coding region, the p.L89V polymorphism (rs523349) and five intragenic SNPs (rs2300702, rs2268797, rs2268796, rs4952220, rs12470196) were analyzed by Sanger sequencing. Additionally, genotype – phenotype correlation was studied through an exhaustive review of published cases to date. Consanguinity in the geographic isolate was obtained by isonymy. To assess the probable ethnic origin of the mutation in this geographic isolate, two statistically different approaches were performed to determine the population structure. The p.N193S mutation was found in all the patients in homozygous condition, with a mutation frequency in the geographic isolate of 1:80 chromosomes, suggesting a founder effect. The genotype – phenotype correlation in the patients was not absolute, hypospadias and cryptorchidism being the main traits that differentiate affected individuals. At the same time, depending on the specific mutation, the variability between phenotypes can be more or less consistent. A high value of isonymy (0.0178) was obtained when it was assessed in the geographic isolate. Finally, the results of the population structure suggested a mutation origin closer to the Spanish populations.

**Key words:** 5- $\alpha$ - reductase type 2 deficiency, *SRD5A2*, DSD 46,XY, p.N193S, ethnic origin, founder effect, isonymy, population structure.

## 1. INTRODUCCIÓN

La deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 es una alteración autosómica recesiva poco frecuente. Esta ha sido descrita clínica y bioquímicamente en pacientes de diferentes poblaciones del mundo, y representa entre el 7% y 25% de todos los casos de alteraciones del desarrollo sexual 46,XY (Gui et al., 2019). La manifestación clínica en hombres afectados incluye, genitales ambiguos, hipospadia, micropene, criptorquidismo, siendo los genitales internos masculinos, y los testículos normales y la espermatogénesis normal o reducida. Los pacientes usualmente presentan valores normales o elevados de testosterona (T) y niveles bajos de dihidrotestosterona (DHT) y una razón T/DHT incrementada tanto basal como después de estimulación con gonadotropina coriónica (hCG) (Imperato-McGinley et al., 1974).

La deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 es causada por mutaciones en el gen *SRD5A2*, resultando en la pérdida de funciones del gen. Éste está localizado en el cromosoma 2, y está constituido por 5 exones separados por 4 intrones. El gen codifica para una isoenzima de 254 aminoácidos que contiene un dominio de unión a T y al cofactor NADPH (Thigpen et al., 1992a).

En pacientes con un grado disminuido de virilización, el diagnóstico diferencial debe ser realizado minuciosamente, y se requiere la realización de estudios anatómicos y hormonales precisos, antes de la asignación del sexo. En recién nacidos, los fenotipos subvirilizados clasificados como alteraciones en el desarrollo sexual 46,XY (del inglés “Disorders of Sex Development”, DSD 46,XY) tales como, deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa, síndrome parcial de insensibilidad androgénica o deficiencia de la enzima 17- $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 3 pueden ser indistinguibles (Cheon et al., 2011). En el

presente trabajo se pretende realizar estudios moleculares que permitan diagnosticar a los pacientes con ambigüedad genital, específicamente con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa referidos a la Unidad de Genética Médica del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA).

Todos los individuos afectados incluidos en el presente estudio provienen de una población aislada geográficamente ubicada sobre la cordillera de los Andes venezolanos, a 49 km de la zona poblada más cercana. La región geográfica del foco comprende un pueblo principal conocido como Pueblo Nuevo del Sur, ubicado a 1510 m.s.n.m, con una población actual de 1200 habitantes aproximadamente, rodeado por múltiples caseríos separados entre sí por terrenos abruptos, en conjunto constituyen la parroquia de Pueblo nuevo del Sur, la cual para el 2019 estaba constituida por 4392 habitantes. Pueblo Nuevo del Sur fue fundado poco antes de 1707 por la agrupación de unos pocos amerindios. Para el final del siglo XVIII se reportó el asentamiento de los primeros españoles en el área (Porrás, 1995).

En poblaciones como Pueblo Nuevo del Sur (Edo. Mérida), la consanguinidad juega un papel fundamental en la aparición de enfermedades autosómicas recesivas, cuando la frecuencia génica de los alelos mutados es alta. La conformación de uniones maritales entre personas consanguíneas puede incrementar la probabilidad de que la descendencia sea homocigota y por consiguiente la heterocigosis disminuiría en la misma, en contraste con aquellas parejas no consanguíneas en la cuales la frecuencia elevada de heterocigotos es lo más probable. Por consiguiente, padres consanguíneos portadores de alelos mutados asociados a una enfermedad podrían dar origen a una descendencia con una probabilidad aumentada de presentar dicha enfermedad (Rothhammer 1977).

Una gran cantidad de estudios han mostrado que en la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa resulta complejo el establecimiento directo de la relación genotipo – fenotipo cuando se pueden detectar niveles residuales de la actividad enzimática, es decir, individuos portadores de una misma mutación pueden presentar fenotipos diferentes, por ejemplo, las mutaciones p.G34R o p.L55Q en homocigosis en el gen *SRD5A2*, pueden expresar un rango de genitales externos muy variables, desde un fenotipo femenino hasta genitales externos parcialmente virilizados. Más aún, dentro de una familia se reportaron dos parientes heterocigotos compuestos, en el que uno fue criado como una niña normal y el segundo presentó microfalo e hipospadia y fue criado como varón (Maimoun et al., 2011). No obstante, actualmente no se ha establecido la causa precisa del por qué una mutación no siempre produce un mismo fenotipo, Maimoun y colaboradores (2011) propusieron que podía estar relacionado a señales de transducción del receptor de andrógenos, concentraciones circulantes o uterinas de testosterona, o factores ambientales. Para lograr esclarecer la diversidad de fenotipos en los pacientes incluidos en este estudio, se analizó un polimorfismo ubicado en el exón 1 del gen *SRD5A2*, el cual, en estudios previos fue asociado a la disminución de la actividad enzimática de la proteína codificada por el mismo gen y que podría modular el fenotipo de los pacientes estudiados.

Un recién nacido con ambigüedad genital constituye una emergencia neonatal. Más allá de la posibilidad de presentar graves alteraciones metabólicas, se le suma la emergencia social que genera el nacimiento de un niño o niña que no puede en un principio, ser asignado en alguno de los géneros que la sociedad y las leyes actuales contemplan. Por tanto, es imperativo establecer el origen de la condición de manera efectiva, y así proporcionar un diagnóstico preciso y asegurar que el paciente reciba la atención médica adecuada.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La localidad de Pueblo Nuevo del Sur se caracteriza por encontrarse aislada geográficamente de otros pueblos aledaños, por lo que los enlaces consanguíneos pueden favorecer la aparición de enfermedades autosómicas recesivas, por ejemplo, la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa. En la actualidad contamos con siete afectados, pertenecientes a diferentes núcleos familiares, pero que presentan consanguinidad en diferentes generaciones, de los cuales sólo tres serán objeto de estudio. Tanto la endogamia como el aislamiento geográfico han contribuido para que los casos de ambigüedad genital alcancen frecuencias por encima de las esperadas en ésta región. Es por esto, que es necesario establecer molecularmente el tipo de mutación que causa la ambigüedad genital en los pacientes oriundos de la zona. Además, resulta imprescindible establecer un protocolo de identificación de la mutación para lograr establecer de manera eficiente el diagnóstico en futuros pacientes, de manera que se pueda ofrecer un tratamiento óptimo, efectivo y acucioso, lo cual favorecería la incorporación del recién nacido a la sociedad.

Por otra parte, por las características ya mencionadas de ésta comunidad es importante establecer la frecuencia de portadores heterocigotos de la mutación en la población sana, puesto que esto permitiría predecir la frecuencia de aparición de ésta enfermedad. Adicionalmente, la identificación de la ancestralidad de la mutación puede generar información clave para dilucidar el origen étnico de la misma, lo cual representa una información valiosa para el conocimiento de aspectos de genética epidemiológica del poblado, con aplicación eventual en otras poblaciones del país o del mundo.

Y, por último, a nivel mundial se han reportado varios casos de ambigüedad genital en la cual no hay relación entre el fenotipo y el genotipo en los pacientes. Esto conduce a investigar regiones reguladoras de ADN del gen en estudio, para establecer la causa de la ausencia de relación fenotipo – genotipo.



### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Desarrollo embrionario del sistema genital:

Aunque el sexo cromosómico y génico de un embrión se determina en el momento de la fecundación según la carga cromosómica sexual del espermatozoide que fecunda el óvulo, el desarrollo de las características morfológicas masculinas y femeninas no comienzan hasta la séptima semana, para ese momento ambos sexos presentan aparatos genitales idénticos, denominándose a esta primera etapa del proceso como estadio indiferenciado del desarrollo sexual (Sadler, 2012).

Al principio las gónadas aparecen como un par de crestas longitudinales, denominadas crestas genitales o gonadales, formadas por la condensación del mesénquima subyacente. Las células germinales primitivas migran desde la pared posterior del saco vitelino a lo largo de la pared del intestino posterior, hasta llegar a la región de las crestas genitales en la sexta semana de gestación; una vez alcanzada las gónadas, las células germinales primordiales se diferencian en gametos masculinos o femeninos dependiendo del ambiente propiciado por las células somáticas de la gónada. Si no consiguen llegar a las crestas, las gónadas no se desarrollan (Carlson, 2009).

Durante la migración y posterior colonización, que corresponden a la cuarta y novena semana de gestación, las células germinales proliferan e incrementan de aproximadamente 1000 a 450.000 en embriones femeninos y alrededor de 150.000 en varones. Entre la semana 11-12, las células sexuales comienzan a desarrollar dimorfismo sexual. En testículos, entran en arresto mitótico, mientras que en ovarios comienzan a entrar en la primera profase meiótica, lo cual ocurre radialmente, por lo que el proceso es iniciado en las células de la

médula y las últimas células en diferenciarse se localizan en la región cortical. Se ha propuesto que éste fenómeno es producto de la secreción de ácido retinoico por parte del ovario (Wilhelm, Yang, & Thomas, 2013).

Poco antes de la llegada de las células primordiales, el epitelio de la cresta genital prolifera y las células epiteliales se introducen en el mesénquima subyacente, donde se forman los cordones sexuales primitivos que conectan el epitelio superficial y son idénticos en gónadas femeninas y masculinas, en consecuencia, la gónada se conoce como gónada indiferenciada (Sadler, 2012).

Entre la quinta y sexta semana de gestación, tanto los embriones masculinos como femeninos poseen dos pares de conductos genitales, los conductos mesonéfricos o wolffianos que desempeñan un papel importante en el desarrollo del aparato reproductor masculino, mientras que los conductos paramesonéfricos o müllerianos lo hacen en el femenino (Moore & Persaud, 2004).

En embriones 46,XY alrededor de la séptima semana, comienzan a condensarse los cordones gonadales y comienzan a expandirse hacia la médula de la gónada indiferenciada, donde se ramifican y anastomosan para formar la red testicular, la cual se hace continua con 15 a 20 túbulos mesonéfricos que se transforman en los conductillos eferentes, que a su vez se conectan al conducto mesonéfrico originando el conducto del epidídimo (Moore & Persaud, 2004).

Consecutivamente, en el cuarto mes, los cordones testiculares adquieren forma de herradura y sus extremidades son continuas con la red testicular. En este momento los cordones están constituidos por células germinales primitivas y células sustentaculares o

células de Sertoli, derivadas de las células superficiales de la glándula, las cuales producen la hormona antimülleriana (HAM) entre la sexta y séptima semana de gestación, cuya función principal es la supresión del desarrollo de los conductos paramesonéfricos (müllerianos), que forman el útero y las trompas uterinas. Las células intersticiales de Leydig, procedentes del mesénquima original de la cresta gonadal, se encuentran entre los cordones testiculares. Hacia la octava semana las células de Leydig comienzan a producir testosterona, la cual influye en la diferenciación de los conductos genitales y genitales externos (Moore & Persaud, 2004; Sadler, 2012).

Los conductos testiculares son sólidos hasta la pubertad, momento en el que adquieren una luz y se forman los túbulos seminíferos, que luego se unen a la red testicular, que a su vez se introducen en los conductillos eferentes los cuales se unen a los conductos de Wolff y constituyen el conducto deferente (Sadler, 2012).

Por otra parte, el desarrollo de los genitales externos masculinos depende de los andrógenos secretados por los testículos y se caracteriza por el rápido alargamiento del tubérculo genital denominado falo, durante el alargamiento se forman las paredes laterales del surco uretral, revestido por células del endodermo que forman la placa uretral. En el tercer mes de gestación se forma la uretra peniana, la cual no alcanza la punta del falo hasta el cuarto mes cuando células ectodérmicas de la punta del falo se introducen y forman el meato uretral externo. A su vez, las protuberancias escrotales se originan en la región inguinal, con el desarrollo, se desplazan caudalmente formando cada una la mitad del escroto separadas por el tabique escrotal (Sadler, 2012).

El desarrollo gonadal de embriones 46,XX, por otra parte, comienza alrededor de la décima semana de gestación, en el cual, los cordones gonadales degeneran y desaparecen con el transcurso del desarrollo y los cordones corticales se extienden y se incorporan a ellos las células germinales primitivas (Moore & Persaud, 2004).

En los embriones femeninos, los conductos mesonéfricos involucionan por ausencia de testosterona y los paramesonéfricos se desarrollan como consecuencia de la ausencia de HAM. El desarrollo sexual femenino no depende de la presencia de ovarios ni de hormonas. Los conductos paramesonéfricos constituyen casi todo el aparato genital femenino (trompas uterinas, útero y porción superior de vagina) y la parte inferior de la vagina se forma a partir del seno urogenital (Moore & Persaud, 2004).

La feminización de los genitales externos no se comprende completamente, sin embargo, se ha demostrado que los estrógenos producidos por la placenta y ovarios fetales participan en este proceso (Moore & Persaud, 2004).

### **3.2. Vías genéticas de la diferenciación sexual.**

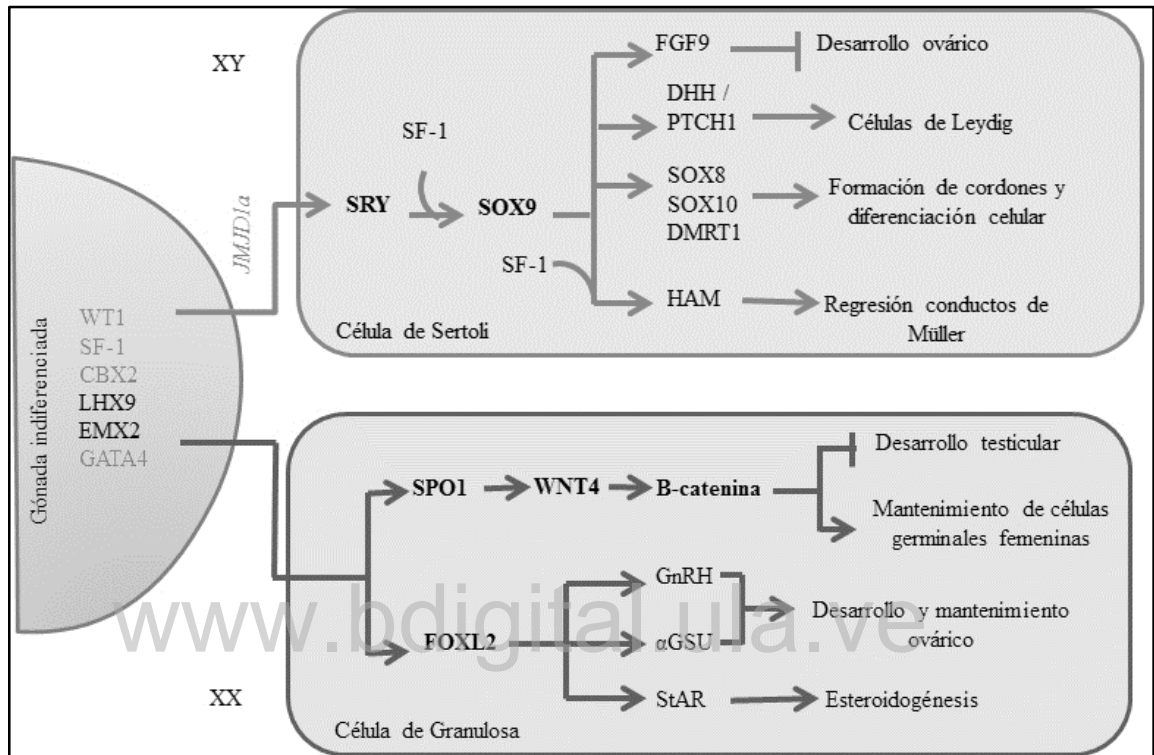
El desarrollo gonadal resulta diferente a cualquier otro órgano, debido a su potencial a diferenciarse en dos órganos funcionalmente distintos, testículo u ovario (Eid & Biason-Lauber, 2016). El desarrollo sexual ocurre en dos diferentes etapas secuenciales, conocidas como: determinación sexual y diferenciación sexual. La determinación sexual es dictada por el complemento de los cromosomas sexuales y corresponde a la formación de las gónadas, es decir, el compromiso de la gónada indiferenciada en ovario o testículo, un proceso que resulta ser independiente de hormonas. La presencia del cromosoma Y conduce a la formación de testículo y su ausencia resulta en el desarrollo de ovario. Una vez formadas las

gónadas, las hormonas rigen la siguiente etapa referida como diferenciación sexual, éste es un proceso completamente dependiente de hormonas. Las alteraciones del desarrollo sexual (DSD, del inglés “Disorder of Sex Development”) emergen cuando este proceso fuertemente regulado es interrumpido, como resultado de mutaciones que interfieren con el desarrollo de testículo u ovario o la acción hormonal endocrina sobre sus tejidos blancos (Sharpe, 2006).

En mamíferos dos hitos han moldeado el conocimiento actual sobre la determinación sexual. El primero, en 1959, la identificación de dos DSD como son el síndrome de Turner y el síndrome de Klinefelter, los cuales establecieron que el cromosoma Y portaba genes masculinizantes (Ford & Jones, 1959; Jacobs & Stornig, 1959). El segundo ocurrió 30 años después, con el descubrimiento del gen *SRY* (del inglés, “Sex-determining region on the chromosome Y”), descrito mediante la identificación de secuencias conservadas en cuatro pacientes masculinos con cariotipo 46,XX (Sinclair et al., 1990). Sin embargo, en las últimas décadas el conocimiento sobre los genes y los mecanismos asociados con el desarrollo y función gonadal en mamíferos se ha profundizado considerablemente, mediante el análisis de mutaciones en ratones y humanos que presentan algún tipo de DSD (Lucas-Herald & Bashamboo, 2014).

Si bien en las últimas décadas se han realizado avances considerables en el área de conocimiento de los factores genéticos involucrados en el desarrollo gonadal, es importante resaltar que la mayoría de las causas genéticas subyacentes a las alteraciones del desarrollo sexual permanecen desconocidos, de hecho ha sido estimado que sólo el 20% de los casos han sido diagnosticados molecularmente, lo que pone en evidencia el sustancial vacío de información que existe y la necesidad de profundizar los conocimientos en éste campo (Eid, Opitz, & Bason-Lauber, 2015).

A continuación, se discutirán los genes más relevantes que intervienen en el complejo proceso de maduración sexual. En la Figura 1 se presenta un esquema de los principales genes involucrados en el desarrollo sexual y su función básica.



**Figura 1.** Principales genes involucrados en el desarrollo del aparato genital masculino y femenino. Las flechas representan la progresión y las barras la inhibición de la función.

### 3.2.1 Determinantes genéticos de la gónada bipotencial:

Se han identificado seis genes fundamentales para la formación inicial de la cresta genital bipotencial, los cuales son: *WT1*, *NR5A1*, *CBX2*, *LHX9*, *EMX2* y *GATA4*.

#### *WT1* (Wilms tumor suppressor 1)

El gen supresor del tumor de Wilms 1 (*WT1*) localizado en 11p13, codifica para un factor de transcripción del tipo dedos de zinc, expresado en la gónada incipiente, mesonefros

y riñón. La expresión de WT1 involucra una compleja regulación y al menos 24 isoformas son generadas en mamíferos mediante cortes y empalmes alternativos, uso de promotores alternativos y edición de ARN. Las isoformas +KTS y -KTS son de particular importancia para el desarrollo gonadal, las cuales son resultado de empalme alternativo del exón 9, cada isoforma puede ser distinguida por la presencia o ausencia de tres aminoácidos (lisina, treonina, y serina) entre los dedos de zinc 3 y 4. La isoforma + KTS ha sido implicada en regulación post-transcripcional, mientras que la isoforma -KTS actúa como un factor de transcripción. Individuos con mutaciones en el intrón 9 presentan el síndrome de Frasier, una entidad urogenital, que en algunos casos, incluye disgenesia gonadal y sexo reverso en pacientes 46,XY (M. S. Kim et al., 2010; Wilhelm et al., 2013).

*NR5A1 (Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1)*

El gen *NR5A1* localizado en 9q33, codifica para el factor esteroideogénico 1 (SF-1), un receptor hormonal nuclear perteneciente a la subfamilia de receptores huérfanos, el cual, a comienzos de los años 90 fue identificado como regulador general de las enzimas esteroideogénicas (Lala, Rice, & Parker, 1992; Rice, Mouw, Bogerd, & Parker, 1991). En el embrión comienza a ser expresado en la cresta urogenital indiferenciada, siendo el primer marcador de diferenciación gonadal y adrenal. SF-1 es un regulador positivo o cofactor de un gran número de proteínas esenciales involucrados en el desarrollo de múltiples estructuras del sistema genital (Ingraham et al., 1994; Schimmer & White, 2010).

*CBX2 (Chromobox Homolog 2)*

*CBX2* está localizado en el cromosoma 17 (17q25.3) y es miembro de la familia de genes que codifican para proteínas polycomb, que funcionan como reguladores

transcripcionales formando grandes complejos multiprotéicos, los cuales ejercen su función a través de la modulación de la estructura de orden superior de la cromatina. Todas las proteínas que constituyen esta familia son requeridas para el mantenimiento de la expresión de genes involucrados en el desarrollo y diferenciación celular. En humanos se han detectado heterocigotos compuestos para mutaciones de pérdida de función en el gen *CBX2* en pacientes 46, XY con fenotipo femenino, presentando ovario, útero y genitales externos normales, los cuales fueron diagnosticados accidentalmente debido a la discrepancia entre el cariotipo prenatal y el fenotipo al nacer (Eid et al., 2015). La pérdida de función de éste gen conlleva a la reducción de los niveles de expresión de *NR5A1*, sugiriendo que *CBX2* es un regulador de la expresión SF1 (Lucas-Herald & Bashamboo, 2014).

*LHX9 (Lim Homeobox Gene 9):*

El gen *LHX9* localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q31.3) codifica para una proteína que pertenece a la familia LIM, caracterizada por la presencia de 2 dominios amino terminales, uno involucrado predominantemente en interacción proteína – proteína y el otro corresponde a un dominio homeobox de unión al ADN. Aun cuando no se ha reportado ningún paciente con algún tipo de DSD que presente mutaciones en este gen, en el año 2000 Birk y colaboradores demostraron que en ratones *Lhx9* *-/-*, las células germinales migran normalmente, pero las células somáticas de la cresta genital indiferenciada no proliferan como lo esperado, y por lo tanto, no ocurre un desarrollo gonadal normal, produciendo sexo reverso en ratones cromosómicamente machos. A su vez, estos investigadores demostraron que en estos ratones la expresión de *Nrs5a1* disminuye considerablemente, por lo que proponen que *Lhx9* puede actuar como un regulador de la expresión de *Nrs5a1* (Birk et al., 2000; Lucas-Herald & Bashamboo, 2014).



*EMX2 (Empty-Spiracles Homeobox Gene 2):*

El gen *EMX2* es un ortólogo del gen *empty spiracles (ems)* descrito en *Drosophila* y se localiza en 10q26.11. Las observaciones realizadas en modelos animales condujeron a proponer al gen *EMX2* como uno de los genes involucrados en la formación de la gónada bipotencial, adicionalmente éste gen ha sido propuesto como uno de los genes importantes que intervienen en el proceso de masculinización, sin embargo, se han obtenido escasas evidencias que impliquen este gen con enfermedades de desarrollo sexual en humanos (Miller et al., 2009; Piard et al., 2014; Sa et al., 2009).

*GATA4 (GATA – Binding Protein 4):*

Este gen pertenece a la familia de genes GATA, altamente conservada a lo largo de la evolución, constituida por seis reguladores transcripcionales específicos de tejidos u órganos en vertebrados y localizado en la posición 8p23.1. En los últimos años se demostró que esta proteína tanto en ratones como humanos es fuertemente expresada por células somáticas durante el desarrollo gonadal, de tal manera se ha demostrado que ratones con expresión reducida del gen *Gata4* exhiben un desarrollo anormal de los genitales (Bouma, Washburn, Albrecht, & Eicher, 2007; Hu, Okumura, & Page, 2013; Lucas-Herald & Bashamboo, 2014). Como se ha mencionado anteriormente, la gónada indiferenciada es potencialmente competente de diferenciarse en un aparato reproductor masculino o femenino y cada destino potencial está gobernado por la expresión diferencial de un grupo de genes, los cuales se describen a continuación:

### 3.2.2 Determinación genética de testículo

*SRY (Sex – Determining Region sobre el cromosoma Y):*

El gen *SRY* localizado en el cromosoma Y, específicamente en la posición Yp11.2 es miembro de la gran familia de factores de transcripción *SOX*, los cuales cumplen diversos roles en la embriogénesis y el desarrollo de muchos órganos, típicamente actuando como conmutador de la diferenciación celular (Bowles, Schepers, & Koopman, 2000).

*SRY* funciona como el gen determinante de sexo dentro de la cascada genética de desarrollo de testículos. Es bien conocido que el gen diana de *SRY* es *SOX9*, regulando su expresión en los precursores de las células de Sertoli (She & Yang, 2017). Aún no ha sido elucidada completamente la regulación de la expresión de *SRY*, se han propuesto diversos activadores potenciales como *CBX2*, *WT1* y *GATA4* (Lucas-Herald & Bashamboo, 2014). Adicionalmente, en los últimos años se ha investigado cómo la regulación epigenética puede contribuir a la expresión de *SRY*, demostrándose en ratones que la desmetilasa *JMJD*, la cual desmetila *H3K9*, es crucial para la expresión de *SRY* (Kuroki et al., 2014).

En humanos, *SRY* es sobre Las mutaciones son heredadas con un patrón expresado a partir de la séptima semana de gestación en la cresta urogenital e induce la diferenciación de la gónada bipotencial en testículo en individuos 46,XY. Aproximadamente 15% de los individuos 46,XX con DSD testicular presentan mutaciones en el gen *SRY* y 10% de los pacientes con DSD ovotesticular portan el gen *SRY* en su genoma, explicando el fenotipo que ellos expresan (Bashamboo & McElreavey, 2013). Más de 50 mutaciones han sido reportadas en *SRY* asociadas con sexo reverso, la mayoría de las cuales afectan el dominio HMG y son asociadas a disgenesia gonadal (Gunes, Mahmutoglu, & Agarwal, 2016).

*SOX9 (SRY- Related HMG Box 9):*

*SOX9* es un gen cuyo locus es 17q24.3 codifica para una proteína que está constituida por un dominio HMG, y como se mencionó anteriormente es el principal gen diana de *SRY*. *SOX9* desempeña un rol importante en la especificación y diferenciación de las células mesenquimales hacia el linaje condrogénico, a través de la modulación transcripcional del gen *COL2A1*, este gen codifica para la principal proteína que constituye la matriz del cartílago maduro, así como estableciendo la identidad de las células de Sertoli en el testículo en desarrollo inmediatamente después de la expresión de *SRY*. Muchas mutaciones en el gen y en regiones flanqueadoras de *SOX9*, han sido asociadas con la displasia campomélica, los cuales adicionalmente en un 75% pueden presentar disgenesia testicular con expresividad variable (Bashamboo & Mcelreavey, 2016).

*SOX9* es un gen autosómico cuya expresión es activada por la acción concomitante de *SRY* y *SFI*, al unirse a una región reguladora del gen conocida como Tesco, por sus siglas en inglés Testis specific enhancer of Sox9 core. Adicionalmente se ha demostrado que p.*SOX9* establece una retroalimentación positiva con el gen *FGF9* y su receptor *FGFR2*, lo que perpetúa el mantenimiento de la expresión de *SOX9* y a su vez reprime la expresión de *WNT4*, gen involucrado en el desarrollo del aparato reproductor femenino (Morel, Roucher, Mallet, & Plotton, 2014).

A finales de los 90 se identificó otro gen blanco de *SOX9* y *SFI*, actuando en forma conjunta sobre el promotor del gen *AMH*, y de esta forma promueven su expresión (Cox, Willatt, Homfray, & Woods, 2011).

En humanos la duplicación de *SOX9* induce la aparición de sexo reverso completo de femenino a masculino en individuos XX, lo que indica que la sobre expresión de *SOX9* es suficiente para inducir la formación de testículos en ausencia de *SRY* (Cox et al., 2011).

En este punto es importante destacar que se han descrito tres umbrales críticos en la cresta genital esenciales para el desarrollo de testículo: los niveles de expresión de *Sry*, de *Sox9*, y el número de células de Sertoli. La expresión espacio – temporal de *Sry* es estrictamente reguladas y debe iniciar y mantener la expresión de *Sox9* en una ventana de tiempo crítica en las gónadas cromosómicamente masculinas. Un retraso en la expresión de *Sry* de más de seis horas es capaz de inducir la expresión de *SOX9* pero falla en el mantenimiento de niveles altos de expresión del mismo, lo que puede conducir a la formación de ovario. Adicionalmente, puesto que el linaje de las células de Sertoli es el primer tipo de células que aparecen durante la diferenciación testicular, es necesario un número crítico de estas células para que ocurra un reclutamiento adecuado de otras células que intervienen el desarrollo del aparato reproductor masculino (She & Yang, 2017).

*AMH (Anti-Müllerian Hormone):*

La hormona anti-Mülleriana o sustancia inhibidora Mülleriana es miembro de la familia de factores transformantes de crecimiento, codificada por el gen *AMH* el cual mapea en la posición 19p13.3. *AMH* es únicamente expresada por las células de Sertoli, desde períodos embrionarios hasta la adolescencia, exceptuando un corto período perinatal donde la expresión declina transitoriamente. La vía de señalización de *AMH* es esencial y suficiente para desencadenar la regresión de los ductos Müllerianos. Actualmente se han propuesto

varios factores de transcripción como NR5A1, SOX9, GATA4 y WT1, como los principales reguladores de la expresión de *AMH* (Lucas-Herald & Bashamboo, 2014)

*FGF9 (Fibroblast growth factor):*

El gen *FGF9* cuyo locus es 13q12.11 codifica para la proteína que juega un papel crucial en la diferenciación de testículo controlando la migración de las células mesonéfricas a la gónada XY. La migración de estas células da origen a tres tipos de poblaciones de células y más importante aún, esta migración es necesaria para la organización de los cordones seminíferos en el testículo. En efecto, en gónadas XY el bloqueo de la migración soslaya la formación de dichas estructuras. Por el contrario, cuando se induce la expresión de este gen en gónadas XX, se desarrollan cordones mesonéfricos y adquiere patrones de expresión de genes específicos masculinos (Cotinot et al., 2002; Wilhelm et al., 2007).

*DMRT1 (Doublesex and mab-3-Related Transcription Factor 1):*

Este gen codifica para un factor de transcripción que presenta un dominio DM de unión a ADN similar tanto funcional como estructuralmente parecido a un dominio de dedo de zinc, el cual cumple un papel de pivote en la diferenciación sexual. Este gen está localizado en la posición 9p24.3 y es expresado en la cresta indiferenciada pero a partir de la séptima semana de gestación la expresión del gen *DMRT1* está restringida a los túbulos seminíferos y no es detectado durante el desarrollo de las gónadas femeninas. Estudios desarrollados en ratones han demostrado que *DMRT1* es esencial para el mecanismo de determinación de testículo (Lucas-Herald & Bashamboo, 2014; Matson et al., 2011).

*NROB1* o *DAX1* (*Nuclear Receptor subfamily 0 group B member 1*):

*NRB0B1* codifica un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares, su locus es Xp21.2 y es responsable de la aparición de sexo reverso en humanos, sensible a la dosis, en el cual, individuos XY portando una duplicación parcial del brazo corto del cromosoma X se desarrollan como mujeres (Cotinot et al., 2002; Wilhelm et al., 2007).

Se localiza fuera de la región pseudoautosómica y es sensible a dosis. Se expresa en corteza suprarrenal y células de Sertoli. Es gen diana del SF1 y es regulado por WT1 y WNT4. Antagoniza con el SOX9 e inhibe la formación del testículo. Mutaciones del *DAX1* causan hipoplasia suprarrenal congénita e hipogonadismo. Doble dosis en varones causa sexo reverso con la inhibición del testículo (Del Rey, 2016).

*DHH* (*Desert Hedgehog*):

El gen *DHH* (12q13.12) codifica una proteína que pertenece a la familia de moléculas de señalización “hedgehog”, cuyas mutaciones en humanos está asociado con disgenesia gonadal 46, XY completa o parcial. *DHH* es expresado en las células de Sertoli y su receptor denominado PTCH1, es expresado por las células intersticiales. Estudios en ratones *Dhh*<sup>-/-</sup> sugieren que esta vía de señalización dispara la diferenciación de las células de Leydig, así como la diferenciación de las células peritubulares y consecuente formación de los cordones testiculares (Lucas-Herald & Bashamboo, 2014; Yao, Whoriskey, & Capel, 2002).

Adicionalmente, muchos genes descritos anteriormente, esenciales para el desarrollo de la gónada indiferenciada continúan siendo expresados durante el desarrollo de testículo, como son, *CBX2*, *NR5A1* y *GATA4*, los cuales participan como reguladores positivos o cofactores de un gran número de factores esenciales para la diferenciación de la gónada

masculina incluyendo *SRY*, *SOX9*, *AMH*, así como moduladores de la expresión de múltiples genes involucrados en el establecimiento adecuado de las vías endocrinas subyacentes a todo el desarrollo sexual masculino (Lucas-Herald & Bashamboo, 2014).

### ***3.2.3 Determinación genética de ovario:***

La determinación somática de ovario requiere dos vías de señalización, la *RSP01/WNT4/β-catenina* y *FOXL2*, aunque no está claro cómo estas dos vías engranan durante el proceso de determinación sexual femenina.

*WNT4* (*Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Miembro 4*):

*WNT4* es miembro de la familia Wnt, constituida por moléculas secretadas, las cuales actuando de manera paracrina intervienen en diferentes procesos durante el desarrollo. Este gen mapea en el cromosoma 1, específicamente en la posición 1p36.12. Su mecanismo de acción es activado por la interacción de las proteínas WNT con el complejo Frizzled/LRP5/receptor 6 en la superficie celular, lo que conduce a la disrupción de la degradación de la β-catenina, permitiendo a su vez, que ésta molécula sea translocada al núcleo donde regula la expresión de una gran variedad de genes diana en colaboración con factores de transcripción pertenecientes a la familia TCF/LEF. En el tejido gonadal *WNT4* actúa como represor de la cascada de diferenciación masculina. En humanos, se han reportado pocos casos de pacientes con fenotipos similares a los que presentaron los ratones nulos, estos pacientes presentaron mutaciones en *WNT4* en heterocigosis (Wilhelm et al., 2013).

### *RSPO1 (R-Spondin Family 1):*

Este gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 1, específicamente en la posición 1p34.3 y pertenece a la familia de proteínas secretadas que contiene dominios similares a furina que actúan como intensificadores de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y exhiben funciones pleiotrópicas en el desarrollo. (Chassot et al., 2008; Lucas-Herald & Bashamboo, 2014; Wilhelm et al., 2013). En humanos, se encontró una duplicación del gen *RSPO1*-en pacientes que exhibían sexo reverso de masculino a femenino, genitales ambiguos, hipospadia severa, gónada fibrosas y remanentes de ambos ductos (Eid & Biason-lauber, 2016).

### *FOXL2 (Forkhead Transcription Factor 2):*

*FOXL2* es un gen cuyo locus está en el cromosoma 3 (3q22.3), codifica para una proteína expresada en el mesénquima que da origen a los párpados y en células granulosas en la vida fetal y adulta. *FOXL2* interactúa directamente con el promotor del gen de respuesta aguda de esteroidogénesis (*StAR*), para inhibir su transcripción basal (Eid & Biason-Lauber, 2016). En humanos, mutaciones en este gen son responsables del síndrome de blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso (BPES), el cual es un síndrome genético que conduce a malformaciones de párpados y otras anomalías craneofaciales y puede estar asociado con fallo ovárico prematuro (Crisponi et al., 2001).

### ***3.2.4 Interacción entre las vías de determinación sexual:***

En la actualidad, diversos estudios han suministrado evidencias que demuestran que las vías de determinación masculina y femenina se suprimen activamente una a la otra durante la diferenciación gonadal. Cabe esperar, dado el papel fundamental que desempeña



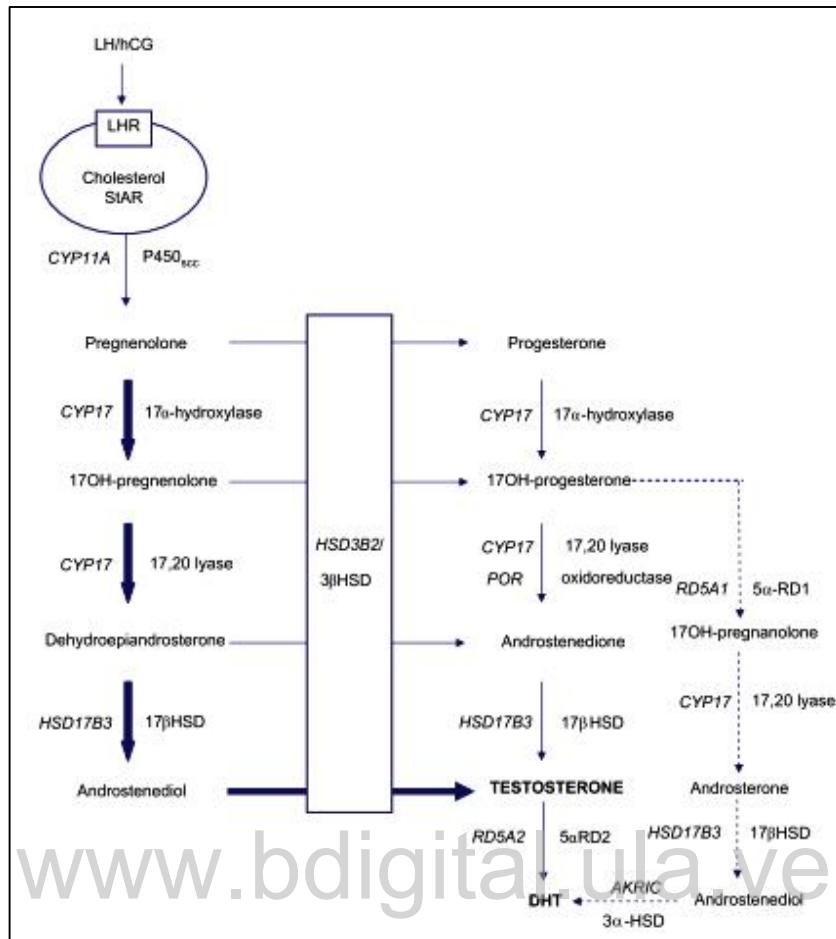
*SOX9*, que éste actúe como uno de los principales elementos en la especificación del destino de la gónada indiferenciada. Por lo tanto, *SOX9* representa el principal blanco del factor de transcripción FOXL2 (específico de la vía de feminización), éste se une a las regiones reguladoras del gen *SOX9* y evita la sobre-expresión del mismo durante el desarrollo de los ovarios (Uhlenhaut et al., 2009). Adicionalmente, dos componentes de las vías de diferenciación gonadal que interactúan son las moléculas FGF9 y WNT4. Durante el desarrollo testicular, la expresión de *FGF9* es incrementada por la acción de *SOX9*, promoviendo el mantenimiento de la expresión de *SOX9* y a su vez, inhibiendo la expresión de *WNT4*. En el ovario, la retroalimentación positiva establecida entre *SOX9* y FGF9 es bloqueada por *WNT4* al inhibir la expresión directa o indirectamente de *SOX9*. Durante el desarrollo testicular FGF9 inhibe la expresión de *WNT4* previniendo la disrupción del circuito *SOX9-FGF9* (Eggers, Ohnesorg, & Sinclair, 2014; Jameson, Lin, & Capel, 2012; Kim et al., 2006).

### **3.3. Vías hormonales en la diferenciación sexual:**

Las enzimas esteroideogénicas son responsables de la biosíntesis a partir del colesterol de varias hormonas incluyendo: glucocorticoides, mineralocorticoides, progestinas, andrógenos y estrógenos. Esto es llevado a cabo mediante una gran cantidad de enzimas específicas como: citocromo P450 (CYPs), hidroxisteroides deshidrogenasa (HSDs) y esteroides reductasas. Numerosos órganos tienen la capacidad de sintetizar esteroides activos biológicamente, sin embargo, la glándula adrenal, testículos y ovarios son los órganos especializados en la síntesis *de novo* de las hormonas (Sanderson, 2006).

La síntesis *de novo* comienza cuando el colesterol es convertido en pregnenolona por la enzima CYP11A. La pregnenolona es convertida a progesterona por 3 $\beta$ HSD. En testículos, en las células de Leydig la hormona luteinizante (LH) induce la síntesis de varias de las enzimas citocromo P450 y deshidrogenasas involucradas en la síntesis de la testosterona incluyendo, CYP17 17,20 liasa, cuya actividad es clave para dirigir la biosíntesis de esteroides hacia las hormonas sexuales. El andrógeno débil androstenediona es convertido a testosterona por la enzima 17 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa. Las células de Leydig, Sertoli y células germinales expresan bajos niveles de aromatasas, los cuales convierten la testosterona en estradiol, un paso que parece ser necesario para la iniciación exitosa de la espermatogénesis. El andrógeno más potente, la DHT (Dihidrotestosterona) es formada a partir de la testosterona por la 5- $\alpha$ -reductasa (Sanderson, 2006). En la figura 2 se detalla cada una de las enzimas y pasos que se llevan a cabo para la biosíntesis de las enzimas androgénicas.

En el ovario, el óvulo está rodeado de células granulosas y luego por las células teca, las cuales están altamente vascularizadas y producen grandes cantidades de progesterona y andrógenos, los cuales actúan como precursores para la síntesis de estrógeno en las células granulosas. La androstenediona y la testosterona difunde en las células granulosas pobremente vascularizadas, donde son convertidas predominantemente a estradiol mediante la acción de la aromataasa y la 17 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa, el cual favorece la conversión de estrona a estradiol (Sanderson, 2006). En la figura 2 se detallan todas las reacciones involucradas para la síntesis del estrógeno.



**Figura 2.** Vías enzimáticas para la síntesis *de novo* de las hormonas sexuales. Tomado de Hughes 2008.

### 3.4. Alteraciones del desarrollo sexual:

El paradigma de Jost establece que deben ocurrir cuatro pasos durante la diferenciación sexual: establecimiento del sexo cromosómico durante la fertilización, formación de las gónadas indiferenciadas, diferenciación gonadal en testículo u ovario y el desarrollo de los genitales internos y externos. Las alteraciones de desarrollo sexual (DSD, del inglés Disorders of sex Development) surgen por defectos en alguno de estos pasos (Massanyi, Dicarlo, Migeon, & Gearhart, 2013). Por lo tanto, las alteraciones del desarrollo sexual son

definidas como una condición congénita en la cual el desarrollo del sexo cromosómico, gonadal o genital es atípico (Eid & Biason-Lauber,2016). En el 2006, cincuenta expertos pertenecientes a la Sociedad de Endocrinología Pediátrica Lawson Wilkins y la Sociedad Europea para Endocrinología Pediátrica, propusieron lo que actualmente se conoce como el Consenso de Chicago, donde se acuñó el término DSD a todas aquellas entidades denominadas anteriormente como intersexualidad, pseudohermafroditismo, hermafroditismo y sexo reverso, debido a que éstos términos eran percibidos como peyorativos por los pacientes y podían ser confusos para los especialistas. En la tabla 1 se presenta la nueva nomenclatura utilizada actualmente, comparándola con la nomenclatura utilizada previamente (Lee, Houk, Ahmed, & Hughes, 2006).

**Tabla 1.** Nomenclatura implementada a partir del Consenso de Chicago.

Previa	Actual
<b>Intersexo</b>	DSD
<b>Pseudohermafroditismo masculino, subvirilización de hombre XY, submasculinización de un hombre XY</b>	46,XY DSD
<b>Pseudohermafroditismo femenino, virilización de mujer XX, masculinización de mujer XX</b>	46,XX DSD
<b>Hermafrodita verdadero</b>	DSD ovotesticular
<b>Varón XX o sexo reverso XX</b>	DSD 46,XX testicular
<b>XY sexo reverso</b>	Disgenesia gonadal completa 46,XY

A raíz de éste consenso se estableció una nueva clasificación, la cual dividía en tres grandes grupos los DSD, según su etiología genética, DSD por anomalías en los cromosomas sexuales, DSD en individuos 46,XY y DSD en individuos 46,XX. Dentro del primer grupo se encuentran alteraciones cromosómicas como el síndrome de Turner o Klinefelter, el

primero clásicamente no ha sido asociado con anomalías en el desarrollo de los genitales, sin embargo, en el síndrome de Klinefelter pueden presentarse algunas anomalías de este tipo. Los DSD 46,XY, se han subdividido en dos grandes grupos: a) alteraciones de desarrollo gonadal (testicular), dentro de los cuales se describen defectos asociados a disgenesia gonadal completa o parcial, regresión gonadal y DSD ovotesticulares. b) Alteraciones debidas a falla en síntesis o acción de los andrógenos, dentro de los que se encuentran aquellas enfermedades producto de defectos en la biosíntesis de los andrógenos, o defectos en la acción de los andrógenos, es decir mutaciones en el receptor de los andrógenos; de igual manera, se incluyen aquellos defectos en el receptor de la hormona luteinizante y entidades asociadas a mutaciones en los genes que codifican para HAM o su receptor. En los DSD 46,XX se han descrito igualmente dos grandes grupos: a) Entidades en las que el desarrollo gonadal (ovárico) es afectado, dentro de las que se encuentran los casos de DSD ovotesticulares, DSD testicular producto de duplicación del gen *SOX9* o presencia del gen *SRY* y disgenesia gonadal. b) Entidades producto de exceso de andrógenos fetales como por ejemplo la deficiencia 21- $\beta$ -hidroxilasa, responsable del 90% de los casos de DSD 46, XX. De igual forma, el origen de los andrógenos pueden ser feto-placentario así como materno (Cools, Looijenga, Wolffenbuttel, & Drop, 2009; Hughes, 2008; Lee et al., 2006).

Actualmente no hay datos precisos sobre la incidencia de las DSD, sin embargo, se ha estimado ser aproximadamente de 1 en 4.500-5.500, la frecuencia exacta de cada DSD no ha sido determinada puesto que no se cuentan con los datos necesarios, pero se ha estimado que las DSD 46,XY pueden encontrarse en 1 en 20.000 nacimientos, y si se consideran anomalías congénitas como criptorquidismo e hipospadia, la incidencia es considerablemente más alta entre 1:200 a 1:300. La incidencia mundial de DSD 46,XX ha sido estimada en 1 en 14.000

– 15.000 nacidos vivos. La incidencia de este grupo de enfermedades puede variar entre regiones debido a las diferentes frecuencias de mutaciones que pueden encontrarse en grupos étnicos determinados (Lee et al., 2016).

#### ***3.4.1 Alteraciones del desarrollo sexual 46,XY (DSD 46,XY):***

Las DSD 46,XY se caracterizan por una masculinización reducida causadas por disgenesia gonadal completa o parcial o por defectos en la síntesis o acción de andrógenos (Ahmed, Bashamboo, Lucas-Herald & McElreavey, 2013).

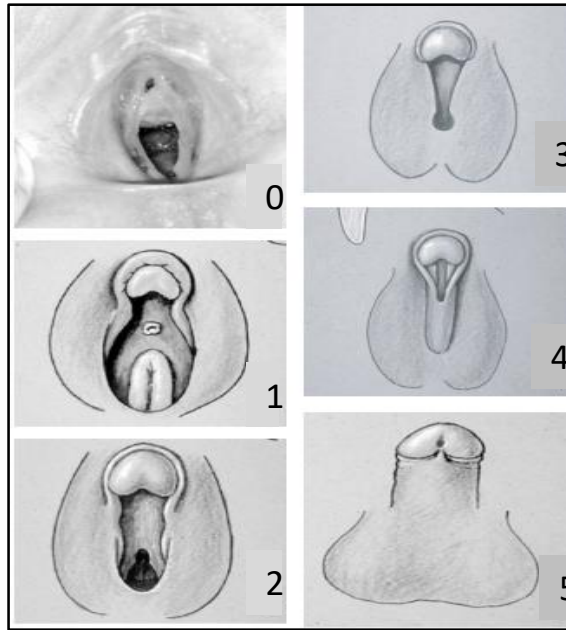
Los DSD 46,XY frecuentemente cursan con ambigüedad genital, por lo tanto, a lo largo del tiempo se han implementado lineamientos que permiten la clasificación de los genitales externos de los pacientes.

Un recién nacido con ambigüedad genital requiere una evaluación rápida y comprehensiva para la asignación apropiada del género y de la misma forma, se le proporcione la mejor atención por parte del equipo multidisciplinario que debe afrontar el caso. Para designar el género, debe prestarse importante atención al fenotipo predominante de los genitales externos, histología gonadal, acción y producción de andrógenos. Lo expuesto anteriormente condujo al desarrollo de pautas necesarias para clasificar el grado de ambigüedad de individuos con DSD, 46XY (Izquierdo & Glassberg, 1993).

La primera clasificación establecida para la descripción de los genitales externos en DSD 46,XY fue propuesta por Prader y Gurtner en 1955, la cual fue ampliamente utilizada por décadas, incluso en la actualidad permanece vigente, sin embargo nuevas clasificaciones han sido propuestas.

La clasificación de Prader divide en cinco categorías los genitales ambiguos, denominadas por número arábigo que oscilan entre el 1 al 5: Estado 1, refiere a pacientes que presentan clitoromegalia sin fusión de labios. Estado 2, se caracteriza por clitoromegalia y fusión posterior de los labios mayores. Estado 3, involucra un mayor grado de clitoromegalia con fusión casi completa de los labios mayores y presencia de seno urogenital. En el estado 4, el clítoris tiene mayor apariencia a un falo, el orificio uretral se encuentra en la base del clítoris y completa fusión de los labios. Estado 5, describe un fenotipo masculino debido a la transformación del clítoris y la uretra y fusión completa de los pliegues labiales (Prader & Gurtner, 1955). En la figura 3 se muestran las ilustraciones para cada uno de los estados propuestos en la clasificación de Prader.

A pesar de lo ampliamente utilizada la clasificación de Prader, ésta resulta un poco imprecisa y subjetiva; atendiendo a la necesidad de estandarizar la descripción física de los genitales externos en 1998 se propuso la asignación de un puntaje para determinar el grado de masculinización en diferentes casos con ambigüedad genital con etiopatogenias diversas. Ahmed y colaboradores propusieron este puntaje denominado “External Masculinization Score” (EMS), el cual se basa en las características anatómicas presentadas en la Tabla 2, el puntaje puede oscilar entre 1 y 12, en los cuales un puntaje cercano a 12 representan genitales externos con un mayor grado de masculinización, mientras que un puntaje cercano a cero se considera un fenotipo más ambiguo o femenino (Ahmed, Khwaja, & Hughes, 2000).



**Figura 3.** Representación gráfica de los estadios en la clasificación de Prader. Los números en la esquina inferior derecha corresponden al número del estadio, 0 representa genitales externos femeninos normales. (Tomado de Ahmed, 2000)

**Tabla 2.** Puntaje de Masculinización externa (EMS).

Características	Puntaje Si/No
<b>Fusión escrotal</b>	3/0
<b>Micropene</b>	0/3
<b>Meato Uretral</b>	
Normal	3
Glandular	2
Peneal	1
Perineal	0
<b>Gónada derecha e izquierda (puntaje individual)</b>	
Escrotal	1,5
Inguinal	1
Abdominal	0,5
Ausente	0

Posteriormente en el año 2005 Rink y colaboradores propusieron otro método de clasificación de los genitales externos en busca de obtención de datos más precisos, sin embargo, esta técnica también presentó dificultades metodológicas. Esta consistió en medir en centímetros tres parámetros, la longitud y el ancho del falo, correspondiéndose a las



medidas “P”, adicionalmente se establecía la distancia entre el cuello de la vejiga y el meato uretral, mediante una endoscopia, a esta medida se le denominó “V” y finalmente la medida “E”, la cual corresponde a la clasificación de la apariencia de los genitales externos según Prader, cada una de estas mediciones se escriben como subíndices de las medidas PVE, por ejemplo, P<sub>2,1</sub>V<sub>7</sub>E<sub>2</sub>, a pesar de que esta clasificación considera de manera más precisa características importantes para la determinación del grado de ambigüedad genital, los autores resaltan ciertas limitantes a considerar como la medición “V” que puede resultar engorrosa, la simple necesidad de una endoscopia para llevarla a cabo y por último el grado de masculinización no siempre es posible ser correlacionado con la localización vaginal (Rink, Adams, & Misseri, 2005).

La etiopatología de las DSD 46,XY puede o no estar relacionada a disfunción endocrina. En la tabla 3, se presentan las causas más frecuentes para la clasificación propuesta de DSD 46,XY.

Las alteraciones no asociadas a fallas endocrinas resultan del desarrollo anormal del primordio urogenital, producto de trastornos en el desarrollo embriológico de los ductos Wolffianos, del seno urogenital o de los genitales externos, por factores cromosómicos, génicos y ambientales. Dentro de las entidades se pueden encontrar las malformaciones cloacales, hipospadias aisladas, afalia, ausencia congénita de los vasos deferentes, entre otras. Los individuos con enfermedades de este tipo usualmente presentan niveles normales de las hormonas sexuales. Como se comentó anteriormente, puede deberse a una disfunción gonadal completa o parcial, conocida como disgenesia gonadal, y en otros casos pueden estar afectados líneas celulares específicos como: células de Sertoli, Leydig o germinales. En

ambos casos, el fenotipo varía dependiendo del grado de disfunción gonadal (Massanyi et al., 2013).

Las causas genéticas de la disgenesia gonadal pueden ser muy amplias, y su etiología puede ser génica o por alteraciones cromosómicas. Cuando se dice que es completa los individuos cromosómicamente varones presentan genitales externos femeninos estructuras müllerianas bien desarrolladas y gónadas constituidas por tejido fibroso. Cuando la disgenesia gonadal es parcial, los pacientes 46,XY se caracterizan por presentar formación parcial de testículos, generalmente presentan una mezcla de ductos wolffianos y müllerianos y una gama fenotípica con respecto a la masculinización de los genitales externos. Se han implicado una gran cantidad de genes, como son: *SRY*, el cual se encuentra mutado en 10-15% de todos los casos, *SOX9*, *SF-1*, *NR5A1*, mutaciones en éste último representan 15% de la totalidad de los pacientes con disgenesia gonadal completa o parcial 46,XY. También se han descrito deleciones del 9p24.3, 10q26.1 y duplicaciones de Xp21.2 y 1p35, las cuales, en la mayoría de los casos son asociadas con formas sindrómicas de disgenesia gonadal (Ahmed et al., 2013).

Las entidades con causas endocrinas, pueden presentarse por una disrupción en la síntesis de los andrógenos o una interferencia de la acción de los andrógenos sobre sus células diana. Se han descrito mutaciones en cada uno de los genes que codifican para cada paso en la vía clásica de la biosíntesis de los andrógenos, en la conversión de T en DHT y en el receptor de andrógenos, la mayoría de las cuales presentan un patrón de herencia autosómica recesiva, aunque algunos pueden ser ligados al X (Massanyi et al., 2013). Como se discutió en apartados anteriores, la mayoría de las enzimas esteroidogénicas pertenecen a dos grandes

familias de proteínas, las citocromo P450 (CYPs) o las hidroxiesteroides deshidrogenasas (HSDs) (Auchus & Miller, 2012).

**Tabla 3.** Principales causas de los DSD 46,XY.

Alteración	Causa
<b>Desarrollo gonadal</b>	Disgenesia gonadal completa o parcial ( <i>SRY, SOX9, SF1, WT1, DHH</i> , etc.) DSD ovotesticular Regresión testicular
<b>Síntesis o acción de los andrógenos</b>	Síntesis de andrógenos (mutaciones en el receptor <i>HL,7DHC, CYP11A1, HSD3B2, CYP17, POR, HSD17B3, SRD5A2</i> ) Acción de los andrógenos ( mutaciones en receptor de testosterona y moduladores ambientales y drogas)
<b>Otras</b>	Asociaciones sindromáticas del desarrollo genital Síndrome de persistencia de los ductos Mülllerianos Hipospadia aisladas Criptorquidismo Hipogonadismo hipogonadotrópico congénito Influencias ambientales

Mutaciones en el gen que codifica para el receptor de la hormona luteinizante y gonadotropina coriónica humana *LHCGR* inhiben la diferenciación fetal de las células de Leydig, causando lo que se conoce como hipoplasia de células de Leydig (LCH, OMIM #238320); el fenotipo de los individuos portadores de mutaciones en este gen pueden exhibir un amplio rango fenotípico, desde genitales externos femeninos, sin desarrollo de mamas y amenorrea primaria, hasta una diferenciación sexual masculina con hipospadia o micropene. Mutaciones en este gen explican 50% de los casos de LCH, lo cual sugiere una contribución de otros factores genéticos al fenotipo (Ahmed et al., 2013).

La deficiencia de StAR (OMIM #600617), es causada por mutaciones en el gen *STAR* y se denomina comúnmente hiperplasia adrenal congénita lipoide, caracterizada por

insuficiencia de glucocorticoides y mineralocorticoides, así como por DSD 46,XY secundario, debido a la disminución o completa inhibición de la síntesis de testosterona (Auchus & Miller, 2012).

Una docena de pacientes no distinguibles fenotípicamente de la hiperplasia adrenal congénita lipoide, se han descrito presentando mutaciones en el gen *CYP11A1*, el cual codifica para el citocromo P450<sub>scc</sub>, sin embargo, en estos pacientes no se ha descrito hipertrofia adrenal (Welzel et al., 2008).

La hiperplasia adrenal congénita es la causa más frecuente de ambigüedad genital e insuficiencia adrenal en recién nacidos, ésta consiste en un grupo de síndromes causados por deficiencias enzimáticas específicas en la corteza adrenal que afectan la vía de biosíntesis del cortisol. Aunque cualquiera de las cinco enzimas involucradas en la biosíntesis de cortisol a partir de colesterol pueden estar afectadas, 90% corresponden a deficiencias de 21- $\beta$ -hidroxilasa, el 10% restante es producto de las deficiencias de las enzimas, 11- $\beta$ -hidroxilasa, 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenas y 17- $\alpha$ -hidroxilasa (Rhéaume et al., 1992). La deficiencia 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogena (OMIM #201810), es una enfermedad autosómica recesiva, producto de mutaciones en el gen *HSD3B2*, en la cual individuos 46,XY pueden presentar signos heterogéneos de feminización de los genitales externos, los cuales pueden variar desde una simple hipospadia hasta genitales ambiguos en combinación con insuficiencia adrenal (Welzel et al., 2008).

Se ha descrito que la enzima P450<sub>c17</sub>, posee tanto actividad 17- $\alpha$ -hidroxilasa como 17,20 liasa, las cuales, como se expuso en apartados anteriores, catalizan reacciones esenciales para la biosíntesis de andrógenos; el gen *CYP17A1* codifica para la enzima

P450c17, mutaciones en este gen producen, por lo tanto, heterogeneidad alélica, es decir, dependiendo de donde ocurra la mutación puede causar la deficiencia 17- $\alpha$ -hidroxilasa o 17,20 liasa (Welzel et al., 2008). La deficiencia de 17- $\alpha$ -hidroxilasa (OMIM # 202110), reduce la producción de cortisol, condición que provoca un incremento de ACTH, lo que a su vez, induce el incremento de los niveles de mineralocorticoides lo que conlleva a hipertensión e hipocalcemia, por otra parte, pacientes 46,XY presentan defectos en el desarrollo de los genitales externos, que dependiendo de la actividad residual pueden presentar vagina ciega y ausencia de estructuras müllerianas (Yanase, Imai, Simpson, & Waterman, 1992). Por otra parte, clínicamente los hombres con deficiencia de 17,20 liasa (OMIM #202110) exhiben un fenotipo femenino o genitales ambiguos; bioquímicamente la deficiencia de esta actividad se caracteriza por bajos niveles de andrógenos y niveles de cortisol normales sin hipertensión (Tiosano et al., 2008).

Una entidad menos frecuente del desarrollo sexual es la deficiencia de 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (OMIM #264300). La incidencia de esta enfermedad se ha estimado en 1 por 147.000 nacidos vivos; la enzima codificada por el gen *HSD17B3*, cataliza la conversión de la androstenediona en testosterona, por lo que pacientes 46,XY generalmente pueden cursar con amplio espectro fenotípico, desde genitales externos completamente femeninos hasta predominantemente masculinos con micropene o hipospadia (Alikashioglu et al., 2015).

La última entidad que se esbozará es la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa (OMIM #607306); esta enzima codificada por el gen *SRD5A2*, cataliza la conversión de la testosterona a dihidrotestosterona. Recién nacidos con cariotipo 46,XY son indistinguibles fenotípicamente de pacientes con insensibilidad parcial a los andrógenos y deficiencia de 17- $\beta$ -

hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3, cursando principalmente con ambigüedad genital, sin embargo, a diferencia de las otras dos entidades, se ha descrito que un porcentaje importante de pacientes viriliza al alcanzar la pubertad (Costa, Domenice, Sircili, Inacio, & Mendonca, 2012).

Hasta el momento se describieron los principales genes, los cuales, al encontrarse mutados interfieren con la síntesis de los andrógenos, sin embargo, como se discutió al inicio de este apartado, las DSD 46,XY también pueden presentarse al interferirse con la acción de los andrógenos en sus tejidos diana, es decir, por la disfunción del receptor de andrógenos, lo cual se conoce como síndrome de insensibilidad a los andrógenos (OMIM #300038). Esta entidad exhibe un patrón de herencia ligado al X. Individuos cromosómicamente masculinos, poseen testículos funcionales que producen niveles de andrógenos apropiados para su edad pero presentan genitales externos poco masculinizados debido al defecto en la acción de los andrógenos. Clínicamente éste síndrome puede ser clasificado en 3 categorías: completo (CAIS), parcial (PAIS) y una forma moderada (MAIS) (Mongan, Tadokoro-Cuccaro, Bunch, & Hughes, 2015).

### **3.5. Deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2**

#### ***3.5.1 Definición:***

La deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 (OMIM #264600) es una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente que resulta de la incapacidad de convertir la testosterona (T) en un andrógeno más potente, la dihidrotestosterona (DHT). Esta deficiencia conduce a la aparición de un amplio rango de fenotipos que pueden variar desde genitales masculinos con una simple hipospadia hasta genitales ambiguos o completamente femeninos, sin

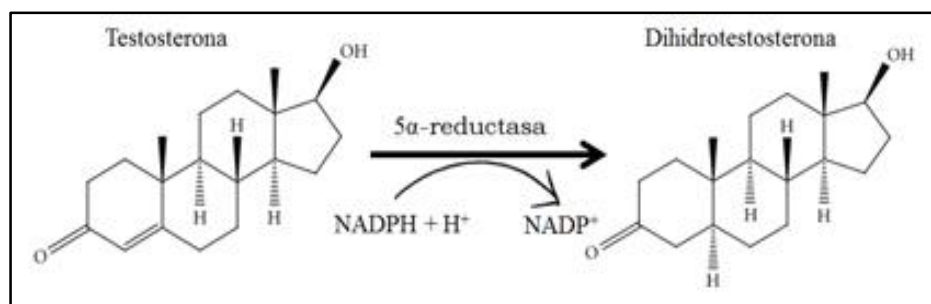
embargo esta deficiencia se caracteriza por presentar en un alto porcentaje de pacientes una fuerte masculinización al alcanzar la pubertad (Deeb, Suwaidi, Ibukunoluwa, & Attia, 2016).

Esta fue reportada por primera vez en 1974 en dos hermanos de Dallas, USA y en una gran familia proveniente de República Dominicana; todos los pacientes descritos presentaron hipospadía perineo escrotal y genitales externos ambiguos con masculinización al alcanzar la pubertad (Imperato-McGinley, Guerrero, Gautier, & Peterson, 1974; Walsh et al., 1974). Para esa fecha se reportaron 13 familias con 24 casos de deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2, denominados en ese momento pseudohermafroditas masculinos, provenientes de una villa de República Dominicana llamada Salinas. Los investigadores reportaron que los hombres afectados con cariotipo 46,XY presentaron al nacimiento genitales externos ambiguos, por lo que eran criados como niñas, adicionalmente, presentaban o no criptorquidia, escroto bífido, un seno urogenital con una vagina vestigial ciega y falo similar a clítoris y ausencia de estructuras müllerianas. Sin embargo, al alcanzar la pubertad, los pacientes presentaban engrosamiento de la voz y desarrollaban características típicas masculinas como incremento de la masa corporal, alargamiento del falo convirtiéndose en un falo funcional, los testículos les descendían y el escroto se tornaba rugoso e hiperpigmentado y no presentaban desarrollo mamario. El fenotipo masculino era tan marcado en estos pacientes que en la villa se les conocía como “guevedoces”, refiriéndose a que a los 12 años de edad los niños presentaban pene (Imperato-McGinley et al., 1974).

### ***3.5.2 Actividad enzimática 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2:***

La 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 es una enzima microsomal que cataliza la conversión de la T en DHT a través de la reducción de un doble enlace, usando NADPH como cofactor. Como

se mencionó previamente, ambas hormonas unen un único receptor, el receptor de andrógenos, y la formación de complejos hormona – receptor se ha involucrado en varias reacciones fisiológicas, actuando como factores de transcripción de la cascada de genes involucrada en la diferenciación sexual (Russell & Wilson, 1994; A. E. Thigpen et al., 1992a). En la figura 4 se esquematiza la reacción enzimática llevada a cabo por la 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2.



**Figura 4.** Reacción enzimática catalizada por la 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2.

La enzima 5- $\alpha$ -reductasa fue descubierta a finales de los años 50 en secciones de hígado (Mathews, Roseman, & Dorfman, 1952), pero no fue hasta los años 70 cuando se le adjudicó un papel importante en el desarrollo sexual mediante estudios embriológicos y en el campo de la genética humana (Okeigwe & Kuohung, 2014). Los estudios del desarrollo mostraron que la actividad 5- $\alpha$ -reductasa en embriones de mamíferos era mayor en el primordio de los genitales externos y próstata previo a su virilización y muy bajos en las estructuras wolffianas, sugiriendo que esta reacción es crucial para la formación de los genitales externos durante la embriogénesis. Por otra parte, los estudios genéticos demostraron que varones presentando alteraciones en la diferenciación sexual poco frecuentes se originaron por mutaciones que disminuían la actividad 5- $\alpha$ -reductasa. Adicionalmente el estudio de estos pacientes reveló la presencia de defectos bioquímicos producto de inestabilidad de la enzima,



afinidad reducida por el sustrato o por el cofactor en una enzima con pH óptimo ácido. Al mismo tiempo se reportó una segunda actividad enzimática con pH óptimo alcalino, tanto en fibroblastos del tejido genital como no genital, la cual se encontraba normal en dichos pacientes. Estos hallazgos condujeron a proponer la existencia de más de una enzima con actividad 5- $\alpha$ -reductasa (Russell & Wilson, 1994).

Los primeros esfuerzos en purificar estas enzimas resultaron infructuosos, debido a que la actividad enzimática era rápidamente perdida al ser sometidas las muestras a métodos cromatográficos. No fue hasta finales de los 80 cuando se desarrolló la técnica de clonación y expresión en oocitos de *Xenopus laevis*, la cual fue usada para aislar un cDNA de hígado de rata que codificaba para una isozima 5- $\alpha$ -reductasa. El cual fue subsecuentemente utilizado para identificar el gen ortólogo en humanos, a través de hibridización cruzada en una biblioteca de cDNA de próstata humana (Andersson, Bishop, & Russell, 1989). Sin embargo, cuando compararon las características fisicoquímicas de la enzima proveniente de la rata con la humana encontraron diferencias importantes, más aún, cuando analizaron el gen de los pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa no encontraron mutación alguna, corroborando así la hipótesis que se había propuesto sobre la existencia de más de una actividad 5- $\alpha$ -reductasa. Finalmente, para aislar la segunda actividad de 5- $\alpha$ -reductasa se empleó una estrategia de clonado y expresión en un cultivo celular humano, en la cual mediante divisiones subsecuentes de una biblioteca de cDNA positiva para la actividad enzimática se logró aislar un clon para 5- $\alpha$ -reductasa diferente al que previamente se había aislado. En ese momento cada una de las isozimas fueron denotadas según el orden de clonación (Andersson, Berman, Jenkins, & Russell, 1991; Jenkins et al., 1991).

El término de isozima fue propuesto por primera vez a finales de la década de los 50 por Markert y Møller para describir diferentes formas moleculares en las cuales varias proteínas pueden presentarse con una misma especificidad enzimática, incrementando la diversidad de respuestas disponibles para los retos metabólicos de la célula. Para la época, múltiples isozimas habían sido identificadas como la lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa (Markert & Moller, 1959). Actualmente se ha descrito que la familia 5- $\alpha$ -reductasa está compuesta por 3 subfamilias y 5 miembros en total. La primera subfamilia está constituida por las antes mencionadas 5- $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2; la subfamilia 2 está constituida por la 5- $\alpha$ -reductasa tipo 3 recientemente descrita y cuyo defecto ha sido relacionado a una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente que cursa con discapacidad intelectual y defectos oftalmológicos y cerebelar, por alteración en la N-glicosilación, reacción en la cual interviene ésta isozima. Por último, la subfamilia 3 está constituida por las proteínas GPSN2 y GPSN2L, cuya función no ha sido completamente elucidada, éstas proteínas intervienen en la elongación de ácidos grasos (Azzouni, Godoy, Li, & Mohler, 2012).

Los sustratos para las 5- $\alpha$ -reductasas son 3-ceto,  $\Delta^{4,5}$  esteroides de 19 carbonos/21 carbonos, el grupo 3-ceto se refiere al doble enlace carbono-oxígeno en el carbón 3 y delta 4,5 se refiere al doble enlace entre los átomos de carbono 4 y 5, como por ejemplo, T, progesterona, androstenediona, epi-T, cortisol, aldosterona y deoxicorticosteroide. La reacción catalizada por estas isozimas involucra estereo especificidad y provocan la hidrólisis irreversible del doble enlace entre C-4 y C-5, con la ayuda del cofactor NADPH y la inserción de un anión de hidrógeno al C-5 y un protón al C-4 (Azzouni et al., 2012).

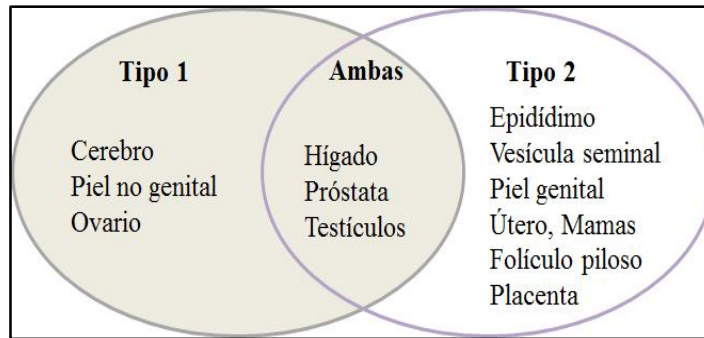
La estructura primaria de las isozimas fue determinada a partir de sus respectivos cDNA. Tanto 5- $\alpha$ -reductasas tipo 1 y tipo 2 son proteínas con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos distribuidos a través de su secuencia, lo cual sugiere que son proteínas fuertemente embebidas en la membrana. Están compuestas por 254 y 259 aminoácidos y un peso molecular de 29,5 y 28,4 KDa, respectivamente. Si bien estas dos isozimas catalizan la misma reacción, el grado de homología con respecto a la secuencia de aminoácidos es muy limitado, son codificadas por genes que se localizan en cromosomas diferentes y poseen características bioquímicas distintivas. El porcentaje de identidad entre ambas es de aproximadamente 47%, mientras que la identidad entre la misma isozima presente en diferentes especies es de 60% para 5- $\alpha$ -reductasas tipo 1 y 77% para 5- $\alpha$ -reductasas tipo 2. Por otra parte, los otros miembros de la familia 5- $\alpha$ -reductasa, en menor grado caracterizados, poseen menor grado de homología con respecto a las dos primeras, 5- $\alpha$ -reductasa tipo 3 está compuesta por 318 aminoácidos y presenta 19% de homología con la tipo 1 y 20% de homología con la tipo 2. Por otra parte, GPSN2 y GPSN2L están compuestas por 308 y 363 aminoácidos respectivamente y presentan un porcentaje de homología entre ellas de 44%, mientras que 15% y 6% con 5- $\alpha$ -reductasa tipo 1, 17% y 11% con 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 y 11% y 6% con 5- $\alpha$ -reductasa tipo 3, respectivamente (Azzouni et al., 2012; Russell & Wilson, 1994).

Cuando se examinaron lisados de células transfectadas se determinó que el pH óptimo para la isozima tipo 1 variaba en un rango alcalino entre 6 y 8,5, mientras que la isozima tipo 2 exhibía un rango de pH más restringido alrededor de pH 5,0, sin embargo, hay evidencias que apuntan a un pH óptimo neutro entre 6,0 y 7,0 en el interior de las células humanas (Russell & Wilson, 1994). De igual manera, las dos isozimas presentan constantes de afinidad

por su sustrato diferentes, la tipo 1 presenta una  $K_m$  de 1-5  $\mu\text{M}$  y la tipo 2 presenta una  $K_m$  de 0,004-1  $\mu\text{M}$ . La constante de disociación aparente por el cofactor es similar para ambas isozimas y se han reportado valores entre 3-10  $\mu\text{M}$ . Para los otros componentes de la familia no se han reportado datos bioquímicos (Andersson & Russell, 1990; Azzouni et al., 2012; Makridakis, di Salle, & Reichardt, 2000; Russell & Wilson, 1994).

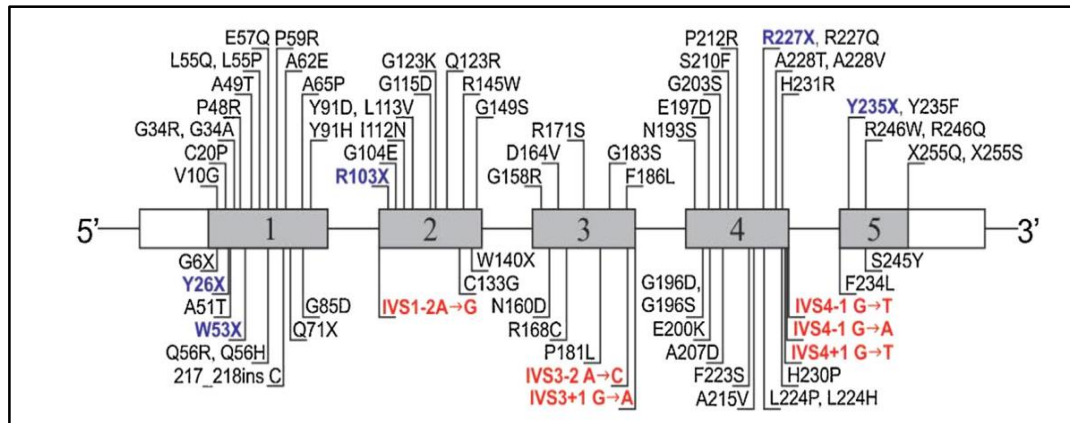
### ***3.5.3 Bases moleculares de la 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2:***

Las isozimas 5- $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2 son codificada por los genes *SRD5A1* y *SRD5A2* respectivamente, dichos genes presentan estructuras similares, constituidos por 5 exones separados por 4 intrones, sin embargo, *SRD5A1* es localizado en la posición 5p15, mientras que *SRD5A2* mapea en 2p23. Los genes son expresados diferencialmente en los tejidos. En la Figura 6 se exponen los tejidos que expresan cada tipo (Okeigwe & Kuohung, 2014). La enzima 5- $\alpha$ -reductasa tipo 1 es expresada en el cuero cabelludo fetal y en la piel no asociada a estructuras genitales. La expresión de esta isoenzima es de 5 a 50 veces mayor en adultos que en fetos, sugiriendo que no está involucrada en el desarrollo de los genitales masculinos en etapas fetales. Por otra parte, la enzima 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 es altamente expresada en la próstata fetal y tejido gonadal. En efecto, la masculinización de los pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 al alcanzar la pubertad, se debe a la acción de la enzima 5- $\alpha$ -reductasa tipo 1 (Loch & Bilharinho, 2020).



**Figura 5.** Localización en los diferentes tejidos de la actividad 5- $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2. Tomado de Okeigwe y Kuohung 2014

Pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 presentan mutaciones en el gen *SRD5A2*. Thigpen y colaboradores en 1992 fueron los primeros en identificar 19 mutaciones en este gen entre un grupo heterogéneo de individuos con características clínicas correspondientes a la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2. Las mutaciones incluyeron 16 sustituciones de aminoácidos, un cambio en secuencias conservadas de splicing, una mutación con cambio de sentido y una pequeña delección (Thigpen et al., 1992b). Recientemente más de 100 mutaciones han sido descritas en el gen *SRD5A2*. La mayoría de las mutaciones continúan siendo de cambio de sentido (n=81), sin embargo mutaciones como las que afectan los sitios conservados en el corte y empalme (n=10), pequeñas delecciones (n=14), mutaciones con cambio de sentido (n=4), pequeñas inserciones (n=6), pequeños indels (n=3) y grandes delecciones (n=4) también han sido descritas (Human Gene Mutation Database del Instituto de Genética Médica en Cardiff, Gales, UK: *SRD5A2*: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>). En la figura 6 se presenta un esquema de las principales mutaciones descritas en el gen.



**Figura 6.** Esquema general del gen *SRD5A2* y las principales mutaciones reportadas en la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2. Negro: mutaciones con cambio de sentido. Rojas: mutaciones en secuencias conservadas de splicing. Azul: Mutaciones con cambio de sentido. Tomado de Mendoca y col. 2016

Todas las mutaciones previamente reportadas generan proteínas con diferentes grados de actividad enzimática, variando desde una isoforma inestable hasta una completa pérdida de actividad enzimática. Las mutaciones se han localizado predominantemente en los exones 1 y 4. Adicionalmente, de los 254 aminoácidos codificados por el gen, en 67 diferentes codones se han identificados mutaciones y múltiples mutaciones han sido reportadas en un mismo codón que codifican diversos aminoácidos, por ejemplo, en el codón 56 que codifica para una glutamina en algunos casos es mutado a histidina y en otro en arginina (Mendonca et al., 2016).

Hasta el presente se han propuesto mutaciones con efecto fundador putativo como p.Q6X y p.R227Q en Asia, p.R171S en el Mediterráneo y p.Q126R en Brasil y Portugal. Sin embargo, no se han realizado exhaustivos análisis de haplotipos de estas mutaciones y no se ha confirmado la presencia de un ancestro común, pero su prevalencia está asociada a países geográfica o culturalmente relacionados, sugiriendo un efecto fundador. De acuerdo a este razonamiento, los autores del estudio propusieron que la presencia de la misma mutación en

pacientes de diferentes grupos étnicos o países, sugiere la existencia de puntos calientes dentro del gen (Mendonca et al., 2016).

La deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 es heredada con un patrón de herencia autosómico recesivo. Maimoun y colaboradores en 2011 estudiaron una gran cohorte de pacientes y demostraron que 69,1% de los pacientes eran homocigotos, 25,5% de los pacientes resultaron heterocigotos compuestos y 5,4% de los pacientes eran heterocigotos compuestos con el polimorfismo p.V89L (Maimoun, Philibert, Cammas, et al., 2011).

El polimorfismo más estudiado en el gen *SRD5A2* es p.V89L, producido por el cambio de una guanina por una citosina en el exón 1, el cual resulta en una sustitución de una valina por una leucina en la posición 89 de la proteína. Estudios *in vitro* demostraron que éste polimorfismo disminuye la actividad enzimática hasta aproximadamente 30 % (Makridakis et al., 2000). Adicionalmente, se han realizado diversos estudios en poblaciones de China e India y se demostró que este polimorfismo en ambas poblaciones presentó una asociación estadísticamente significativa a un incremento del riesgo de presentar hipospadia en individuos que poseen la leucina en la posición 89 (Thai et al., 2005; Y. Wang et al., 2004). Otro polimorfismo, aunque menos estudiado es p.A49T, este ha sido asociado a un riesgo incrementado a cáncer de próstata, principalmente en afroamericanos y latinoamericanos mediante estudios *in vitro* que demostraron un incremento en la actividad enzimática (Makridakis et al., 2000). Por otra parte, otros estudios demostraron una asociación modesta de este polimorfismo con formas menos severas de hipospadia (Silver & Russell, 1999; Thai et al., 2005).

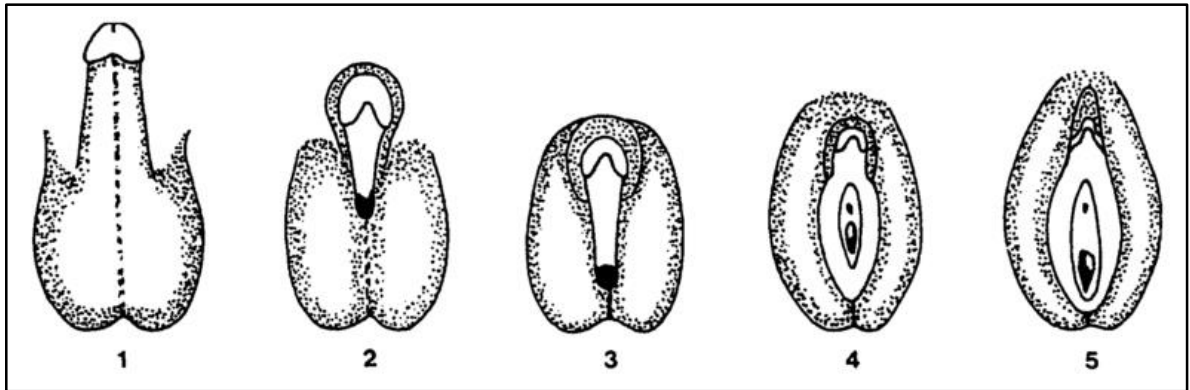
### ***3.5.4 Relación Genotipo-Fenotipo:***

Maimoun y colaboradores en 2011b realizaron un estudio extenso en pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa y describieron una variabilidad fenotípica muy amplia entre los 55 pacientes que estudiaron y propusieron que una relación genotipo-fenotipo directa no podía ser identificada. Ellos analizaron pacientes con la mutación p.G34R o p.L55Q y el rango de fenotipos varió desde un fenotipo femenino a genitales externos parcialmente virilizados, presentando microfalo e hipospadia, incluso ellos reportaron dos hermanos con el mismo genotipo heterocigoto compuesto (p.Q136R/p.G203S) en los que el sexo de crianza era diferente, uno de los hermanos presentó un clítoris normal y fue criado como hembra y el segundo hermano presentó microfalo e hipospadia y fue criado como varón.

### ***3.5.5 Clasificación Fenotípica de Pacientes:***

Adicional a las clasificaciones previamente expuestas que han sido diseñadas para tratar de estandarizar la descripción de los pacientes con DSD, en 1996 Sinnecker y colaboradores presentaron una clasificación con base en la severidad del defecto en la masculinización de los genitales externos presentado por sus pacientes y los reportados en la literatura (Fig.7). Los investigadores estudiaron 9 pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2, y clasificaron el fenotipo en 5 tipos los cuales describiremos a continuación: tipo 5, cuyos genitales pueden ser descritos como femeninos; tipo 4, son predominantemente femeninos; tipo 3, representan genitales ambiguos; tipo 2, predominantemente masculino con micropene e hipospadia y tipo 1, completamente masculino sin ningún signo de subvirilización. En la tabla 4 se detallan las características fenotípicas de cada uno de los tipos y subtipos propuestos por estos investigadores (Sinnecker et al., 1996).





**Figura 7.** Clasificación de los fenotipos en pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2. Tomado de Sinnecker et al 1996.

### ***3.5.6 Diagnósticos Diferenciales:***

La síntesis de los andrógenos a partir de colesterol involucra cinco reacciones enzimáticas, por lo que mutaciones en cada uno de los genes codificantes para estas enzimas conducen a una masculinización incompleta de los genitales masculinos (Zhu, Katz, & Imperato-McGinley, 1998).

El fenotipo de los pacientes recién nacidos con masculinización incompleta es prácticamente indistinguible entre entidades como la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa, el síndrome de insensibilidad a los andrógenos parcial (PAIS) y la deficiencia de la enzima 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (Cheon et al., 2011).

El síndrome de insensibilidad a los andrógenos (AIS, de sus siglas en inglés) es una alteración genética ligada al X y es uno de las más comunes causas de DSD en individuos 46,XY. El fenotipo varía desde genitales externos femeninos en la forma completa (CAIS) a genitales externos masculinos normales asociado a infertilidad y ginecomastia en la forma más suave (MAIS). Un gran espectro de fenotipos masculinos sub-virilizados han sido reportados en la forma parcial (PAIS). En la mayoría de los pacientes con fenotipos CAIS se

han encontrado mutaciones en el gen que codifica para el receptor de andrógenos (AR), sin embargo, mutaciones en este gen son menos frecuentes para los fenotipos parciales (Gottlieb et al., 2012).

**Tabla 4.** Clasificación fenotípica de pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 propuesta por Sinnecker y colaboradores.

<b>Tipo</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Subtipos</b>	<b>Características</b>
<b>1</b>	Masculinos	1a	Ninguna señal de
		1b	subvirilización Espermatogénesis disminuida
<b>2</b>	Predominantemente masculino	2a	Hipospadia aislada
		2b	Micropene, hipospadia severa y escroto bífido
<b>3</b>	Ambiguos	3a	Microfalo similar a clítoris, labios mayores similares a escroto bífido, hipospadia perineoescrotal
		3b	Como 3a más senos urogenitales con vagina ciega y corta
<b>4</b>	Predominantemente femenino	4a	Clitoromegalia y fusión de labios, senos urogenitales con vagina ciega corta y apertura amplia
		4b	Ligeros signos de efectos androgénicos: ligera clitoromegalia o fusión parcial de labios, apertura uretral y vaginal distinta
<b>5</b>	Femenino	5	Sin señales de virilización prepuberal o después de gonadectomía

La prevalencia de CAIS en pacientes 46,XY se ha estimado entre 1 en 20.400 y 1 en 99.100 y puede ser diagnosticado en tres diferentes escenarios: durante la vida fetal cuando el sexo fenotípico no concuerda con el sexo cromosómico; en la niñez cuando niñas presentan

hernias inguinales o en la pubertad en niñas con amenorrea primaria. Pacientes con AIS desarrollan mamas pero los ciclos menstruales no aparecen a pesar de la producción de HAM, en estos pacientes es común visualizar una vagina acortada ciega que puede medir entre 2,5 y 8 cm en CAIS y 1,5 y 4 como en PAIS. Adicionalmente se ha descrito poco o ausente vello púbico y axilar (Hughes et al., 2012).

El diagnóstico diferencial entre PAIS y la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa, debe ser establecido tempranamente debido a que los individuos con síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos son criados como mujeres y aquellos con la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa como varones. Pacientes prepuberales con PAIS usualmente tienen concentraciones normales de T y LH, en la pubertad los niveles de T y LH son anormalmente altos aunque la relación T:DHT permanece normal (Cheon et al, 2011).

El otro diagnóstico diferencial es la deficiencia de 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3, el cual consiste en un defecto en la última fase de la esteroidogénesis, en el cual la androstenediona es convertida en testosterona y la estrona en estradiol. Los recién nacidos con esta alteración presentan genitales externos predominantemente femeninos o completamente femeninos con una vagina ciega y los testículos se encuentran frecuentemente en el canal inguinal o en un escroto bífido. Las estructuras derivadas de los ductos wolffianos como epidídimo, vasos deferentes, vesícula seminal y ductos eyaculadores están presentes, sugiriendo que bajos niveles de testosterona son suficientes para el desarrollo de los genitales internos. Los pacientes con esta deficiencia representan aproximadamente el 4% del total de afectados con cualquier DSD 46,XY reportados en la base de datos europea de DSD. La deficiencia de 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 es causada por

mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *HSD17B3* (Mendoca et al, 2017).

### ***3.5.7 Métodos Diagnósticos:***

La etiología genética es importante para el manejo de pacientes con ambigüedad genital; en los últimos años gracias al desarrollo de nuevas tecnologías el estudio de los pacientes con DSD ha permitido la identificación de nuevos genes involucrados en el desarrollo sexual. La primera aproximación para el estudio de un recién nacido con ambigüedad genital es la determinación del sexo cromosómico mediante la realización de un cariotipo. La evaluación clínica y bioquímica es el segundo paso a seguir en el diagnóstico de este grupo de alteraciones. En la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa una alta relación testosterona: dihidrotestosterona ha sido empleada para identificar pacientes con la deficiencia (Ahmed, Iqbal & Hughes, 2000). Sin embargo, en diferentes oportunidades se ha demostrado que el límite de esta proporción no es lo suficientemente sensible, diversos pacientes con mutaciones demostradas en el gen *SRD5A2* presentan valores normales de T:DHT (Maimoun et al., 2011; Ahmed, Iqbal & Hughes, 2000). Consecutivamente, la identificación de la mutación responsable del DSD es importante, la secuenciación directa de un grupo de genes asociados a estas alteraciones ha sido el método más empleado en los laboratorios diagnósticos. Sin embargo, una gran cantidad de casos permanecen sin causa genética conocida, en éstos se han comenzado a emplear técnicas como hibridización genómica comparativa mediante el uso de microarreglos, que permite detectar variantes de números de copia, microdeleciones y microduplicaciones, especialmente cuando la condición está asociada a otras malformaciones. Más recientemente, se ha comenzado a emplear la secuenciación masiva del genoma humano y de exomas (Ahmed et al., 2013).

### 3.6. Epidemiología:

Los datos sobre la incidencia y prevalencia de las alteraciones de diferenciación sexual son muy limitados. Sin embargo, como conjunto se ha estimado que la incidencia puede ser 1:5 y 1:500. La hiperplasia suprarrenal congénita es la causa más común de ambigüedad genital en el neonato y puede representar aproximadamente la mitad de todos los casos de ambigüedad genital en recién nacidos. La incidencia a nivel mundial se estima en 1:15.000, pero varía considerablemente entre comunidades. En Europa, los defectos en 21-hidroxilasa se estiman que afecta entre 3:100.000 y 11:100.000 nacidos por año. La disgenesia gonadal mixta puede ser la segunda causa de alteraciones de diferenciación sexual con una incidencia de 1:10.000. El síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos tiene una incidencia estimada entre 1:60.000 y 1:99.000 y el parcial es más frecuente. Y por último, la deficiencia 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 son mucho menos frecuentes, presentando incidencias menores a 1:150.000 (Thyen et al., 2006).

En Venezuela, la incidencia de las diferentes alteraciones del desarrollo sexual es desconocida, no obstante, se han reportado diferentes estudios en los que se evaluaron pacientes que presentaron ambigüedad genital, sugiriendo la presencia de estas enfermedades en diferentes estados del país. El primer reporte de pacientes con ambigüedad genital se realizó en el estado Zulia, en la Unidad de Genética Médica de La Universidad del Zulia, donde se evaluaron pacientes que acudieron a su consulta entre 1971 y 1996; los pacientes con alteraciones en el desarrollo sexual representaron el 5,4% del total de pacientes que consultaron la Unidad de Genética entre la fecha estudiada. En este estudio se detectaron 139 pacientes con anomalías en los cromosomas sexuales, 36 pacientes con hiperplasia adrenal congénita, 21 pacientes con síndrome de insensibilidad androgénica completa, 14 pacientes con disgenesia gonadal mixta y 4 pacientes con DSD ovotesticular (Álvarez-Nava et al.,

1998). Un segundo trabajo fue publicado en el 2005, realizado en el Hospital José Manuel de los Ríos (Caracas), entre los años 2000 a 2004, se incluyeron 73 pacientes con diagnóstico de ambigüedad genital, de los cuales 4 resultaron ser DSD ovotesticular, 6 con causas no determinadas, 4 con DSD 46,XY y 59 pacientes con Hiperplasia Suprarrenal (Sánchez de La Cruz et al., 2005)

Álvarez y colaboradores (2011) describieron un paciente proveniente del estado Zulia con ambigüedad genital con diagnóstico de disgenesia gonadal parcial.

El trabajo más reciente publicado en el país, incluyó 17 pacientes con alteraciones de diferenciación sexual, atendidos en la consulta de Asesoramiento Genético de la Unidad Proyecto Aragua, durante el período 2004-2010. En este estudio se determinó que 12 casos correspondían a DSD 46,XX, 4 pacientes con DSD 46,XY y 1 caso por alteraciones cromosómicas, todos los pacientes provenían de la región centro-occidental del país y determinaron que sólo el 17,6% de los casos eran producto de uniones consanguíneas (Pulido et al., 2015).

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no se han reportado casos de deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 en el país. Es necesario resaltar que en los estudios mencionados anteriormente, no usaron técnicas apropiadas para la detección de esta alteración, por lo que es posible que dentro de las alteraciones de diferenciación 46,XY (DSD 46,XY) mencionadas, algunos pacientes podrían portar mutaciones en el gen *SRD5A2*.

### **3.7. Efectos de la Consanguinidad en las poblaciones humanas:**

En poblaciones aisladas la consanguinidad juega un papel fundamental en la aparición de enfermedades con patrones de herencia autosómicos recesivos. La consanguinidad puede ser definida como la unión de un hombre y una mujer que comparten uno o más ancestros; para propósitos prácticos la consanguinidad es considerada existente, cuando ocurrió en tres

o cuatro generaciones predecesoras (Vogel and Motulsky, 2010). Cuando una persona se casa con su pariente, hay probabilidad de que compartan genes idénticos por ascendencia, por lo tanto, la probabilidad de que la descendencia sea homocigota será mayor que en parejas no consanguíneas y la probabilidad de que sean heterocigotas es correspondientemente menor. En el caso de que el antepasado en común haya sido portador único de algún gen recesivo desfavorable, es posible que los hijos de las parejas consanguíneas sean portadores de un juego doble del mismo gen aumentando así la probabilidad de que padezcan alguna enfermedad recesiva (Rothhammer 1977).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

#### 4. HIPÓTESIS

1. Si el gen candidato (*SRD5A2*) que codifica la enzima 5 $\alpha$  reductasa tipo 2 es el responsable de la ambigüedad genital en los pacientes estudiados, entonces el estudio de las regiones codificantes o reguladoras permitirá la identificación de la mutación.

2. Si se establece una relación significativa entre genotipo – fenotipo en los pacientes en estudio, entonces, cada afectado debe presentar un fenotipo concordante para la misma mutación.

3. Si la localidad en estudio es una población pequeña y aislada, el número de personas fundadoras debió ser reducido, entonces, cabe esperar que la frecuencia de portadores en la población sana sea elevada.

4. Si la presencia de la mutación es producto de un efecto fundador en la población, entonces, al estudiar la estructura de la población el genotipo de los pacientes debe estar agrupado con el de la población parental donde se originó la mutación.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el gen de la 5- $\alpha$ -reductasa en tres pacientes con ambigüedad genital y en sus familiares, así como en una muestra de la población sana, todos originarios de Pueblo Nuevo del Sur, para establecer la etiología precisa que permita el asesoramiento genético apropiado tanto a los pacientes como a la comunidad.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

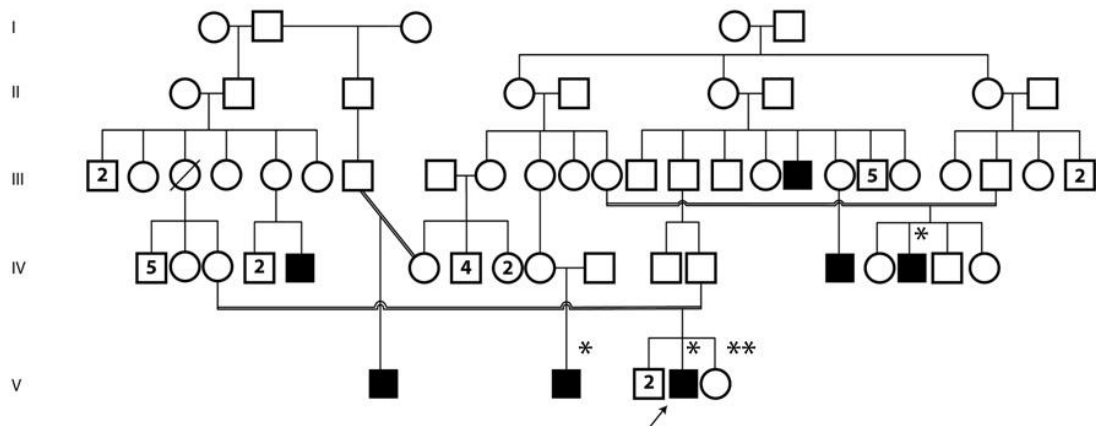
- Realizar un análisis de segregación del gen candidato *SRD5A2* con la enfermedad, empleando marcadores localizados en la banda 3 región 2 del brazo corto del cromosoma 2 (2p23) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen.
- Identificar la mutación asociada a la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 en familias emparentadas de la localidad de Pueblo Nuevo del Sur, que presenta varias familias con individuos afectados.
  - Calcular el coeficiente de consanguinidad en los pacientes.
  - Estimar el coeficiente de consanguinidad en la población.
  - Estimar la frecuencia de portadores sanos en la población.
  - Identificar posibles polimorfismos que alteren la relación genotipo fenotipo
  - Identificar el origen ancestral de la mutación en esa población.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes:

En el estudio se incluyeron tres familias biológicamente emparentadas, cada familia con un caso índice con ambigüedad genital (IV-24, V-2 y V-5). En la Figura 8 se muestra la genealogía de los casos, quienes fueron referidos a la Unidad de Genética Médica (IAHULA), donde fueron clínicamente evaluados y diagnosticados con genitales externos ambiguos. El sexo cromosómico de los pacientes fue confirmado por cariotipo convencional (bandas G), todos ellos resultaron presentar sexo cromosómico masculino, es decir, 46,XY.

Los pacientes incluidos en el estudio provienen de una aldea perteneciente a la parroquia Pueblo Nuevo del Sur del municipio Sucre, del Estado Mérida, al oeste de Venezuela. Geográficamente se localiza entre los 9°16' y 9°38' latitud norte y 71°21' y 71°30' longitud oeste. Esta población está situada a 49 kilómetros al sur de la ciudad de Mérida, en la cordillera sur occidental de Mérida a una altitud de 1516 metros sobre el nivel del mar, goza de un clima seco con un promedio anual de 20° C. de temperatura. En la actualidad la parroquia de Pueblo Nuevo del Sur posee una población de 4392 habitantes.



**Figura 8.** Genealogía de las familias con individuos que presentaron ambigüedad genital estudiadas en la Unidad de Genética. \* Indica a los pacientes incluidos en nuestro estudio. \*\* indica al único pariente en primer grado portador de la mutación.

### **Cálculo de consanguinidad de los pacientes:**

Los individuos pueden tener diversos grados de consanguinidad, debido a que las relaciones biológicas entre los progenitores pueden variar. El coeficiente de consanguinidad representa una forma de valorar estas variaciones. Sewall Wright (1922) a quien se le debe el concepto, definió el coeficiente de endogamia como la proporción de loci en un individuo que son homocigotos para genes idénticos por ascendencia y dedujo la siguiente fórmula:

$$F = \sum [(1/2)^{ns+nd+1} (1+F_A)]$$

Donde  $F_A$  es el coeficiente de consanguinidad de cualquier antepasado común que enlaza las líneas ancestrales materna y paterna,  $ns$  y  $nd$  es el número de generaciones desde el padre y la madre a este antepasado común (Cavalli-Sforza and Bodmer 1971)

Por lo general se define un coeficiente de consanguinidad promedio de los individuos que constituyen una población. Este coeficiente se designa como  $\alpha$  y se define como:

$$\alpha = \sum p_i F_i$$

donde  $p_i$  es la frecuencia relativa de los individuos consanguíneos que tiene un determinado coeficiente de consanguinidad  $F_i$  (Cavalli-Sforza and Bodmer 1971).

Mediante el uso de las fórmulas descritas anteriormente y la genealogía elaborada mediante el interrogatorio directo de los progenitores de los pacientes se calculó en coeficiente de consanguinidad entre ellos.

## **Consentimiento informado de los pacientes:**

Los padres y familiares cercanos de un niño que nace con ambigüedad genital enfrentan grandes problemas psicológicos y sociales; el someterlos a firmar un consentimiento informado resulta engorroso puesto que deja expuesta esta condición ante la sociedad. Por estas razones, los pacientes fueron informados del estudio de manera verbal y luego de haberles explicado con detalle el propósito de la investigación y la importancia de la misma, ellos aceptaron aportar las muestras necesarias para que se llevaran a cabo los análisis necesarios y así determinar las causas de la afección. Este estudio fue realizado bajo la aprobación del Comité de Bioética del IAHULA con número de aprobación COB104 en el año 2014.

### **6.1. Identificación de la mutación en pacientes con ambigüedad genital**

#### **6.1.1 Toma de muestra de sangre:**

Se extrajeron 5 mL de sangre periférica por punción venosa y se recolectaron en un tubo con 100 µL de EDTA al 15% de cada paciente, hermanos y progenitores.

#### **6.1.2 Extracción de ADN:**

Se empleó el método modificado de extracción salina a partir de sangre periférica propuesto por Lahiri y Numberger en 1991. Para llevar a cabo la extracción del ADN se extrajo la capa de leucocitos de la muestra de sangre periférica mediante ciclos de lavados con solución salina, centrifugando a 1800 rpm por 10 min. Los leucocitos se trasvasaron a un tubo con 5mL de TKM1 (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA). Luego se le agregó 150 µL del detergente no iónico nonidet al 15%, se agitó fuertemente con vortex y se centrifugó a 2200 rpm por 15 min. Se decantó el sobrenadante y se realizaron lavados con TKM1 centrifugando a 2200 rpm por 10 min. Posteriormente se le agregó 800 µL del tampón TKM2 (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 0,4 M NaCl) y se resuspendió el taco obtenido en el paso anterior. Se agregó 55 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, se agitó fuertemente con vórtex y se incubó a 65 °C por 15 min., se dejó enfriar y se adicionó 300 µL de NaCl 5,3 M, se homogenizó y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Para obtener la malla de ADN el sobrenadante

obtenido se agregó a 2 mL de Etanol absoluto frío. La malla fue trasvasada a un tubo con 1mL de etanol al 75%.

### **6.1.3 Amplificación de los exones del gen *SRD5A2*:**

De todas las técnicas de biología molecular avanzada, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las más usadas. La PCR provee la capacidad de amplificar una secuencia de ADN específica a partir de una cantidad muy pequeña de ADN y de esa forma facilita su análisis (Clark et al., 2019).

Para amplificar los 5 exones del gen *SRD5A2* se diseñaron los cebadores empleando el programa OligoExplorer (Gene Link Inc., Hawthorne, NY, USA) versión 1.2. Cada par de cebadores fue seleccionado alrededor de 50 pb aguas arriba y aguas debajo de cada exón, de ésta forma se incluyeron las secuencias conservadas involucradas en el corte y empalme de los exones. La secuencia completa del gen fue obtenida del GenBank con el número de acceso NG\_008365.1, las secuencias de los cebadores y su  $T_m$  se muestran en la Tabla 5.

Se empleó un protocolo estándar de amplificación, con un volumen final de 15  $\mu$ L. Se prepararon mezclas de reacción que contuvieron: amortiguador para taq1x,  $MgCl_2$  3,2 mM, dNTPs 0,2mM, taq polimerasa 0,5 U, cebadores específicos para cada exón 5 picomoles/ $\mu$ L y ADN entre 100-300 nanogramos y se completó el volumen final con agua estéril. A continuación, se describe el programa de amplificación general empleado en cada reacción:

Programa de amplificación:

I: 94°C x 6´,

II: 94°C x 30”,

III:  $T_m$  específico de cada cebador x 30”,

IV: 72°C x 30” (los pasos II, III y IV se repitieron 30 veces)

V: 72°C x 7´

VI: 23°C x 5´.

Una vez concluida la amplificación, el éxito de la misma se corroboró mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

#### **6.1.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida:**

La electroforesis en gel de poliacrilamida es un método que emplea matrices eléctricamente neutras para separar fragmentos de ADN de acuerdo a su tamaño. Esta técnica en particular tiene la ventaja de presentar un alto poder de resolución, en efecto, puede diferenciar en longitud una secuencia de otra por 1 pb en 1000 pb. Como regla general, el ADN doble cadena migra a través del gel a una tasa que es inversamente proporcional al  $\log_{10}$  de su tamaño. No obstante, la movilidad electroforética también es afectada por la composición de sus bases y secuencia, en consecuencia, un dúplex exactamente del mismo tamaño puede diferir en movilidad por encima de un 10% (Sambrook & Rusell, 2001).

Los geles fueron preparados con una solución 29:1 de Acrilamida:Bis-Acrilamida (Sigma ) al 6% en solución tampón TAE 1X (Tris-Acetato 4 mmolar, EDTA1 mmolar pH 7,4), y se agregaron 250  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% y 15  $\mu$ L de TEMED al 99%. Las dimensiones de estos geles eran de 16 cm de alto, 14 cm de ancho y 0,8 mm de grosor. Una vez polimerizado el gel se procedió a preparar las muestras, para esto se mezclaron 2  $\mu$ L de buffer de carga y 2  $\mu$ L del producto de amplificación. Las muestras se corrieron en la solución tampón TAE 1Xa 200 voltios y 20 mAmp por 1 hora y 30 minutos dependiendo del tamaño del fragmento. Seguidamente, los geles fueron revelados con tinción de nitrato de plata.

#### **6.1.5 Tinción con nitrato de plata:**

La tinción con nitrato de plata fue desarrollada originalmente para detectar proteínas y luego fue optimizado para visualizar otras moléculas biológicas como ADN. Este método presenta varias ventajas sobre otros métodos disponibles, como son: el revelado y visualización puede hacerse bajo condiciones de luz ambiental normal por lo que no es necesario la disposición de cuartos oscuros o iluminación con UV. Además, la imagen es resuelta con gran detalle y sensibilidad debido a que la plata es depositada directamente sobre las moléculas dentro del gel transparente. La sensibilidad de esta técnica ofrece similar sensibilidad a la autoradiografía, pero evita el manejo de material radiactivo, y, por último, los geles pueden ser secados en plásticos semi-rígidos, registrando indefinidamente los resultados originales (Bassam & Gresshoff, 2007).

Una vez terminada la corrida el gel era retirado del vidrio. La amplificación fue confirmada comparando los fragmentos obtenidos con una escalera de peso molecular cuyos tamaños variaban entre 76 pb y 622 pb. El revelado se realizó según el protocolo modificado de Brandt y colaboradores en 1992. Una vez retirado el gel se sumergió en 50 mL de solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 0,5%), por 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se lavó dos veces con agua desionizada. Seguidamente el gel era sumergido en 50 mL de una solución de nitrato de plata al 0,15% con agitación por 25 minutos. Concluido el tiempo los geles eran lavados dos veces con agua desionizada. Por último, el gel se sumergía en una solución reveladora que estaba constituida por formaldehído (37%) al 0,4% en hidróxido de sodio al 1,5% (esta solución era preparada al momento de uso) por 10 minutos en agitación. Al finalizar el tiempo de incubación las bandas eran visibles a simple vista y los geles se lavaron con agua corriente.

**Tabla 5.** Secuencias de los cebadores de cada uno de los exones del gen *SRD5A2* junto con sus Tm (°C) y longitud del fragmento amplificado correspondientes.

Exon	Secuencia del cebador (5' → 3')	Tm(°C)	Longitud del amplificado (pb)
1	+: CCGCGCTCTCTTCTGGGA -: CCTCCTTGGCGTTCGTCTG	57	430
2	+: AAGAAAGAGGTGGGGATGAG -: TTGTGGGAAGGGTTGTTAGC	51	292
3	+: AAGACCAGGACTCATTGC -: CAGGGAAGAGTGAGAGTC	45	305
4	+: TGATTGACCTCCGATTCTT -: TTCGGTTTCTCAATCTTTCCT	51	272
5	+: GCCCAAATAACTGTAGGT -: AGTTTTCATCAGCATTGTGG	51	227

+: Sentido -: Antisentido

#### 6.1.6 Análisis por polimorfismos de conformación de hebra única (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP):

El análisis de polimorfismos por conformación de hebra única (SSCP), por sus siglas en inglés), es un método capaz de identificar variaciones en las secuencias en ADN de cadena única, típicamente entre 150 a 200 pb. Bajo condiciones de desnaturalización el ADN de cadena sencilla adopta una conformación única y dependiente de la composición de nucleótidos de la misma cadena. Esta conformación es diferente incluso si cambia un solo nucleótido, lo cual se traduce en una movilidad diferencial cuando son separados los fragmentos en geles de poliacrilamida (Humphries

et al., 1997). El SSCP fue utilizado para identificar algún cambio en la secuencia de los 5 exones del gen *SRD5A2*. Para realizar este estudio se amplificaron cada uno de los exones del gen en pacientes, padres, hermanos y tres individuos controles (sanos, no pertenecientes al foco geográfico), como se describió previamente. Del amplificado se tomaron 2  $\mu$ L del producto y se mezclaron con 9 $\mu$ L de buffer de carga (azul de bromofenol al 0,1% en formamida 98% con EDTA 1mM), las muestras se desnaturalizaron por 5 minutos a 94 °C y se mantuvieron en hielo hasta el momento de cargar el gel. Las muestras fueron analizadas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida 29:1 Acrilamida: Bis-Acrilamida al 12% en solución tampón TAE 1X con 285 $\mu$ L de persulfato de amonio al 10% y 15 $\mu$ L de TEMED al 99%. Estas corridas fueron llevadas a cabo en geles de 30 cm de altura, 14 cm de ancho y 0,8 mm de grosor y las condiciones iniciales de corrida fueron 120 voltios y 20 mAmp por 18 horas. Los geles fueron revelados mediante tinción de plata como se describió previamente. De esta manera se identificó cuál exón presentaba migración diferente con respecto a los individuos controles.

#### **6.1.7 Secuenciación de amplificados con migración diferencial en SSCP:**

El exón que presentó migración diferencial con respecto a los controles fue nuevamente amplificado para su secuenciación según los requerimientos de la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Para esto se prepararon 30  $\mu$ L de producto de amplificado siguiendo los protocolos mencionados previamente. Los resultados de la secuenciación de parientes y pacientes fueron comparados con la secuencia de referencia disponible en NCBI (NM\_000348) usando la herramienta de alineamiento múltiple de acceso libre Kaling (Lassmann & Sonnhammer, 2005). El efecto patológico de la mutación fue verificado accediendo a la base de datos ClinVar (Landrum et al., 2014) y a la herramienta de acceso libre Polyphen2 (Adzhubei et al., 2010).

### **6.2. Relación genotipo-fenotipo en pacientes con ambigüedad genital:**

#### **6.2.1 Clasificación fenotípica de los pacientes:**

Los genitales externos de los pacientes fueron clasificados de acuerdo al protocolo propuesto por Sinnecker et al (1996), el cual podía variar entre un fenotipo principalmente masculino a uno predominantemente femenino; se le asignó un valor entre 1 y 5, siendo 1 un fenotipo predominantemente masculino y 5 femenino. Adicionalmente se empleó el puntaje de masculinización externa (EMS, del inglés External Masculinization Score) propuesto por



Ahmed y colaboradores (Ahmed, Khwaja, & Huges, 2000), este puntaje varía entre 0 y 12, siendo 0 un fenotipo principalmente femenino y 12 masculino. Para el cálculo de este puntaje se consideraron características anatómicas como: fusión escrotal, tamaño del micropene, posición del meato uretral y localización de las gónadas.

### **6.2.2 Genotipificación del polimorfismo p.L89V:**

El polimorfismo p.V89L (c.265C>G; rs523349) fue investigado en los pacientes con ambigüedad genital, mediante la secuenciación del exón 1. Para esto, se amplificó como se describió en apartados anteriores el exón 1 del gen *SRD5A2* usando ADN genómico de cada uno de los pacientes y se prepararon las muestras amplificadas para ser secuenciadas en Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Los resultados fueron comparados con la secuencia de referencia NM\_000348 usando la herramienta Kaling (Lassmann & Sonnhammer, 2005)

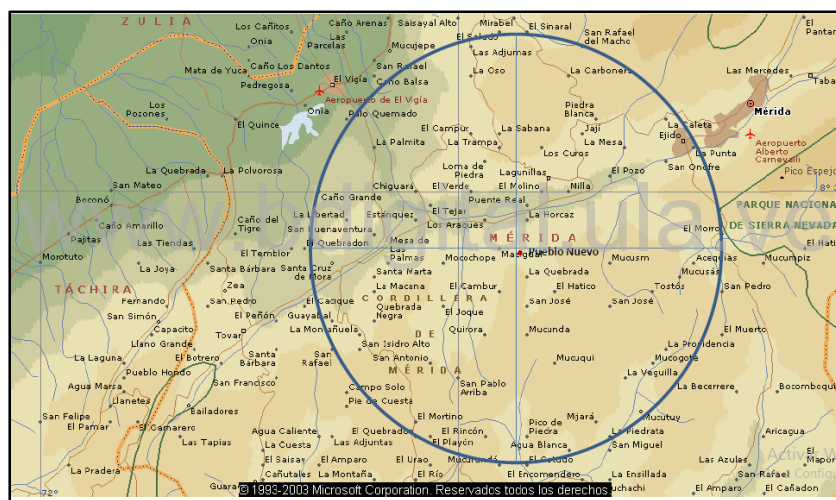
### **6.2.3 Clasificación fenotípica de casos publicados:**

Con el propósito de estudiar la relación genotipo-fenotipo de manera extensa, se realizó una búsqueda exhaustiva en la base de datos PubMed y Medline. Se seleccionaron todos los artículos publicados disponibles en la web con pacientes con deficiencia de 5- $\alpha$ -Reductasa y su respectiva mutación en el gen *SRD5A2*. La búsqueda de los artículos fue llevada a cabo usando las siguientes palabras claves: *SRD5A2*, mutations, y 5 alpha reductase deficiency. Cada uno de los artículos publicado fue revisado de una manera meticulosa y sistemática. Se incluyeron en el estudio todos los que describían de manera detallada el fenotipo de los pacientes, de manera que se pudieron clasificar los pacientes según el EMS y se excluyeron las mutaciones que se hubieran descrito al menos 3 veces para que la estadística resultara adecuada. Los individuos incluidos fueron agrupados según la mutación que portaban junto con su EMS correspondiente y se calculó el valor promedio de los puntajes y la desviación estándar para cada mutación usando una hoja de cálculo de Excel. Adicionalmente, para determinar si existía diferencia significativa entre las medias de los diferentes grupos generados en el análisis, se realizó una prueba t de Student de dos colas para varianzas iguales.

### 6.3. Frecuencia de la mutación en el foco geográfico

#### 6.3.1 Establecimiento del foco geográfico:

El concepto de foco geográfico para una enfermedad recesiva fue propuesto por Arias, 1994 como el área geográfica comprendida en la circunferencia de 55 km de diámetro, donde nacieron dos abuelos (uno materno y uno paterno) de uno o más casos índices en familias sin parentesco próximo. Se define el foco geográfico de la enfermedad en estudio con el centro en Pueblo Nuevo del Sur, por ser éste el lugar de procedencia de los pacientes; para ello se empleó el Atlas Encartas, englobando a todos los pueblos ubicados dentro de esta circunferencia con un área de 2376 km<sup>2</sup>. En la figura 9 se muestra el área correspondiente al foco en el estado Mérida.



**Figura 9.** Foco geográfico de la deficiencia de 5-α-reductasa en el estado Mérida.

#### 6.3.2 Población de estudio:

Las muestras poblacionales se recolectaron a través del Banco de Sangre del IAHULA, y se incluyeron en el estudio aquellas personas provenientes del foco geográfico previamente establecido.

### 6.3.3 Criterios de inclusión de la población testigo:

En el estudio poblacional sólo se permitió participar a personas fenotípicamente sanas con sus cuatro abuelos nacidos dentro del foco. Además, las personas debían ser genéticamente independientes. Para resguardar la identidad de los participantes en el estudio se le asignó un código a cada muestra recolectada. Los participantes completaron el cuestionario sobre la información personal y el consentimiento informado, mostrados a continuación.

Universidad de Los Andes IAHULA  
Facultad de Medicina  
Unidad de Genética Médica

#### PLANILLA DATOS TESTIGOS

Código: \_\_\_\_\_

Nombres: \_\_\_\_\_  
Apellidos: \_\_\_\_\_  
Fecha y Lugar de Nacimiento: \_\_\_\_\_  
Edad: \_\_\_\_\_ Ocupación: \_\_\_\_\_  
Estado Civil: Soltero: \_\_\_ Casado: \_\_\_  
Tiene hijos: \_\_\_\_\_ N° de Hijos: \_\_\_\_\_  
Datos de Abuelos:  
Lugar Nacimiento Abuelo paterno: \_\_\_\_\_  
Lugar Nacimiento Abuela Paterna: \_\_\_\_\_  
Lugar Nacimiento Abuelo Materno: \_\_\_\_\_  
Lugar Nacimiento Abuela Materna: \_\_\_\_\_  
Datos familiares:  
Grupo Sanguíneo: \_\_\_\_\_  
Familiares con pareja y nunca tuvieron hijos: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Usted ha sido invitado a participar en el proyecto de investigación, realizado por la MSc. Andrea R. Avendaño V. como parte de su tesis doctoral, perteneciente a la Unidad de Genética Médica de la Universidad de los Andes, bajo la Tutoría de la Dra. Irene Paradisi y la co-tutoría de la Prof. Mercedes Gonzalez-Coira. Antes de que usted decida participar en este estudio lea atentamente la información que se le proporcionará y realice las preguntas necesarias para aclarar cualquier duda respecto a la investigación.

El presente trabajo tiene como finalidad identificar diferentes marcadores moleculares y determinar su frecuencia en la población en estudio.

Este estudio es completamente voluntario y se incluirán personas sanas originarias del sur del Estado Mérida y cuyos padres y abuelos hayan nacido en la misma localidad.

Para la recolección de las muestras se extraerán 5 mL de sangre a los participantes, la muestra sanguínea será procesada y se obtendrán muestras de ADN y plasma. El ADN luego será analizado.

Debe quedar claro que usted no recibirá ningún beneficio económico por participar en este estudio. Su participación contribuirá para el desarrollo de la ciencia y la medicina.

La información personal que usted revele permanecerá en completo secreto y no será proporcionada a ninguna persona diferente a Usted bajo ninguna circunstancia. A toda su información se le asignará un código, de manera que cualquier persona diferente a los responsables de la investigación no conocerá su identidad. Los resultados de esta investigación podrán ser publicados en revistas científicas o presentados en eventos científicos, pero su identidad no será revelada.

Usted puede retirarse en cualquier momento del estudio. Sin embargo, los datos obtenidos hasta el momento serán tomados en cuenta a menos que usted solicite sean retirados de la investigación.

Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio. Si desea que se le aclare alguna duda, puede contactar a cualquiera de las siguientes personas: Andrea Avendaño, telf.:0274-2403208, correo: [andreaa@ula.ve](mailto:andreaa@ula.ve); Mercedes González-Coira, telf.: 0274-2403208, correo: [mercedes@ula.ve](mailto:mercedes@ula.ve)

He leído la información proporcionada o se me ha leído. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente a contribuir con esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento.

Nombre del Participante: \_\_\_\_\_

Firma del Participante: \_\_\_\_\_

C.I: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

#### **6.3.4 Tamaño de la muestra poblacional (Sokal and Rohlf, 1969):**

De acuerdo a la aproximación de la distribución binomial a la distribución normal, el intervalo de confianza del 95% para  $p$ , el parámetro de la distribución binomial (en nuestro caso, la frecuencia del gen que estudiamos) viene dado por  $C(p- 1,96S \leq p \leq p+ 1,96S) = 0,95$ , donde  $S = \sqrt{pq/n}$ , y  $n$  es el tamaño muestral (número de alelos). Para un error de 0,015,  $n$  será igual a 196 alelos.

$$S = \sqrt{pq/n}$$

$$0,015 = 1,96\sqrt{pq/n}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 pq}{(0,015)^2} = \frac{3,8416 \times 0,99 \times 0,01}{0,000225} = 169 \text{ genes}$$

$$n = 169 \text{ genes} / 2 = 84 \text{ personas}$$

Por lo tanto, se requiere muestrear 84 personas para poder estimar en una población una mutación con una frecuencia de 0,01 y un error de 0,015.

#### **6.3.5 Toma de muestra de Sangre:**

Se extrajeron 5 mL de sangre periférica por punción venosa y se recolectaron en un tubo con 100  $\mu$ L de EDTA al 15% a cada participante una vez que había firmado el consentimiento y proporcionado la información necesaria.

#### **6.3.6 Extracción de ADN:**

Una vez terminada cada jornada de recolección en el banco de sangre se procedió a extraer el ADN a partir de leucocitos como se describió previamente.

### **6.3.7 Análisis por polimorfismos de conformación de hebra única (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP):**

Para realizar este estudio se amplificó el exón que presentó una migración diferencial en pacientes con respecto a los controles, en cada una de las muestras poblacionales, se amplificó también una muestra de un paciente y de sus padres para ser usados como referencia. El resultado de amplificación fue usado para realizar el SSCP como se detalló en la sección anterior y se reveló mediante tinción de plata como se describió previamente. De esta manera se identificaron en la muestra poblacional los portadores en heterocigosis de la mutación. Aquellas muestras que presentaron migración diferencial fueron secuenciadas en Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) y analizadas para corroborar que se trataba de la misma mutación como se mencionó previamente.

### **6.4. Coeficiente de consanguinidad del foco geográfico:**

Una posible vía de obtener información acerca de la consanguinidad en una comunidad, cuando la información genealógica está incompleta, es determinar la frecuencia de los matrimonios isonímicos, es decir, uniones entre personas del mismo apellido. En muchas sociedades, el apellido es transmitido mediante un patrón regular que corresponde al ancestro más cercano biológicamente. En tales sociedades las frecuencias de uniones entre personas del mismo apellido pueden ser usadas para medir el coeficiente de consanguinidad de la población. Es importante resaltar que mediante la isonimia se puede realizar una aproximación al coeficiente de consanguinidad de la población más que de una unión en particular. Por ejemplo, los hermanos siempre tienen el mismo apellido, mientras que los primos hermanos, sólo tienen el mismo apellido si están relacionados a través de sus padres, es decir,  $\frac{1}{4}$  de las veces. Por lo tanto, los matrimonios entre primos ocurren cuatro veces más que los detectados por isonimia (Crow y Mange, 1965).

Para determinar el coeficiente de consanguinidad por isonimia se emplearon los registros del sistema electoral del año 2012 y se trabajó con el manejador de bases de datos Dbase. Los parámetros de isonimia se calcularon con el programa ISONI3, escrito por el profesor Italo Barrai, Universidad de Ferrara, Italia, en Dbase (no publicado). Adicionalmente, se realizó el mismo análisis con los datos del sistema electoral del año 1991 para tener una idea de la progresión del coeficiente de consanguinidad a lo largo del tiempo. El método de Isonimia se basa en el uso de los apellidos. En Ibero-América, la mayoría de los individuos tiene dos apellidos, el primero que corresponde al primer apellido paterno y el segundo que corresponde al primer apellido materno. La presencia de un solo apellido se debe principalmente a ilegitimidad y en este caso el individuo siempre usa el apellido materno, por lo que en esta condición es importante identificar el apellido paterno si es posible. Luego, se estima la frecuencia de apareamientos isonímicos y se establece su frecuencia.

Se estimaron dos parámetros:

1. Frecuencia de individuos isonimicos esperado, mediante la siguiente fórmula, (Crow y Mange, 1965)

$$I = \sum p_i^2,$$

donde  $p_i$  es la frecuencia relativa del apellido  $i$ , y la suma es sobre todos los apellidos.

3. El coeficiente de consanguinidad por isonimia al azar de la población (Crow y Mange, 1965), definido como:

$$F_{st} = I/4.$$

## **6.5. Origen ancestral de la mutación:**

### **6.5.1 Selección de Polimorfismos de nucleótido único (SNP):**

Basados en datos antropológicos, y más recientemente moleculares, la población venezolana es una población mestiza cuyos orígenes parentales han sido relacionados principalmente a poblaciones europea, amerindia y africana. Tomando ésta información como punto de partida consideramos los datos proporcionados por el proyecto 1000 Genomas fase 3 disponibles en Ensembl (Zerbino et al., 2018) para las tres poblaciones parentales e identificamos los SNP que se encontraban en alto desequilibrio de ligamiento para cada población en una región de 30000 pb, con respecto al SNP localizado hacia el extremo 5' del intrón 4 del gen *SRD5A2*, anotado como rs12470196. Los SNP seleccionados fueron: rs2300702 (g.31788018 C>G; c.281+176672 G>C), rs2268797 (g.31783752 C>G; c.281+21938G>A), rs2268796 (g.31782280; c.281+23410T>C); rs4952220 (g.31765556 C>A; c.281+6720 G>A) y rs12470196 (g.31783752 C>T; c.2824916 G>A).

Subsecuentemente se procedió a medir el desequilibrio de ligamiento para cada uno de los SNP seleccionados usando LDlink (Machiela & Chanoock, 2015), una aplicación disponible de manera gratuita en la web desarrollada por el Instituto Nacional de Cáncer en USA. Los SNP fueron seleccionados según su frecuencia del alelo secundario (MAF) cercano a 0,5. Una vez seleccionados los SNP se procedió a diseñar los cebadores correspondientes usando el programa OligoExplorer 1.2 (2004). La secuencia de cada uno de los cebadores junto con la longitud del amplificado y su Tm (°C) se exponen en la Tabla 6.

### **6.5.2 Genotipificación de los pacientes:**

Usando el ADN de cada uno de los pacientes y sus progenitores se amplificaron cada uno de los fragmentos de ADN que contenían el SNP de interés. Para esto se prepararon mezclas de reacciones como se describió en apartados previos y se usaron los cebadores específicos previamente diseñados. Los resultados de la amplificación se separaron en gel de poliacrilamida 29:1 de Acrilamida: Bis-Acrilamida (Sigma) al 8% en solución tampón TAE 1X, se verificó una amplificación exitosa y se prepararon para su secuenciación en Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) siguiendo las recomendaciones de la empresa. Una vez



obtenidos los resultados de la secuenciación se procedió a identificar cada uno de los polimorfismos y anotar el genotipo de cada individuo.

**Tabla 6.** Secuencias de los cebadores para cada uno de los polimorfismos del gen *SRD5A2* junto con sus Tm (°C) y longitudes correspondientes.

SNP	Secuencia del cebador (5' → 3')	Tm(°C)	Longitud del amplificado (pb)
<b>Rs4952220</b>	+: GACTAAAACATAACCAAACAATA -: CTGAAATCAAAGTTAACTGCA	48	307
<b>rs2300702</b>	+:TACTATGTTCACCACTTGCG -: ACTTTCCATCTTCAGGCTTG	57	492
<b>rs12470196</b>	+:CACCACATTTACTCCACCGC -: GCATCTCCACTTCACACCC	57	598
<b>rs2268796</b>	+: AGGTATTATTATTCCTTCTA -: AAGCCAAAACATCTAAGCA	54	417
<b>rs2268797</b>	+: TCTGAAGGCTGGAAGTATG -: AATAGGGTCTTTGCGATGTCA	58	518

+: Sentido    -: Antisentido

### 6.5.3 Estudio de la estructura poblacional:

Las informaciones genómicas de las poblaciones de referencia fueron obtenidas del proyecto 1000 Genomas fase 3 disponibles en Ensembl (Zerbino et al., 2018) y junto con los genotipos de los pacientes estudiados se usaron para construir las bases de datos requeridas para los diferentes análisis.

Para investigar el origen de la mutación en la población de Pueblo Nuevo del Sur se usaron diferentes enfoques: se usó un análisis bayesiano, análisis de coordenadas principales y un análisis de varianza molecular (AMOVA). El análisis de cluster (agrupación) basado en un modelo Bayesiano fue calculado con el programa Structure versión 2.3.4 (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000) un programa de acceso libre que utiliza el genotipo de múltiples loci para investigar la estructura de la población, incluyendo SNP. Para este propósito se creó un archivo con formato HapMap (.txt ó .map) como datos de entrada de Structure para evaluar distintas hipótesis de ligamiento o no de los loci, estructura de las poblaciones, y agrupamientos de los clúster, resultando las condiciones de mayor verosimilitud las siguientes:

**Length of burnin period:100** (corridas iniciales para minimizar distorsión de los resultados por la configuración inicial)

**Number of MCMC Reps after Burnin:100** (número de corridas para calcular el  $k$ )

**Use prior population information to assist clustering** (usar información suministrada sobre las poblaciones para ayudar al establecimiento de los clusters),

**GENSBACK=2, MIGRPRIOR=0.05, Admixture model, infer alfa** (Información sobre la población de estudio, Gensback representa el número de generaciones en el que un ancestro es inmigrante, Migprior es la probabilidad de que un individuo sea migrante; se asume que los individuos tienen ancestros provenientes de diferentes poblaciones y se infiere  $\alpha$ )

**Allele frequencies are independent among pop** (la frecuencia de los alelos son independientes entre las poblaciones)

**Update Allele Frequencies using Individuals with POPFLAG=1 ONLY**

(actualizar la frecuencia de los alelos usando solo individuos con POPFLAG=1)

**Estimate the Probability of the Data Under the Model** (estimar la probabilidad de los datos con el modelo determinado)

**Collect Data About the Distribution of Ancestry Coefficients Q for each Individual** (recopilar los datos sobre la distribución del coeficiente de ancestralidad Q para cada individuo)

**\* Distribution of Q values is Stored as a Histogram with 1000 Boxes** (la distribución de los valores Q son guardados como histogramas con 1000 cajas)

**\* Size of the Displayed Probability Interval on Q: 0.9** (Tamaño del intervalo de probabilidad presentado)

**Print Q-hat** (grabar Q-hat)

**Initialize at POPINFO** (inicializar con la información de la población previamente suministrada)

**Frequency of Metropolis update for Q: 10** (frecuencia de actualización de metropolis para Q)

El programa arrojó las estructuras poblacionales más probables con diferentes números de clústeres ( $k$ ), mediante la estimación de la probabilidad logarítmica de los datos

$Pr(X|K)$  para cada valor de  $k$ , permitiendo de esta manera, la estimación de cuán probable es que un individuo pertenezca a una población dada. Sin embargo, es necesario identificar el  $k$  de mayor probabilidad, por lo que los resultados se convirtieron en .zip y se cargaron en Structure Harvester (Tamura, Stecher, Peterson, & Alan Filipski, 2013); usando el método de Evanno se calculó el número de clúster más probable, y se seleccionó el gráfico de triángulo con  $LnP(K)$  similar. A continuación, se empleó la tabla Q de la población que presenta la proporción calculada de memberships de cada población predefinida en cada clúster predicho por Structure, la cual fue transformada a formato .csv (archivo separado por comas) para ser usado el programa estadístico Minitab 17 (2010) donde se realizó un análisis de componentes principales.

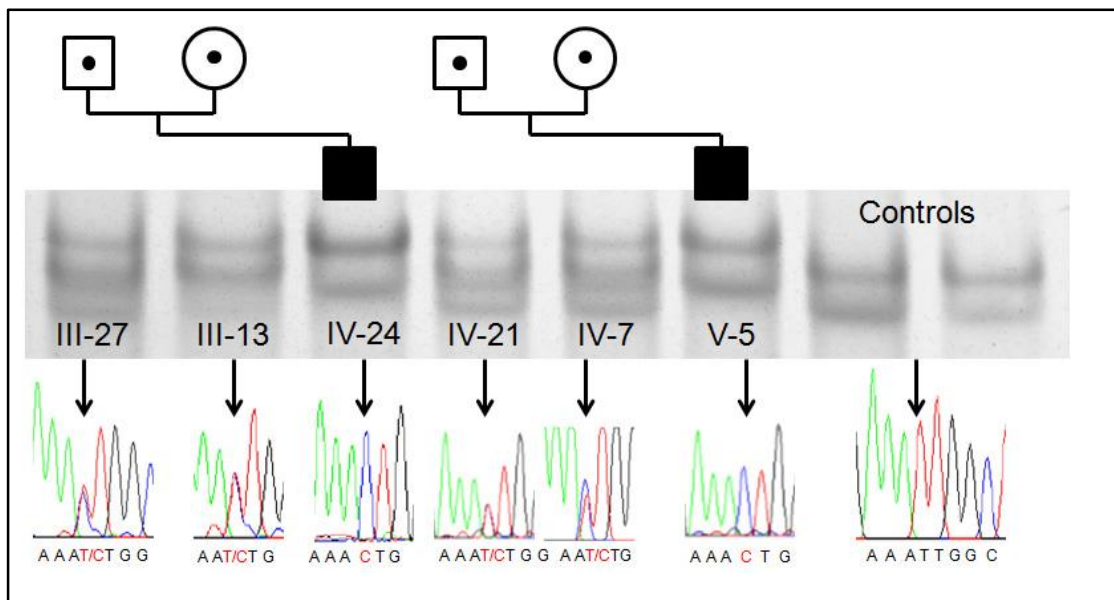
Nuevamente con los genotipos correspondientes a cada SNP de las diferentes poblaciones de referencia (tomados del proyecto 1000Genomas) y de los pacientes, se construyó una base de datos apropiada para analizar la distancia genética con base en la frecuencia de alelos. Para esto se empleó el software GenAIEx 6.502 (Peakall R & Smouse, 2012; Peakall R & Smouse P, 2006) que permite realizar un amplio rango de estudios de genética molecular de poblaciones en un ambiente de Microsoft Excel. Se procedió a realizar un estudio de la estructura genética de las poblaciones, para ello se llevó a cabo un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Identificación de la mutación

El primer objetivo de este estudio fue identificar la mutación responsable del fenotipo de los pacientes estudiados en la Unidad de Genética de la Universidad de Los Andes, para esto los pacientes fueron evaluados clínicamente, y sus genitales fueron descritos de manera detallada por el grupo interdisciplinario de médicos (endocrinólogos y cirujanos pediatras) que atienden usualmente este tipo de casos. Los tres pacientes presentaron genitales ambiguos al nacer. En la Tabla 7, se presentan las características clínicas relevantes de los pacientes involucrados en el estudio.

Una vez caracterizados los pacientes fenotípicamente, se procedió a la identificación de la mutación. En la figura 10 se muestran los resultados de SSCP y secuenciación de los pacientes IV-24 y V-5 y sus correspondientes progenitores, los cuales resultaron heterocigotos para la mutación; como se observa en la figura tanto progenitores como pacientes presentaron un patrón de bandas con migración diferente con respecto a los controles. Los hermanos de los pacientes también fueron evaluados mediante SSCP pero ninguno presentó migración diferencial con respecto a los controles, por lo que se les consideró homocigotos para el alelo silvestre (normal). El paciente V-2 fue secuenciado directamente y presentó el mismo cambio que los otros pacientes. Ya culminando el estudio nació una hermana del paciente V-5, ésta niña fue estudiada y resultó heterocigota para la mutación.



**Figura 10.** Resultados de SSCP y secuenciación de Sanger para los pacientes IV-24, V-5, padres y controles

La secuenciación de Sanger del exón 4 del gen *SRD5A2* detectó una mutación del tipo transición que cambió una Adenina por una Guanina, produciendo un codón de sentido errado en la posición 193, que en la proteína se tradujo en el cambio de una Asparagina por una Serina, p. N193S; el cambio a nivel de ADNc corresponde a c.578 A>G. Esta mutación ya había sido reportada previamente en otras poblaciones del mundo y fue anotada en las bases de datos de variantes genéticas bajo el identificador rs763296857.

El efecto patogénico de la mutación fue determinado con el programa de acceso libre PolyPhen 2, el cual clasificó la mutación según HumDiv con un puntaje de 1.00 (valor máximo de patogenicidad) con sensibilidad 0.00 y especificidad 1.00, el mismo programa clasificó la mutación según HumVar dañina con un puntaje de 0.999 con sensibilidad de 0.09 y especificidad 0.99. Por otra parte, también demostró que la Asparagina en la posición 193 es completamente conservada entre los mamíferos. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos en PolyPhen 2. De la misma manera, la mutación fue clasificada como patogénica en la base de datos ClinVar (Landrum et al., 2014).

**Tabla 7.** Características fenotípicas de los individuos afectados incluidos en el estudio

Paciente	Sexo	Edad <sup>a</sup>	Subtipo Genital externo <sup>b</sup>	EMS <sup>c</sup>	Hipospadias	ML (cm)	td posición	Td tamaño (L/Ap/Tr)(cm)	ti posición	Ti tamaño (L/Ap/Tr)(cm)	Total T (ng/mL)
IV-24	Mujer	18	3a	3	Perineoscrotal	0.5	LF	0.8/0.7/1.2	LF	1.2/0.8/1.4	1.8
V-2	Varón	8	3a	2.5	Perineoscrotal	1.5	LF	1.76/0.7/0.82	IP	1.63/0.62/1.48	1.6
V-5	Varón	1	3a	3.5	Ausente	0.7	SF	1.0/0.6/0.8	Absent	-	1.8

<sup>a</sup>: Edad en años para el momento del estudio

<sup>b</sup>: Clasificación de acuerdo a Sinneker et al. 1996

<sup>c</sup>: EMS de acuerdo a Ahmed et al. 2000 (rango 0-12)

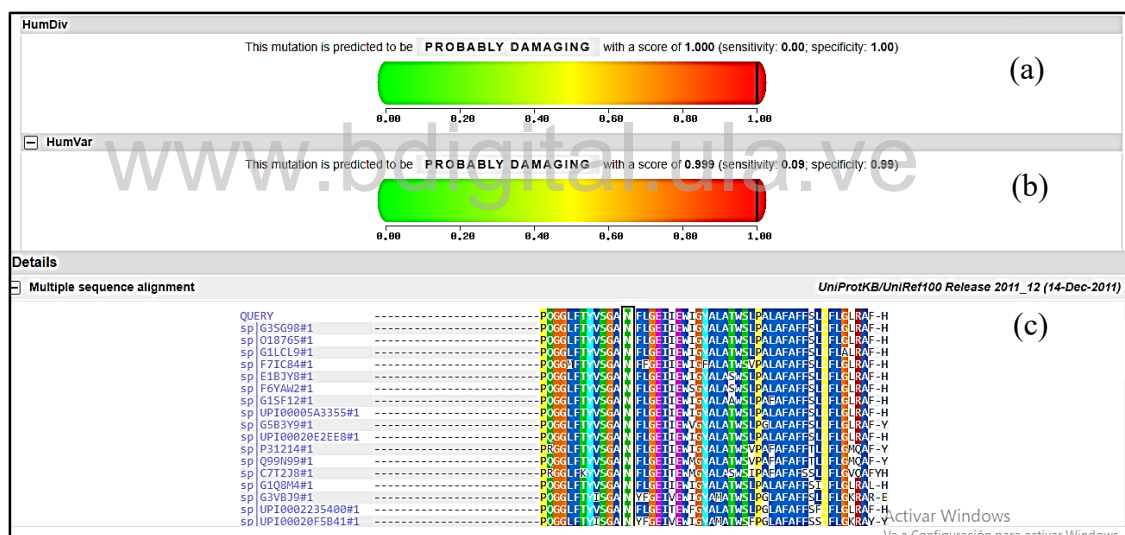
td: testículo derecho; ti: testículo izquierdo

ML: Largo del microfalo

LF: pliegue labioescrotal; SF: pliegue supraescrotal; IP: pliegue inguinal

L/Ap/Tr: longitudinal/anterior-posterior/transversal

T: testosterona (rango normal: 2.0-6.9 ng/mL)



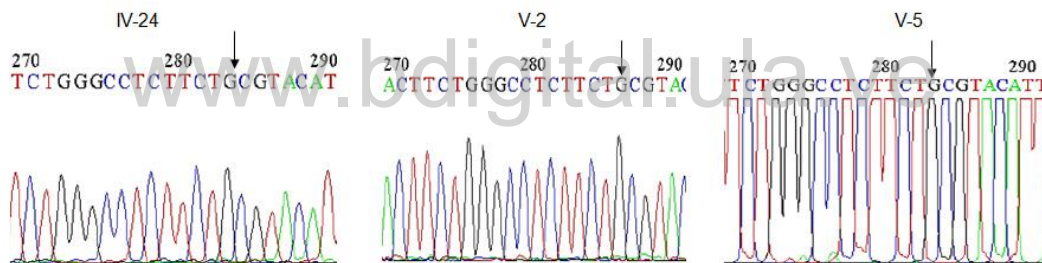
**Figura 11.** Resultados obtenidos en Polyphen-2 al analizar la mutación p.N193S en el gen *SRD5A2*. (a) Puntaje según HumDiv (b) Puntaje según HumVar (c) Alineamiento de múltiples secuencias

## 7.2. Relación genotipo-fenotipo en pacientes con ambigüedad genital

Los pacientes fueron evaluados clínicamente y se evidenció que no existía una correspondencia absoluta entre sus características fenotípicas y el genotipo. A pesar de que éstos pertenecían a una gran familia donde los eventos de endogamia eran frecuentes, al clasificarlos según Sinneker y colaboradores los 3 pacientes correspondían al subtipo 3a

(Sinnecker et al., 1996). Sin embargo, de acuerdo a la clasificación EMS cada uno de los pacientes recibió un puntaje diferente, el paciente IV-24 es 3, V-2 es 2,5 y V-5 es 3,5, evidenciando diferencias en la posición del meato urinario (hipospadia) y localización de las gónadas, las cuales son las principales características que se distinguen en los tres pacientes (Tabla 7).

Para proponer una explicación plausible a las diferencias observadas entre los pacientes, determinamos para cada uno de ellos el genotipo para el polimorfismo p.L89V. En la figura 12 se muestra los resultados de la secuenciación del exón 1 del gen *SRD5A2*, donde se localiza el polimorfismo; en la figura se señala con una flecha el SNP. Todos los pacientes resultaron homocigotos para el alelo silvestre.



**Figura 12.** Secuenciación del exón 1 del gen *SRD5A2* donde se muestra el polimorfismo p.L89V

Adicionalmente, se diseñó una manera un poco más precisa, más allá de la simple observación cualitativa de los diferentes fenotipos, que permitió elucidar un poco el efecto de ciertas mutaciones en la relación genotipo-fenotipo. Para esto, se calculó el puntaje de masculinización externa (EMS) y se calculó la desviación estándar de todos los EMS calculados para cada mutación reportada en la literatura. De los 250 pacientes reportados hasta el momento del análisis sólo 120 fueron considerados para el estudio.

En las tablas 8, 9 y 10 se muestran las mutaciones reportadas al menos en tres pacientes diferentes en condición de homocigosis, el EMS promedio y su desviación estándar (DE). Las mutaciones más frecuentemente descritas son aquellas que incrementan el  $K_m$  para la testosterona, para el NADPH o aquellas mutaciones que disminuyen la actividad enzimática.

En la tabla 8 se exponen las mutaciones que afectaban el  $K_m$  de la enzima para la testosterona. En este caso sólo 3 mutaciones en homocigosis fueron analizadas, en la primera p.G34R (DE 2.06) resultaron fenotipos muy variables por lo que la desviación estándar resultó elevada, en la segunda p.H231R (DE 1.15) se obtuvo un valor intermedio de desviación estándar y p.G115D (DE 0.55) presentó un valor considerablemente inferior en comparación con los otros dos valores.

**Tabla 8.** Puntaje de masculinización externa para mutaciones que afectan el  $K_m$  de la enzima para la testosterona (T)

Mutación	Número de pacientes reportados	Promedio EMS	Desviación estándar (DE)	Referencias
p.G34R/p.G34R	12	3.33	2.06	(Mazen, Gad, Hafez, Sultan, & Lumbroso, 2003; Soliman et al., 2015)
p.H231R/p.H231R	4	2.00	1.15	(Berra et al., 2011; Boudon et al., 1995; Laurent Maimoun, Philibert, Bouchard, et al., 2011)
p.G115D/p.G115D	5	2.60	0.55	(L. Maimoun et al., 2010; Laurent Maimoun, Philibert, Bouchard, et al., 2011; Laurent Maimoun, Philibert, Cammas, et al., 2011; Vilchis, Méndez, Canto, Liebermen, & Chávezz, 2000)

De igual manera, en la tabla 9 se presentan las diferentes mutaciones que afectan el  $K_m$  de unión al cofactor de la enzima, NADPH. En este caso se presentan 5 mutaciones que al igual que las anteriores mencionadas varían en su capacidad de definir fenotipos precisos en los pacientes que portan las diferentes mutaciones. La mutación con una relación genotipo-



fenotipo menos directa es p.Y235F y la menos variable es p.G196S con desviaciones estándar de 3,46 y 0,95 respectivamente.

En la tabla 10 se presentan los valores obtenidos para aquellas mutaciones que afectan la actividad enzimática. Cinco mutaciones adicionales fueron analizadas en éste grupo y se observó un comportamiento similar, variabilidad en la relación genotipo-fenotipo de los pacientes y con mutaciones mucho más variables que otras. La mutación p.L55Q resultó la más variable en este grupo y p.Q126R fue la menos variable con desviaciones estándar de 3.0 y 1.47 respectivamente.

Por último, se realizó una prueba estadística t de Student para comparar los valores de EMS obtenidos para cada paciente incluido en el análisis en los tres grupos determinados por el efecto de la mutación sobre la enzima. Al comparar los valores de EMS del grupo de mutaciones que afectan el *km* de la T con aquellas que alteran el *km* del NADPH no se encontró diferencia significativa en el fenotipo entre estos dos grupos ( $p=0.17664$ ). Cuando se compararon los grupos de mutaciones que afectan el *km* de la testosterona y del NADPH de manera independiente, con el grupo de mutaciones que disminuye la actividad enzimática, se observó una diferencia significativa con  $p<0.001$  y se obtuvieron valores de  $p=5.474 \times 10^{-6}$  y  $p=3.689 \times 10^{-6}$ , respectivamente.

### **7.3. Frecuencia de la mutación en el foco geográfico**

Con el objetivo de identificar los portadores sanos (heterocigotos) de la mutación, se seleccionó al azar una muestra de la población perteneciente al foco geográfico (población control), que reportaron ausencia de alguna alteración del desarrollo sexual en la familia y

**Tabla 9.** Puntaje de masculinización externa para mutaciones que afectan el *Km* de la enzima para el cofactor NADPH.

Mutación	Número de pacientes reportados	Promedio EMS	Desviación estándar (DE)	Referencias
p.G183S/p.G183S	6	4.17	2.48	(Hackel et al., 2005)
p.G196S/p.G196S	12	3.30	0.95	(Baldinotti et al., 2008; Caldas Ferraz, Guerra Jr., Matias Baptista, Maciel-Guerra, & Hackel, 1998; Hackel et al., 2005; Hiort et al., 1996; Soliman et al., 2015; Wilson, Griffin, & Russell, 1993)
p.Y235F/p.Y235F	5	4.00	3.46	(Baldinotti et al., 2008; Laurent Maimoun, Philibert, Cammas, et al., 2011; Mazen et al., 2003; Nicoletti et al., 2005)
p.R246Q/p.R246Q	14	3.68	1.67	(Berra et al., 2011; Chan et al., 2013; Ko et al., 2010; Laurent Maimoun, Philibert, Cammas, et al., 2011; Nicoletti et al., 2005; Sahu et al., 2009; a E. Thigpen, Davis, Gautier, Imperato-McGinley, & Russell, 1992; Vilchis et al., 2000; H. Zhu et al., 2014)
p.R246W/p.R246W	6	2.67	1.21	(Hackel et al., 2005; Imperato-McGinley et al., 1974; Laurent Maimoun, Philibert, Cammas, et al., 2011; a E. Thigpen et al., 1992)

**Tabla 10.** Puntaje de masculinización externa para mutaciones que afectan la actividad enzimática

Mutación	Número de pacientes reportados	Promedio EMS	Desviación estándar (DE)	Referencias
p.L55Q/p.L55Q	8	3.00	3.00	(Hiort et al., 1996; Laurent Maimoun, Philibert, Cammas, et al., 2011; Ocal et al., 2002)
p.Q126R/p.Q126R	12	4.17	1.47	(Boudon et al., 1995; Fernández-Cancio et al., 2011; Fernández-cancio et al., 2005; Hiort et al., 1996; Laurent Maimoun, Philibert, Cammas, et al., 2011)
p.Y91H/p.Y91H	8	6.125	2.53	(Akcay et al., 2014; Di Marco et al., 2013; Laurent Maimoun, Philibert, Cammas, et al., 2011; Soliman et al., 2015)
p.N160D/p.N160D	4	4.75	2.98	(Laurent Maimoun, Philibert, Bouchard, et al., 2011; Mazen et al., 2003; A. E. Thigpen et al., 1992)
p.R227Q/p.R227Q	24	8	1.79	(Chan et al., 2013; Cheng et al., 2015; Laurent Maimoun, Philibert, Cammas, et al., 2011; Sasaki et al., 2003; R. Wang et al., 2013)

que, además, sus cuatro abuelos habían nacido en el foco. Si bien el cálculo teórico del tamaño muestral adecuado, para estimar una frecuencia del alelo recesivo igual a 0,1, fue de 84 individuos, se presentaron inconvenientes presupuestarios que sólo permitieron localizar y tomar muestra sanguínea a 40 personas. En esta muestra se encontró un portador de la

mutación, lo que significa que la mutación se encontró en una frecuencia de 1 en 80 cromosomas. En la figura 13 se muestra una imagen del SSCP donde se detectó el individuo portador de la mutación, el genotipo de este individuo fue corroborado mediante secuenciación de Sanger, los individuos de referencia usados fueron dos progenitores de los niños afectados, cuya condición de heterocigoto ya había sido demostrada previamente.



**Figura 13.** SSCP del exón 4 del gen *SRD5A2* de muestras de individuos sanos pertenecientes al foco geográfico. Pozo 3 individuo portador perteneciente a la población. Pozo 10 progenitor portador comprobado por secuenciación. Pozo 12 marcador de peso molecular

#### **7.4. Consanguinidad de la familia y de Pueblo Nuevo del Sur**

A pesar de que los padres reportaron de los pacientes V-1 y V-5 reportaron un grado de consanguinidad y comparten apellidos el ancestro común no fue identificado, por lo que el cálculo de la consanguinidad familiar fue imposible de determinar. Únicamente, la consanguinidad del paciente IV-24 fue calculada y correspondió a una unión entre primos hermanos, es decir, se obtuvo un coeficiente de consanguinidad de 0,0625.

Por otra parte, una característica importante en el estudio de enfermedades autosómicas recesivas es la consanguinidad en la población donde se reporta una de éstas enfermedades, es por esto que se calcularon los parámetros que permiten realizar una aproximación del coeficiente de consanguinidad por el método de Isonimia. Se calcularon dos parámetros: la frecuencia de individuos isonímicos (I); para el año 2012 se obtuvo un valor de 0,0712 y el coeficiente de consanguinidad estimado por isonimia al azar (componente aleatorio) (Fst), el cual resultó 0,0178 usando los datos extraídos del CNE del país para el año 2012. Adicionalmente, se comparó la frecuencia de los 7 apellidos más frecuentes en Pueblo Nuevo del Sur y sus aldeas aledañas y se observó que los apellidos y su frecuencia no había variado mucho al compararlos con los reportados por el CNE en el año 1991. En la tabla 11 se pueden apreciar los apellidos más frecuentes y su frecuencia en el año 1991 y 2012.

**Tabla 11.** Frecuencia de los apellidos más abundantes en Pueblo Nuevo del sur y sus villas aledañas en el año 2012 y 1991 según los datos obtenidos por el CNE.

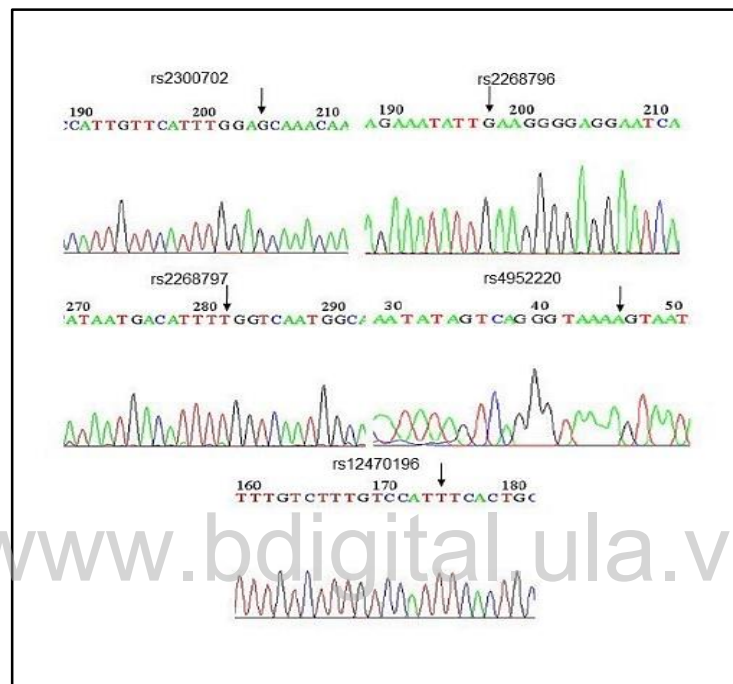
Apellidos en 1991	Frecuencias en 1991 (%)	Apellidos en 2012	Frecuencias en 2012 (%)
Márquez	15,88	Márquez	17,14
Fernández	15,46	Fernández	15,39
Guillen	6,97	Guillen	6,89
Gutiérrez	6,08	Gutiérrez	6,30
Contreras	4,10	Contreras	3,72
García	3,82	García	3,39
Rivas	3,63	Rivas	3,39

## 7.5. Origen ancestral de la mutación

Para lograr identificar el origen de la mutación presente en el foco del estado Mérida se analizó de manera detallada la segregación de los SNP seleccionados en las poblaciones parentales, de esta forma se constató que la región genómica seleccionada era medianamente informativa para nuestros propósitos. Para esto, analizamos la información proporcionada por la base datos Ensembl con respecto al desequilibrio de ligamiento (LD) tomando como referencia el SNP rs12470196. En la población africana éste SNP está en desequilibrio de ligamiento con rs2268797; las poblaciones americanas (Colombia, México y Puerto Rico) y las europeas (España, Italia, Inglaterra y estadounidenses descendientes de europeos) comparten los mismos SNP (rs2268797, 2268796,2300702 y rs4952220) aunque varían en frecuencia y en  $r^2$  y  $D'$ ; los peruanos por su parte, comparten todos los SNP con americanos y europeos pero además presentan un SNP que sólo fue reportado en 1000Genomas para las poblaciones asiáticas el rs12470143; por último la población asiática (sur de China y Japón) interesantemente presentan un alto desequilibrio de ligamiento con cinco SNP adicionales a los mencionados para el resto de las poblaciones, siendo estos rs12470143, rs2300700, rs28383018, rs59894106 y rs57971483.

Todos los pacientes y el individuo sano portador de la mutación perteneciente a la población fueron genotipados para cada SNP seleccionado. En la figura 14 se presentan los electroferogramas obtenidos de la secuenciación de cada uno de los fragmentos amplificados para identificar el genotipo de los SNP antes mencionados. La flecha indica el SNP de interés. Tanto los pacientes como el portador sano de la población del foco geográfico resultaron homocigotos para el haplotipo G;T;G;A;T.

Adicionalmente, se midió el desequilibrio de ligamiento para cada uno de los SNP seleccionados usando LDlink, una aplicación disponible de manera gratuita en la web desarrollada por el Instituto Nacional de Cáncer en USA. Los resultados se presentan en la tabla 12.



**Figura 14.** Electroferogramas de cada uno los SNP que constituyen el haplotipo seleccionado para identificar el origen de la mutación

La primera aproximación utilizada para lograr establecer el origen ancestral de la mutación encontrada fue investigando la estructura de la población, para esto se empleó el programa Structure. En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos a través de Harvester, el número de clústers (K) más probable según el análisis es 4, en la tabla 13 el resultado se resalta con una barra amarilla. El gráfico en triángulo define con mayor probabilidad la estructura de los individuos que estamos estudiando, se presenta en la figura 15.

**Tabla 12.** Valores de  $D'$  y  $r^2$  para cada SNP incluido en el estudio con respecto a rs12470196 en cada una de las poblaciones de referencia.

Población	rs2268796	2268797	2300702	rs4952220	rs12470143	rs2300700	rs28383018	rs59894106	rs57971483	
	$r^2$	$D'$	$r^2$	$D'$	$r^2$	$D'$	$r^2$	$D'$	$r^2$	$D'$
África	-	-	0.8264	0.9568	-	-	-	-	-	-
Colombia	0.9153	0.9778	0.936	0.978	0.9153	0.9778	0.936	0.978	-	-
México	0.9105	1	0.9385	0.9687	0.7951	0.9345	0.9394	1	-	-
Perú	0.8873	0.9516	0.8856	0.9522	0.8855	0.9522	0.9305	0.9761	0.8889	1
Puerto Rico	0.8873	0.9796	0.9424	0.9803	0.9054	0.9799	0.9425	0.9803	-	-
Inglaterra	0.956	1	0.956	1	0.9778	1	0.7911	0.93	-	-
España	0.944	1	0.9634	1	0.944	1	0.9435	0.9807	-	-
Italia	0.9106	1	0.9532	1	0.9453	1	0.9106	1	-	-
Europeos en USA	0.9145	0.9776	0.8943	0.956	0.9355	0.9779	0.9575	1	-	-
Japón	0.042	1	0.9608	1	0.9802	1	0.942	1	1	1
China	0.9557	1	0.9557	1	0.9773	1	0.9773	1	0.9548	0.9771

$D'$ : indicador de segregación alélica para dos variantes. Gama entre 0-1, valores cercanos a 1 ligamiento fuerte entre los alelos.

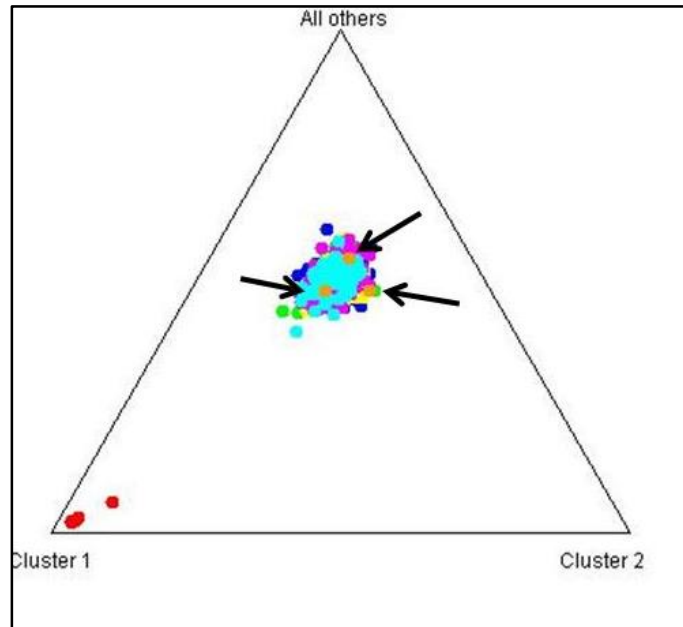
$r^2$ : Medida de correlación de alelos para dos variantes. Gama entre 0-1, valores cercanos a 0 indican que los alelos son independientes

**Tabla 13.** Clúster más probable para determinar la estructura de la población calculados a través de Harvester.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
2	20	-1090862.71	963566.969	-	-	-
3	20	-164146.790	348710.374	926707.925	811890.765	2.328267
4	20	-49329.630	30370.059	114817.160	94765.550	3.120360
5	20	-29278.020	11265.131	20051.610	15474.990	1.462477
6	20	-25701.400	7454.870	3575.620	185.300	0.024855
7	21	-22310.081	6464.934	3391.319	-	-

En la Figura 15 se puede apreciar que los individuos de origen africano forman un clúster bien diferenciado en el vértice izquierdo del triángulo (puntos rojos), el resto de los

individuos pertenecen a las diferentes poblaciones de referencia; nuestros pacientes se distribuyeron en un gran grupo en el centro del triángulo.



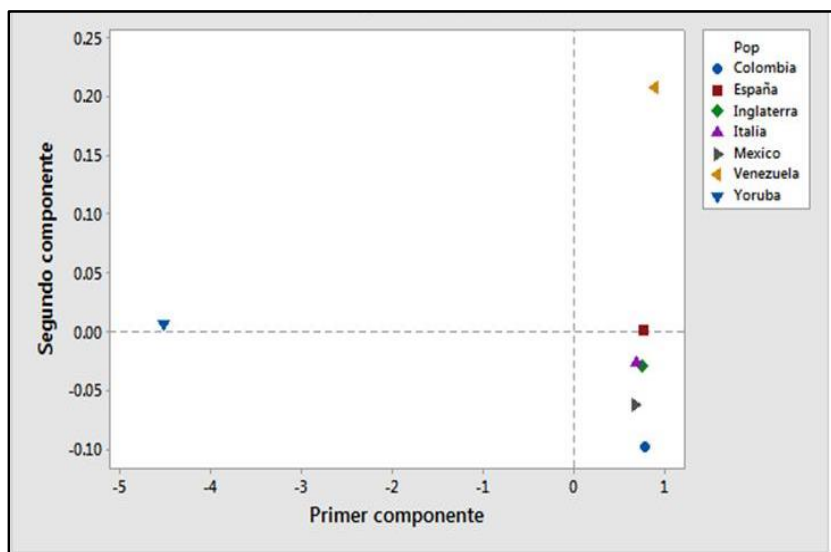
**Figura 15.** Representación en triángulo de la distribución de los clusters con mayor probabilidad. Las flechas negras señalan los tres pacientes y los puntos rojos representan los individuos de origen africano.

En la figura 16 se observa la distribución de las poblaciones, Yoruba (Africa) es una población considerablemente diferente al resto de las poblaciones incluidas en el estudio, nuestros pacientes (Venezuela) se agrupan independientes al resto de las poblaciones.

Para corroborar los resultados obtenidos con Structure usamos el programa de acceso GenAIEx 6.502 (Peakall R & Smouse, 2012; Peakall R & Smouse P, 2006) y se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). En la figura 17 se muestra la representación gráfica de éste análisis y se puede observar una diferencia obvia entre los haplotipos de la población que usamos de referencia para África (Yoruba) y las asiáticas (Japón y sur de China), estas poblaciones forman dos

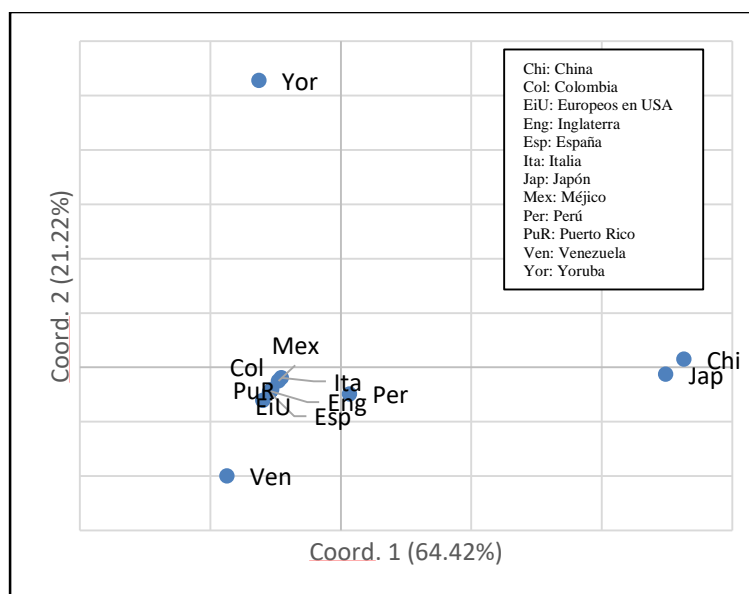


grupos totalmente diferentes. Los europeos junto con los americanos forman un grupo aparte exceptuando la población de Perú que se asemeja un poco a los japoneses.



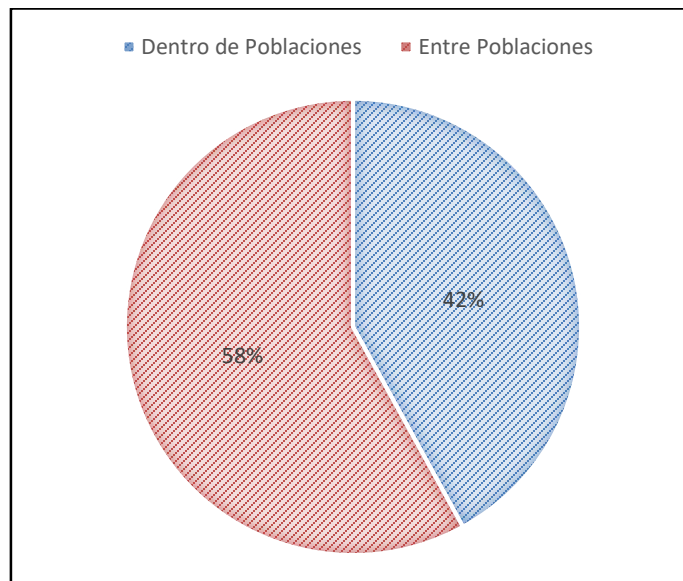
**Figura 16.** Representación gráfica del Análisis de Componentes Principales usando los datos de la matriz Q de población arrojada por Structure.

www.bdigital.ula.ve



**Figura 17.** Análisis de Coordenadas Principales de los pacientes (Ven) y todas las poblaciones de referencia

En la figura 18 se pueden observar los resultados obtenidos del análisis de AMOVA realizado a partir de la matriz de distancia genética, donde existe un 58% de variación entre las poblaciones y un 42% de varianza dentro de las poblaciones.



**Figura 18.** Porcentaje de Varianza Molecular (AMOVA) usando los pacientes y las poblaciones de referencia

## 8. DISCUSIÓN

La deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 es una alteración del desarrollo sexual (DSD) 46,XY, con patrón de herencia autosómico recesivo; es poco frecuente y es el resultado de la capacidad reducida para convertir la testosterona (T) en su metabolito más potente, la dihidrotestosterona (DHT). La enzima responsable de llevar a cabo esta reacción es la 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 y es codificada por el gen *SRD5A2*; la expresión fenotípica de esta afección puede ser muy variable y depende del tipo de mutación y sus efectos sobre la actividad enzimática (Vilchis et al., 2008). Hasta la fecha, en la base de datos de mutaciones génicas humanas (Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) se han reportado 98 mutaciones puntuales a lo largo del gen, 10 mutaciones que alteran el corte y empalme, una mutación en región reguladora, 17 pequeñas deleciones, 6 pequeñas inserciones, 3 pequeños indel, y 4 deleciones grandes. La mayoría de los fenotipos más severos son frecuentemente causados por mutaciones de cambio de sentido; las evidencias experimentales apuntan a que este tipo de mutaciones conducen a la ausencia de actividad enzimática. Por otra parte, el resto de las mutaciones antes mencionadas no inactivan completamente a la enzima lo que conduce a un rango fenotípico muy variable (Vilchis et al., 2010).

Los pacientes incluidos en este estudio resultaron portadores de una mutación de sentido errado en el exón 4 del gen *SRD5A2*, la secuenciación Sanger detectó una mutación de tipo transición, lo que representó una sustitución de una adenina por una guanina en la posición 578 de la secuencia de ADNc (c.578 A>G; rs763296857) (Fig.9), lo que se tradujo a un cambio de una asparagina por una serina en la posición 193 de la proteína (p.N193S).

El alelo mutado G ha sido reportado a nivel mundial con una frecuencia de 0,00001608

en la base de datos de agregación de genomas (Genome Aggregation Database, gnomAD v2.1.1); esta base de datos es una coalición de centros de investigación con el fin de homogenizar los datos disponibles de secuenciación de exomas y genomas completos provenientes de los diferentes proyectos en curso (Karczewski et al., 2020).

Wigley y colaboradores en 1994 realizaron experimentos *in vitro* y demostraron el impacto de esta mutación sobre la actividad enzimática, pH óptimo y constantes cinéticas aparentes. En el mencionado estudio determinaron el porcentaje de conversión de T a DHT de la enzima *in vitro* y observaron una disminución sustancial con respecto a la enzima silvestre; esta presentó un 55% de la actividad mientras que solo detectaron un 5 % de actividad en la enzima mutante. El pH óptimo también se modificó ligeramente, el de la enzima silvestre es de 5,0 y para la mutante se reportó un rango de 5,5 – 6,5. La velocidad máxima de reacción (nanomoles de DHT formado por minuto por miligramo de proteína) también se ve afectada por esta mutación, la reportada para la enzima silvestre es de 2,5-5,0, por el contrario, la enzima mutante presentó una  $V_{max}$  de 0,3-0,4. Los  $K_m$  para la testosterona y el cofactor NADPH también resultaron alterados, incrementando el  $K_m$  de la enzima mutante de 0,5-1,0 a 1,2  $\mu\text{M}$  y 10-20 a 184  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Por último, en este estudio también se verificó la vida media de la proteína, la cual resultó severamente afectada, disminuyendo de 20-30 horas en una enzima silvestre a 5-10 h en la enzima con la mutación p.N193S (Wigley et al., 1994).

La asparagina en la posición 193 es un residuo altamente conservado en mamíferos; para verificar el efecto de la mutación se consultó la base de datos ClinVar y la herramienta de acceso libre Polyphen-2, ambas clasificaron la mutación p.N193S como patogénica. PolyPhen-2 es una herramienta que predice el posible impacto de la sustitución de un

aminoácido sobre la estabilidad y función de proteínas humanas usando consideraciones evolutivas comparativas y estructurales que caracterizan la sustitución (Adzhubei et al., 2010). El puntaje arrojado por este programa oscila entre 0,0 y 1,0; aquellas variantes con puntajes de 0,0 son consideradas benignas y aquellas sustituciones con valores cercanos a 1,0 son consideradas deletéreas o patogénicas. Adicionalmente, el programa arroja valores de sensibilidad y especificidad, los cuales, representan la capacidad del algoritmo de predecir correctamente el efecto deletéreo o neutral de las mutaciones, respectivamente. La mutación presente en los pacientes incluidos en este estudio obtuvo un valor de 1,0 con sensibilidad 0,00 y especificidad 1.00 según el modelo predictivo HumDiv (Fig.10), este modelo es usado frecuentemente para evaluar alelos raros en estudios de asociación. El segundo modelo predictivo que utiliza PolyPhen-2 es HumVar, con este modelo la mutación obtuvo un puntaje de 0.999 con sensibilidad de 0.09 y especificidad de 0.99 (Fig. 10), este permite identificar mutaciones con efectos drásticos, por lo que es el modelo que se ajusta más a los requerimientos necesarios para el estudio de enfermedades mendelianas. Con este modelo se confirma de igual manera el efecto deletéreo de la mutación.

La mutación p.N193S fue reportada previamente en condición homocigota o en heterocigota compuesta en pacientes de diferentes orígenes étnicos. El primer paciente con ambigüedad genital reportado fue en Brasil y resultó ser heterocigoto compuesto p.Q126R/p.N193S (Wigley et al., 1994). Posteriormente, la misma mutación fue reportada en un paciente procedente de Lérida-España (Fernández-Cancio et al., 2005). En México se identificó un paciente homocigoto para la mutación (Vilchis et al., 2010). Un paciente de origen africano también resultó portador de la mutación en condición homocigota (Maimoun et al., 2011). Luego, dos casos fueron reportados en China, un caso con genotipo homocigoto p.N193S/p.N193S (Chan et al., 2013) y el segundo heterocigoto compuesto

p.R245Q/p.N193S (Zhu et al., 2014). Por último, más recientemente en Irán se detectó un paciente con la misma mutación en homocigosis (Ahmadifard et al., 2019). Un caso particular corresponde a un paciente polaco referido por sospecha de síndrome de insensibilidad a los andrógenos, el cual resultó heterocigoto simple para la mutación p.N193S/silvestre y los investigadores no lograron identificar una segunda mutación que justificara el fenotipo, considerando el patrón de herencia autosómica recesiva (Boudon et al., 1995). La distribución a nivel mundial de esta mutación parece sugerir que la posición 578 en la secuencia del ADN podría considerarse un punto caliente en el gen. Sin embargo, por definición los puntos calientes se caracterizan por presentar secuencias ricas en guaninas y citosinas (mayor a un 40% de la secuencia), en las cuales, ocurre con mayor frecuencia de lo esperado por azar cambios productos de la desaminación espontánea de citosinas metiladas o por conversión génica sesgada por las secuencias GC (Nesta et al., 2021). Múltiples estudios de regiones codificantes en genes que causan enfermedades genéticas, indicaron que 35% fueron halladas en dinucleótidos CpG, de las cuales el 90% de esas mutaciones resultaron ser transiciones. A su vez, éstas mutaciones ocurren dentro de las regiones codificantes con una frecuencia 42 veces mayor a la predicha por mutaciones al azar (Cooper & Youssoufian, 1988). En este caso el codón mutado es el CAA, y su secuencia flanqueante no corresponde con las características fisicoquímicas propicias, por lo que se puede descartar que la aparición de la mutación en la población estudiada ocurrió *de novo* debido a un punto caliente en el gen.

La deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa es una condición poco frecuente, solamente un poco más de 100 familias han sido reportadas en todo el mundo en la base de datos Orphanet (Orphanet # 753, [www.orphanet.net](http://www.orphanet.net)). Al presente, se ha demostrado que esta alteración

puede ser subestimada debido a que frecuentemente ha sido mal diagnosticada, muchos pacientes sin confirmación molecular han sido diagnosticados con Síndrome de insensibilidad a los andrógenos parcial, lo que dificulta el establecimiento real de la prevalencia de la enfermedad (Maimoun et al., 2010).

Un componente importante de la genética médica constituye la identificación y caracterización de los genotipos responsables para un fenotipo de una enfermedad particular y su evaluación a través de la relación genotipo-fenotipo (Nussbaun et al., 2016). La relación genotipo-fenotipo tomó relevancia en el estudio al momento del análisis de la evaluación clínica, porque al ser clasificados los genitales externos de los pacientes, todos presentaron características diferentes a pesar de presentar la misma mutación. Una gran cantidad de reportes sobre esta deficiencia han sido publicados en los últimos 20 años y frecuentemente se ha mencionado la falta de correlación genotipo-fenotipo entre pacientes con el mismo genotipo.

En particular, en la mutación p.N193S, se han reportado fenotipos altamente variables alrededor del mundo. El examen físico de los pacientes incluidos en este estudio, reveló que todos presentaban genitales ambiguos, sin embargo, cada paciente presentó variaciones en el grado de hipospadia y criptorquidia. Los fenotipos de los pacientes reportados a nivel mundial son bastantes variables. Dos pacientes originarios de China fueron reportados con esta mutación, ambos presentaron fenotipos diferentes, el primero resultó homocigoto para la mutación, fue criado como varón y presentó micropene, hipospadia y escroto bífido (Chan et al., 2013), el segundo paciente presentó hipospadia perineoescrotal, criptorquidia izquierda inguinal, displasia de próstata y genitales externos femeninos, sin embargo éste paciente resultó ser heterocigoto compuesto, por lo que el fenotipo puede estar alterado aún más por

el efecto de la segunda mutación (Zhu, 2014). En México se reportó un paciente homocigoto para la mutación, cuyo sexo de crianza fue femenino y presentó hipospadia perineo escrotal y las gónadas en el escroto (Vilchis et al., 2010). Un paciente de origen africano, que portaba la mutación en homocigosis, presentó clitoromegalia, gónadas en canal inguinal, amenorrea primaria, y su sexo de crianza fue femenino (Maimoun 2011). Más recientemente, en Irán se describió un paciente portador en homocigosis de la mutación con micropene, hipospadia penescrotal y gónadas en canal inguinal (Ahmadifard et al., 2019). La variabilidad en los fenotipos descritos en pacientes pertenecientes a diferentes etnias, sugirió que la relación genotipo – fenotipo en estos pacientes no era completa. Una explicación para éste fenómeno podría estar asociado a otros genes relacionados con la vía de masculinización que puedan actuar como moduladores del fenotipo (Maimoun, et al., 2011).

Estudios anteriores asociaron un polimorfismo particular (p.L89V) localizado en el exón 1 del gen *SRD5A2* con la aparición de hipospadia, una característica altamente variable en los pacientes con deficiencia 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2, tanto en los incluidos en este estudio, como en los pacientes reportados con la misma mutación alrededor del mundo. Diferentes autores han reportado que el alelo L89 está asociado a una reducción de la actividad de la enzima en aproximadamente 30%, lo que explicaría su asociación fuerte con la aparición de la hipospadia (Samtani, et al., 2010; Thai et al., 2005). Dado que los pacientes acá estudiados presentaron gran variabilidad en la posición de meato urinario se evaluó en cada uno de los mismos el polimorfismo antes mencionado. Sin embargo, todos los pacientes resultaron homocigotos para el alelo ancestral V89. Lo que sugiere que otros polimorfismos, ya sea, localizados en el mismo gen (y que no fueron detectados) o en otros genes relacionados, deben estar contribuyendo a las variaciones fenotípicas evidenciadas en nuestros pacientes.



La relación incompleta genotipo-fenotipo descrita en los pacientes con deficiencia 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2, no sólo se ha asociado a la mutación p.N193S. En efecto, en muchas otras mutaciones también se ha observado éste fenómeno. Con el fin de indagar más profundamente en éste tópico, se realizó una búsqueda intensiva entre los pacientes reportados en la literatura desde 1992 hasta el presente y se agruparon según la mutación responsable del fenotipo descrito. Los pacientes fueron clasificados según el EMS, el cual resultó muy útil para lograr estandarizar las características clínicas revisadas. El EMS fue propuesto por primera vez por Ahmed y colaboradores en el año 2000 y consiste en asignar un puntaje a las características fundamentales en los pacientes con alteraciones en el desarrollo de los genitales externos masculinos; los valores de masculinización varían en un rango entre 0 y 12, aquellos fenotipos cercanos a 12 corresponden a unos genitales masculinos y los cercanos a 0 pueden considerarse ambiguos o más femeninos. También se calculó la desviación estándar (DE) para cada grupo, éste estadístico permitió predecir cuán variable es el fenotipo para dichas mutaciones, es decir, permitió establecer la correlación entre el fenotipo de los pacientes que portaban la misma mutación.

El número de pacientes considerados en este análisis se redujo considerablemente puesto que muchos de los artículos donde se reportaban los individuos portadores de las diferentes mutaciones no exponían de manera detallada el fenotipo de los pacientes, imposibilitando su clasificación mediante el EMS.

Cuando se analizaron las diferentes mutaciones que disminuyen la afinidad de la enzima por su sustrato (testosterona), se demostró que en general, los fenotipos de los pacientes portadores de este tipo de mutación presentan valores bajos del puntaje EMS (varían entre 2,0 y 3,3) indicando un fenotipo predominantemente femenino. Resulta

interesante resaltar que en este grupo de mutaciones se encontró la mutación con menor desviación estándar, la mutación p.G115D (DE 0,55), lo que indica que en homocigosis, esta mutación parece producir fenotipos menos variables, lo que a su vez se puede traducir en una correlación genotipo –fenotipo alta (Tabla 8).

Las mutaciones que afectan el dominio de unión al NADPH de la enzima presentaron valores de EMS ligeramente superiores a los mencionados en el apartado anterior. Por lo que los fenotipos resultantes tienden a ser más masculinos. Adicionalmente, los valores de desviación estándar resultaron elevados para la mayoría de las mutaciones, este resultado apunta hacia una relación genotipo-fenotipo baja, sólo p.Y235F presentó una desviación estándar por debajo de 1 (DE, 0,95) (Tabla 9).

El último grupo de mutaciones estudiadas corresponde a aquellas que disminuyen la actividad enzimática. Es importante resaltar que los pacientes pertenecientes a este grupo presentan los fenotipos menos severos, con valores de EMS variando entre 3,0 y 8,0, lo cual puede ser atribuido a las diferentes actividades enzimáticas residuales de las diferentes mutaciones. Este grupo también se caracteriza por presentar los valores más altos de desviación estándar entre los tres grupos, así, a los pacientes portando mutaciones que pertenecen a este grupo, se dificulta mucho más establecer la correlación genotipo- fenotipo (Tabla 10).

La prueba estadística t-Student se realizó para comparar el fenotipo de los pacientes de acuerdo al efecto de la mutación en la proteína (es decir, unión de sustrato, unión de cofactor o disminución de la actividad enzimática). Cuando se compararon las mutaciones que afectan el  $k_m$  de T con aquellas que afectan el  $k_m$  del NADPH, no se encontró diferencia

estadísticamente significativa entre los valores de EMS, por lo que el fenotipo de los pacientes que portan mutaciones pertenecientes a estos dos grupos no es muy variable entre ambos. Sin embargo, cuando se compararon de manera independiente los dos grupos previamente mencionados con el tercer grupo de mutaciones que afecta la actividad enzimática, sí se obtuvieron diferencias significativas. De acuerdo a éste análisis, aunque no hay una fuerte correlación genotipo-fenotipo, el efecto de la localización de la mutación en la proteína es una variable importante a considerar, debido a que el fenotipo de los pacientes tiende a ser mucho menos severo, cuando se trata de mutaciones que disminuyen la actividad enzimática con respecto a aquellas que alteran el  $k_m$  tanto del sustrato como del cofactor. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no se han realizado análisis de este tipo en otros estudios, por lo que nuestros resultados no pueden ser contrastados.

Para finalizar esta disertación sobre la correlación genotipo-fenotipo en la deficiencia 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2, se trató de dilucidar si el origen étnico estaba relacionado con la falta de correlación entre el genotipo y el fenotipo. Samtani y colaboradores determinaron que se habían identificado mutaciones en el gen *SRD5A2*, cuya presencia era específica para algunas poblaciones, mientras que otras se distribuyen ampliamente a lo largo de todas las poblaciones mundiales (Samtani et al., 2010). Entre las mutaciones incluidas en este análisis, p.G34R y p.N160D solo han sido encontradas en poblaciones egipcias y p.L22Q en turcos. Contrariamente, las mutaciones p.G115D, p.G196S, p.R246Q y p.G246W han sido reportadas en pacientes con diferentes orígenes étnicos como: americanos, europeos, asiáticos y provenientes del Norte de India. Así, pacientes con mismo origen étnico y misma mutación presentan diferentes EMS y de forma contraria, pacientes con la misma mutación

y diferentes orígenes étnicos han presentado valores muy similares de EMS, por lo tanto, el origen étnico no parece tener un efecto relevante sobre la correlación genotipo-fenotipo.

Los individuos afectados incluidos en este estudio provienen de una población aislada localizada en los Andes Venezolanos, a 49 km de distancia de la zona poblada más cercana y a 1510 msnm. La región que constituye el foco geográfico está comprendida por un pueblo principal, Pueblo Nuevo del Sur, con unos 1200 habitantes rodeado por múltiples aldeas separadas entre sí por terrenos abruptos donde en algunos casos las vías de acceso están limitadas al uso de animales de carga. Para el estudio de la mutación en la población se estableció un foco geográfico con centro en Pueblo Nuevo y comprendía más de 20 localidades; dentro de las más pobladas encontramos: Mesa de las Palmas, Lagunillas, Los Araques, Tostós, Jají y Estanques (Fig. 9).

Dentro del foco establecido, se han detectado hasta los momentos 7 casos con deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa, lo que podría representar una prevalencia por encima de la reportada a nivel mundial. Sin embargo, todos estos casos pertenecen a familias emparentadas entre sí.

Las causas de la elevada prevalencia de una enfermedad genética, han sido asociadas al aumento de la frecuencia genotípica (homocigotos recesivos) responsable del fenotipo alterado, por la confluencia de diferentes fuerzas como la deriva génica, historia demográfica, selección natural, entre otras (Gillespie, 1998). En este caso, como se ha mencionado previamente, el foco se encuentra parcialmente aislado geográficamente, en estas condiciones un grupo pequeño de fundadores habitan una región inaccesible o en un ambiente hostil y procrean por generaciones consecutivas. Sin embargo, las poblaciones no necesitan

estar separadas geográficamente para estar aisladas. En ocasiones, sub-poblaciones permanecen aisladas de la población general debido a prácticas culturales, lenguaje, identidad tribal o nacional o religión. El aislamiento siempre tiene un impacto en la estructura genética de la población, como la reducción de la diversidad genética, a través de la deriva génica, tamaño poblacional reducido y el incremento de la consanguinidad producto de un número limitado de parejas disponibles, todo esto puede conducir a la aparición de enfermedades genéticas, en especial aquellas con un patrón de herencia autosómico recesivo (Rudan, 2006).

La genética de poblaciones se enfoca en describir la estructura genética de las poblaciones y estudiar las fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones (Gillespie, 1998). Con el fin de elucidar cuales podrían ser las fuerzas evolutivas que inciden en la población que constituye el foco de estudio, se abordó la enfermedad desde una perspectiva de genética de poblaciones. Para esto se estimó la frecuencia del alelo mutado en una muestra de la población sana y se estimó el coeficiente de consanguinidad por isonimia.

La estimación de la frecuencia del alelo mutado en la población general dentro del foco geográfico, es un dato importante para conocer el panorama epidemiológico de la enfermedad en la zona (Gialluisi et al., 2012). En el presente estudio se encontró un alelo mutado en 80 cromosomas, una frecuencia más elevada de lo esperado considerando la frecuencia mundial de la enfermedad. El tamaño muestral necesario fue estimado inicialmente en 84 individuos, sin embargo, razones presupuestarias impidieron alcanzar esa cifra. Los datos obtenidos apuntan a que la frecuencia de portadores sanos podría ser más elevada de la estimada en este estudio, debido a que se consideró una muestra poblacional pequeña (N=40).

Una hipótesis sobre el origen del alelo mutado en esta población se discutirá más adelante, sin embargo, en este punto es importante discutir las causas por las cuales la enfermedad presenta una prevalencia elevada con respecto a otras poblaciones. La causa con mayor peso que puede incrementar la frecuencia de los homocigotos es la consanguinidad; las desviaciones a lo esperado por azar de los patrones de matrimonio se han relacionado a factores geográficos, demográficos, étnicos, raciales, psicológicos, físicos y sociales (Alfaro & Dipierri, 1996). Cuando este proceso de aislamiento persiste durante varias generaciones, la principal consecuencia es el aislamiento genético, el cual podría ser interpretado en un contexto de genética de poblaciones como procesos recurrentes de endogamia y deriva genética, conduciendo a microdiferenciaciones o subdivisión en la estructura de las poblaciones (Arcos-Burgos & Muenke, 2002).

La relación entre matrimonios consanguíneos, enfermedades hereditarias y malformaciones congénitas han sido estudiadas por décadas en diferentes poblaciones. A mediados del siglo pasado en poblaciones tanto japonesas como palestinas, se asoció la alta frecuencia de mortalidad infantil con la consanguinidad. De igual manera, en la comunidad árabe israelí se asoció la consanguinidad con malformaciones congénitas (Sharkia et al, 2008).

Un factor que puede alterar la estructura genética de una población es el tamaño reducido de la misma, algunas poblaciones son lo suficientemente grandes como para ser consideradas infinitas, al menos como una primera aproximación, sin embargo, esto no siempre se cumple. En poblaciones finitas, cambios aleatorios en la frecuencia de los alelos en la población pueden ocurrir. Este fenómeno es lo que se conoce como deriva génica y ocurre de manera impredecible, fijando o eliminando alelos. A pesar de que la deriva génica

puede ocurrir en cualquier población, en poblaciones pequeñas su efecto puede ser acelerado. Por diferentes circunstancias las poblaciones pueden reducir su tamaño como: migraciones, desastres naturales o barreras geográficas que pueden aislar pequeños grupos, o como consecuencia del comportamiento humano, por ejemplo, grupos étnicos dentro de grandes poblaciones eligen pareja entre personas del mismo grupo, trayendo como consecuencia el aumento de alelos causantes de enfermedades dentro de la comunidad producto de la deriva génica (Gillespie, 1998; Lewis, 2015).

Dos situaciones pueden potenciar el efecto de la deriva génica, el efecto fundador y una población cuello de botella. El efecto fundador se presenta cuando una nueva población es establecida por unos pocos fundadores originales. Estos fundadores portan sólo una fracción del total de variación genética de la población parental. Consecuentemente, un cambio genético dado (en este contexto, un alelo mutado) encontrado en muchos miembros de la población pueden ser rastreados hasta un ancestro particular (Shalev, 2019). El efecto de la deriva génica puede entonces ocasionar que ese alelo mutado se fije en la población. Por otra parte, la población cuello de botella ocurre cuando un porcentaje elevado de individuos de una población muere y quedan unos pocos individuos disponibles para reponer los individuos perdidos. En este caso, la nueva población está constituida por aquellos alelos que solo portan los sobrevivientes, por lo que algunos alelos pueden estar más o menos representados en la nueva población (Gillespie, 1998; Lewis, 2015).

Basados en la teoría de la evolución, todos los individuos de una especie descienden de un ancestro común remoto, sin embargo, en el caso del estudio de las poblaciones actuales y el comportamiento de las enfermedades o características particulares, el ancestro común no debe ser necesariamente muy remoto para que tenga un significado en los patrones

observados. La mejor aproximación paramétrica para establecer la existencia de aislamiento genético es determinar los patrones de homocigosis-heterocigosis exhibidos por una población. Poblaciones con alto grado de consanguinidad presentan una frecuencia elevada de genotipos homocigotos y consecuentemente, una disminución de la heterocigosis (Arcos-Burgos & Muenke, 2002).

Como una aproximación estadística a la distribución de homocigosis-heterocigosis fue propuesto el coeficiente de consanguinidad ( $F$ ) en 1922, el cual puede ser calculado a partir de genealogías o de cualquier otro sistema de apareamiento regular. La definición genética de la consanguinidad indica uniones contraídas entre personas biológicamente relacionadas como primos segundos o más cercano ( $F \geq 0,0156$ ) (Fareed & Afzal, 2017).

En este estudio la consanguinidad del foco geográfico fue investigada mediante el modelo de isonimia. Los apellidos representan entidades identificadoras de personas, grupos o etnias en las poblaciones. Así mismo, los apellidos tienen características que los han convertido en una herramienta útil para estudios biológicos, como: son universales, se transmiten con un patrón regular y existen registros oficiales de dicha información (Pinto-Cisternas & Castro de Guerra, 1988). La relación entre consanguinidad e isonimia depende en gran medida de las siguientes premisas: (a) todos los apellidos en la población son transmitidos regularmente y sus posibles desviaciones (ilegitimidad, adopción, cambio de nombre, etc.) son insignificantes; (b) ningún tipo de relación entre primos es promovida o prohibida; (c) ningún sexo está desproporcionalmente representado entre migrantes; (d) la media máxima de coeficiente de consanguinidad es 0,25, debido a que el método de isonimia no se aplica a matrimonios en los cuales las partes son hermanos; y más importante, (e) la isonimia refleja un ancestro común (monofiléticos). El uso de los apellidos para cálculos de



consanguinidad ha sido ampliamente discutido. Las principales ventajas resultan de las condiciones propias de los apellidos como: son de fácil acceso y la disponibilidad de la información en los distintos registros es rápida, simple, económica y segura, además de ser pública (Pinto-Cisternas & Castro de Guerra, 1988).

Mediante el uso de los registros del Consejo Nacional Electoral del país, se obtuvieron los datos de los apellidos de las personas registradas en el CNE pertenecientes a Pueblo Nuevo del Sur y todas las aldeas aledañas. Según el método de isonimia, F resultó 0,0178 para el año 2012, este valor de consanguinidad está por encima a lo esperado si todos los habitantes del pueblo estuviesen relacionados en cuarto grado (primos segundos con  $F=0,0156$ ). El valor de F elevado podría explicar la prevalencia de una enfermedad autosómica recesiva como la deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2, el cual como se ha mencionado es mucho mayor a la prevalencia mundial. Al comparar la frecuencia de los apellidos más representados en la zona de estudio entre los años 2012 y 1991 se observó que los principales apellidos que contribuyen con el valor de F son: Márquez, Fernández, Guillén, Gutiérrez y Contreras (Tabla 11), y no se observó cambios en la frecuencia entre los años antes mencionados, lo que podría destacar el hecho de que la consanguinidad por isonimia no ha variado ampliamente en los últimos 20 años. González-Coira y Rodríguez Larralde (1998) hicieron un muestreo en 521 donantes del Banco de Sangre del Hospital Universitario de Los Andes, con cuatro abuelos nacidos en el Estado Mérida. El Coeficiente de consanguinidad total ( $F_t$ ) estimado por isonimia resultó 0,011, cifra ésta elevada y sólo comparable con poblaciones aisladas, con un tamaño efectivo poblacional pequeño (fundadas con un número pequeño de individuos), como San Antonio de Los Altos (Castro de Guerra y Zambrano, 1997) y Colonia Tovar (Pineda et. al. 1985). Así mismo los apellidos más frecuentes fueron:

Peña, Márquez y Rojas. Esta información corrobora que el Estado Mérida presenta una elevada tasa de individuos isonímicos, también reportado por Rodríguez-Larralde et al 1993, donde señala a Mérida y Nueva Esparta como los dos estados del país con la mayor isonimia producto del aislamiento geográfico.

Es importante resaltar que a través del método por isonimia se demostró en múltiples oportunidades una sobreestimación del coeficiente de consanguinidad en las poblaciones. La mayoría de los estudios realizados en poblaciones occidentales atribuyen la sobreestimación por el origen polifilético de los apellidos. Friedl y Ellis en 1974 compararon el coeficiente de consanguinidad (genealógico y por isonimia) en una población de Suiza, encontraron que por el método de isonimia se sobreestimaba el coeficiente de consanguinidad alrededor de 5 veces. Por otra parte, un estudio realizado en población china de Singapur en 1980, se encontró una sobreestimación de alrededor de 40 veces del coeficiente de consanguinidad mediante este mismo método. En este trabajo se descartó el origen polifilético de los apellidos, puesto que éstos en la cultura china pueden rastrearse por más de 30.000 años de antigüedad, y propusieron que el bajo grado de consanguinidad en una población y con un pequeño número de apellidos, pueden generar de igual manera, un sesgo en el cálculo del coeficiente de consanguinidad por isonimia (Tay & Yip, 1984). No obstante, en un trabajo realizado por Castro de Guerra y colaboradores en 1990 se compararon dos poblaciones de Venezuela, Birongo, población fundada por afrodescendientes esclavos que escapaban de las plantaciones de cacao, por lo que era aislada, y La Sabana, una población de la costa fundada por afrodescendientes libres que se consideraba poco aislada y demostraron que el coeficiente de consanguinidad estimado por el método de isonimia y el coeficiente de consanguinidad genealógico era más discrepante en La Sabana. Por lo cual, propusieron que en poblados

aislados geográficamente el método de isonimia sobreestima en menor grado el valor real de consanguinidad (Castro de Guerra et al., 1990). Puesto que la población en estudio se encuentra parcialmente aislada en la actualidad, se podría considerar que el valor del coeficiente de consanguinidad calculado por isonimia podría resultar una aproximación bastante certera a la real en el foco.

En Venezuela se ha utilizado en diversos estudios el método de isonimia para realizar aproximaciones sobre la estructura de las diferentes regiones del país. Rodríguez-Larralde y Barraí realizaron estos estudios en los estados Anzoátegui, Trujillo, Guárico y el Zulia. En el estado Guárico se analizaron los apellidos de los datos suministrados por el CNE de las 32 parroquias y demostraron que las parroquias Santa Rita, Espino, El Calvario, Ortiz y Santa María de Ipire son las más aisladas del estado (Rodríguez-Larralde & Barraí, 1997). Por otra parte, en el Zulia se realizó un estudio similar en las 81 parroquias del estado y se demostró que las parroquias más aisladas son la Guajira venezolana y las regiones al sur del Lago de Maracaibo, adicionalmente, en esta región se identificaron 8 apellidos con distribución focal, Almarza, Badell, Bastidas, Bohórquez, Cardozo, Carmona, Espina y Matos, por lo tanto, los portadores de estos apellidos tienen una alta probabilidad de provenir de las parroquias donde están focalizados (Rodríguez-Larralde & Barraí, 1998).

El enfoque básico para caracterizar patrones y diferencias de los polimorfismos genéticos entre poblaciones es mediante la disquisición de la estructura genética de las poblaciones, la cual es determinada por la estructura de los alelos, es decir, determinar la distribución de la frecuencia de los genotipos para un locus o loci (Arcos-Burgos & Muenke, 2002).

El principal estadístico utilizado para determinar la estructura de las poblaciones es el estadístico  $F$  de Wright. Para calcularlo se requiere definir los grupos de individuos y luego usar sus genotipos para establecer las frecuencias alélicas. En la actualidad se han descrito dos tipos de métodos para agrupar los individuos: Métodos basados en distancias, los cuales no asumen estructura predefinida, estos métodos usan las distancias entre individuos y algoritmos como “Neighbour joining”, para construir árboles agrupando los individuos en clústeres. También se han aplicado métodos basados en modelos, utilizando la inferencia bayesiana para delinear los diferentes clústeres de individuos con base en sus genotipos. El programa Structure fue desarrollado para este propósito (Evanno et al., 2005).

Con el objetivo de identificar el origen parental ancestral de la mutación encontrada en el foco geográfico de estudio se utilizó un primer enfoque metodológico mediante un análisis filogenético, usando un método basado en distancias empleando el programa de Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA versión 6 (Tamura et al., 2013), el cual compara secuencias de ADN o proteínas para inferir los patrones de evolución molecular en genes, genomas y especies a lo largo del tiempo. En este análisis se incluyó la información de individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones consideradas parentales y la de los pacientes. Sin embargo, los resultados obtenidos eran inexactos y dependían de los individuos incluidos en el análisis, por lo que se consideró otro enfoque para el estudio.

Tras una exhaustiva revisión se concluyó que la mejor forma de elucidar la estructura de la población en estudio, era mediante métodos basados en modelos. Para esto usamos dos programas diferentes. Inicialmente empleamos el programa Structure versión 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), un programa de acceso libre que utiliza el genotipo de múltiples loci para investigar la estructura de la población, incluyendo SNP. El programa arroja las estructuras

poblacionales más probables con diferentes números de clústeres ( $k$ ), mediante la estimación de la probabilidad logarítmica de los datos  $\Pr(X|K)$  para cada valor de  $k$ , permitiendo de esta manera, la estimación de cuán probable es que un individuo pertenezca a una población dada. Sin embargo, es necesario identificar el  $k$  de mayor probabilidad, para esto se empleó el programa Structure Harvester (Earl et al., 2012), y usando el método de Evanno se calculó el número de clúster más probable, y se seleccionó el gráfico de triángulo similar con  $\text{LnP}(k)$ . El  $k$  más probable según el análisis fue 4, por lo que el gráfico en triángulo que define con mayor probabilidad la estructura de los individuos que estamos estudiando es el que se sugiere en la tabla 12. En la figura 15 se puede apreciar que los individuos de origen africano forman un clúster bien diferenciado en el vértice izquierdo del triángulo (puntos rojos), el resto de los individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones de referencia y nuestros pacientes se distribuyeron en un gran grupo en el centro del triángulo, lo que significa que el valor de membresía del resto de los individuos en los otros tres clústeres probables, es bajo. De éste resultado se pueden inferir varias conclusiones, a primera vista se podría asumir que el origen parental de la mutación es europeo puesto que nuestros pacientes (puntos naranjas señalados con una flecha) se agrupan junto con los europeos (puntos turquesa, amarillo y morados). Sin embargo, los mejicanos y colombianos (puntos azul y verde) se distribuyen de la misma forma con los europeos. Considerando que estas poblaciones son mestizas, suponemos que el componente amerindio no puede ser separado con la información utilizada en el análisis. Ésta tendencia puede ser resultado del reducido número de SNP incluidos en nuestro estudio y de los MAF (de las siglas en inglés *minor allele frequency*) de los SNP seleccionados con valores cercanos a 0,5 en todas las poblaciones. Estos valores resultan favorecedores para la construcción de haplotipos intrafamiliares y observar la segregación en fase con una mutación, pero para inferir orígenes étnicos puede resultar poco informativo;

para éste propósito se recomienda usar SNP con MAF diferenciadores en las poblaciones de referencia.

El programa Structure también arroja como resultado la tabla de los valores Q de población, la cual presenta la proporción calculada de memberships de cada población predefinida en cada clúster predicho. Con esta tabla se realizó un análisis de componentes principales. En la figura 16 se presenta la distribución de todas las poblaciones incluidas en el análisis, y se puede observar que tanto la población Yoruba como los pacientes estudiados (Venezuela) se distribuyeron en componentes diferentes al resto de las poblaciones de referencia. La población Yoruba según los datos extraídos del proyecto 1000 Genomas presenta un haplotipo francamente diferente al resto de las poblaciones, por lo que se puede descartar ese origen étnico de la mutación en la población merideña estudiada. Por otro lado, el haplotipo en fase con la mutación (G;T;G;A;T) en los pacientes venezolanos es uno de los haplotipos reportados para las otras poblaciones de referencia incluidas en el estudio, es decir, caucasoides (española, italiana e inglesa) y mestizas (colombiana y mexicana), en las que adicionalmente se reportó también el haplotipo C;C;A;C;C y el haplotipo en heterocigosis, C/G;T/C;G/A;A/C;T/C (sin que se especifique la fase), que pudiera corresponder a la combinación de ambos haplotipos antes mencionados. No obstante, según el análisis realizado, los pacientes venezolanos son más cercanos a los españoles que al resto de las poblaciones de referencia, por lo que se puede proponer que este haplotipo está ligeramente más representado en la población española con respecto a las otras poblaciones de referencia. En éste análisis no se incluyó la población asiática como referencia puesto que distorsionaba la distribución del resto de las poblaciones, haciendo la separación de las mismas menos

evidente. Por lo tanto, considerando que dicha población no representa una población parental de la población en estudio se consideró innecesario incluirla.

Cabe destacar que los SNP seleccionados se distribuyen en una región que no supera los 30 Kb; estudios detallados sobre recombinación han mostrado que ésta ocurre en puntos calientes, los cuales en el genoma humano representan unos 30000, y ocurren típicamente cada 50 a 100 Kb a lo largo de todo el genoma, lo que a su vez separa el genoma en bloques con un fuerte desequilibrio de ligamiento. En vista de esto, se seleccionó una región de menor longitud que redujera la probabilidad de recombinación dentro de la zona estudiada (Strachan & Read, 2018). A pesar de que podría parecer que un número reducido de SNP fueron incluidos en este estudio, mediante los datos proporcionados por HapMap se logró corroborar que existe menos variabilidad que la esperada entre los genomas por número de SNP. Por ejemplo, en un bloque con 70 SNP, se esperaba encontrar  $2^{70}$  combinaciones diferentes, pero en la práctica, en promedio se encuentran menos de 5 combinaciones o haplotipos por bloque, que representan el 93% de las combinaciones totales encontradas en las poblaciones. Esta carencia de variabilidad significa que la mayoría de las variaciones comunes pueden ser capturadas por un número pequeño de SNP, por lo que haber empleado un haplotipo con un mayor número de SNP no necesariamente modificaría los resultados obtenidos (Strachan & Read, 2018). A medida que la estrategia de abordaje de este campo migró de un análisis basado en microarreglos a secuenciación masiva, un panorama más completo sobre las variaciones en el genoma emergió y a su vez, se identificaron variaciones menos frecuentes en el genoma lo que proporcionó información detallada de las variaciones de las secuencias de ADN dentro y entre las poblaciones. Las variantes menos frecuentes parecen haber aparecido más recientemente que aquellos SNP comunes. Los bloques de haplotipos con

desequilibrio alélico que tienen menor longitud reflejan mayor ancestralidad y su estructura provee importantes datos sobre la evolución humana. Cada generación produce nuevas oportunidades para recombinación e incorporación de mutaciones nuevas, por lo que en poblaciones más antiguas los bloques son más cortos, pero más diversos y en las poblaciones más jóvenes los bloques son más largos. Los bloques más cortos y con un número promedio mayor de haplotipos comunes fue reportado en nigerianos comparados con europeos y asiáticos del este, un fenómeno consistente con la hipótesis de salida de África de la evolución humana; mientras que haplotipos más largos de lo usual pueden ser evidencia de selección direccional (Strachan & Read, 2018). Los resultados obtenidos en nuestro análisis corresponden a lo expuesto anteriormente, el haplotipo de los Yoruba es más corto que el resto de las poblaciones europeas, mestizas y los pacientes venezolanos, por lo que se puede proponer un origen más antiguo de la región cromosómica donde están los SNP estudiados en Yorubas. Con respecto a los pacientes incluido en este estudio, los cuales portan un haplotipo reportado para las poblaciones europeas y mestizas (bloques de igual longitud) podría proponerse una ancestralidad común.

El segundo programa utilizado fue GenAIEx 6.502 (Peakall R & Smouse, 2012; Peakall R & Smouse P, 2006), el cual permite realizar un amplio rango de estudios de genética molecular de poblaciones en un ambiente de Microsoft Excel. La distancia genética entre genotipos con base en la frecuencia de los alelos entre las diferentes poblaciones reveló una diferencia obvia entre los haplotipos de la población que usamos de referencia para África (Yoruba) y las asiáticas (Japón y sur de China) formando dos grupos totalmente diferentes (Figura 17). Los europeos junto con los americanos forman un grupo aparte exceptuando la población de Perú que se asemeja un poco a los japoneses, posiblemente



debido a la gran ola de migración de japoneses a este país para finales del siglo XIX (Figura 17). Sin embargo, es importante recalcar que serían necesarios más datos para separar las poblaciones europeas de las americanas en este contexto. El haplotipo de los pacientes es similar al clúster de los americanos y europeos, y este resultado es apoyado por los registros históricos de la fundación de los Pueblos del Sur, donde un grupo de españoles se asentaron a mediados del siglo XIX en la región, con el objetivo de explorar y explotar minas de piedras preciosas ubicadas en la zona (Porras, 1995).

Se emplearon dos programas con aproximaciones diferentes (Structure y GenAIEx) para determinar la estructura de la población y de esa forma poder acercarse de una manera certera a explicar el origen de la mutación en el foco estudiado; ambos métodos arrojaron resultados similares: los pacientes estudiados se distribuyeron cercanos a la población española de referencia. Por lo que a pesar de que se contó con un número limitado de marcadores para construir los haplotipos, los resultados obtenidos parecen ser consistentes y suficientes para, esbozar un panorama general de lo que podría haber ocurrido en el foco.

Por otra parte, el análisis de AMOVA realizado a partir de la matriz de distancia genética mostró que el 58% de la variación existe entre las poblaciones y un 42% de varianza dentro de las poblaciones (Figura 18), señalando la existencia de estructura entre las diferentes poblaciones basados en los datos disponibles en el proyecto 1000 Genomas. La inferencia de la estructura de la población a partir de datos genéticos es frecuentemente empleada para entender los procesos demográficos y evolutivos experimentados por las poblaciones (Greenbaum et al., 2016). Sin embargo, las diferencias porcentuales entre la distancia encontrada entre poblaciones y dentro de las poblaciones no son suficientemente marcadas (58% y 42% respectivamente), para concluir sobre la relación genética con el resto

de las poblaciones comparadas, sugiriendo que los resultados podrían estar sesgados por el número muy pequeño de pacientes incluidos en el análisis. Considerando esto, la hipótesis de un origen independiente de la mutación dentro de la población requeriría mayor número de datos que hagan más robusto este resultado.

Es importante destacar que en la población del Estado Mérida se han estudiado diversos marcadores genéticos para estimar el porcentaje de mezcla étnica, encontrándose en general un elevado componente europeo, reportándose el mayor porcentaje de Rh negativo y del grupo sanguíneo A de todo el país (González-Coira et al. 1997; Rodríguez-Larralde et al. 2001); del alelo PI\*Z de alfa-1-antitripsina (Fonseca-Pérez et al. 1996) y de la variante alélica ALA213/VAL213 de PI\*M1 (Fonseca-Pérez et al. 2009); y a través de marcadores de ADN (STR) (Avendaño et al. 2010).

Los resultados obtenidos no son concluyentes, aunque permiten proyectar un escenario con una mayor probabilidad de ocurrencia sobre el origen de la mutación en la población; la falta de información sobre los haplotipos en la población sana originaria del foco geográfico de la enfermedad es una limitación importante del presente estudio, que influyó sobre la certeza de identificación del origen parental de la mutación y el subsecuente mecanismo evolutivo involucrado en la fijación de la mutación.

Adicionalmente, el origen de la mutación podría ser dilucidado mediante la comparación de haplotipos en fase de pacientes portadores de la misma mutación provenientes de otras poblaciones y de esa forma se podría corroborar si la mutación fue introducida en el foco o se originó en el lugar. Lamentablemente hasta donde alcanza nuestro conocimiento no se ha publicado información alguna sobre esto.

Con éstos resultados se podría proponer el escenario más plausible, en el cual, mediante un efecto fundador en la población, es decir, portadores sanos de la mutación de origen español incorporaron el alelo a la población y factores evolutivos actuando concomitantemente como la deriva génica, el reducido tamaño poblacional, el aislamiento relativo y la endogamia de la población mantienen la alta frecuencia de heterocigotos encontrada en este estudio. De esta manera, y en concordancia con la historia de la fundación de los pueblos que constituyen el foco geográfico, se podría explicar la cercanía del haplotipo de los pacientes a los identificados en la población española.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## 9. CONCLUSIONES

1.- La deficiencia de 5- $\alpha$ -reductasa tipo 2 es una alteración del desarrollo sexual masculino poco frecuente, sin embargo, en el estado Mérida se detectó un foco con una prevalencia mayor a la reportada a nivel mundial.

2.- El análisis molecular del gen *SRD5A2* en los pacientes permitió la identificación de la mutación causante de la alteración, p.N193S, detectada en cada uno de los pacientes en condición de homocigosis.

3.- La relación genotipo-fenotipo en esta alteración resulta complicada de establecer, inclusive, tratando con pacientes con un elevado coeficiente de consanguinidad

4.- Los pacientes presentaron diferencias en la masculinización de los genitales externos, variando principalmente en la posición de las gónadas y la ubicación del meato urinario. Esto, conduce a proponer que deben existir otros genes o mecanismos moleculares que estén modulando la expresión del fenotipo en cada paciente. Para discernir este punto, sería necesario la aplicación de técnicas de secuenciación masiva para explorar el genoma.

5.- Mediante una revisión exhaustiva de las publicaciones sobre la relación genotipo-fenotipo se determinó que mutaciones como p.G115D producen fenotipos menos variables, por lo que establecer la relación genotipo-fenotipo resulta más fácil, mientras que, mutaciones como p.L55Q, p.Y91H y p.N160D producen fenotipos muy variables dificultando el establecimiento de la relación.

6.- El estudio de la relación genotipo – fenotipo permitió demostrar que aquellas mutaciones que afectan la actividad enzimática, producen fenotipos más masculinos que aquellas mutaciones que alteran el *km* para la T y el NADPH.

7.- La relación fenotipo-genotipo no parece estar afectada por el origen étnico de los pacientes.

8.- Conocer la frecuencia de la mutación dentro del foco geográfico, resulta de gran importancia para conocer la epidemiología de la enfermedad en la zona. La frecuencia encontrada fue 1 en 80 cromosomas, frecuencia elevada con respecto a la reportada a nivel mundial. Sin embargo, debido a una detección incompleta en la población del foco, la estimación de esta frecuencia pudiera estar sub-valorada.

9.- La consanguinidad en la población, como factor que influye en el aumento de la frecuencia de enfermedades recesivas, fue evaluada en el foco geográfico mediante el método de isonimia, y se obtuvo un valor elevado de 0,0178.

10.- El análisis de la estructura poblacional mediante dos aproximaciones estadísticas diferentes expuso un origen ancestral cercano entre los pacientes incluidos en el estudio y la población española de referencia, lo cual podría estar apoyado por los registros históricos.

11.- El efecto fundador en conjunción con el alto coeficiente de consanguinidad detectado en el foco, podrían explicar la prevalencia elevada de la enfermedad, no obstante, se requiere ampliar el análisis para corroborar este resultado.

## 10. REFERENCIAS

Adzhubei, I., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A., & Sunyaev, S. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7,248-249.

Ahmadifard, M., Kajbafzadeh A., Panjeh-Shahi, S., Vand-Rajabpour, F., Ahmadi-Beni, R., Arshadi, H., Setoodeh, A., Rostami, P., Tavakkoly-Bazzaz, J., & Tabrizi, M. (2019). Molecular investigation of mutations in androgen receptor and 5-alpha-reductase-2 genes in 46,XY Disorders of Sex Development with normal testicular development. *Androl*, 51(5), e13250.

Ahmed, S. F., Bashamboo, A., Lucas-Herald, A., & McElreavey, K. (2013). Understanding the genetic etiology in patients with XY DSD. *Brit Med Bull*, 106(1), 67–89.

Ahmed, S. F., Khwaja, O., & Hughes, I. A. (2000). The role of a clinical score in the assessment of ambiguous genitalia. *BJU International*, 85(1), 120–124.

Akcaay, T., Fernandez-Cancio, M., Turan, S., Gran, T., Audi, L., & Bereket, A. (2014). AR and SRD5A2 gene mutations in a series of 51 Turkish 46,XY DSD children with a clinical diagnosis of androgen insensitivity. *Androl*, 2(4),572–578.

Alfaro, E., & Dipierri, J.E. (1996). Isonimia, endogamia, exogamia, y distancia marital en la Provincia de Jujuy. *Rev Argen Antropol Biol*, 1(1), 41-56.

Álvarez-Nava, F., González-Ferrer S., & Soto M. (1998). Diagnóstico y manejo de pacientes con anomalías de la diferenciación sexual, Experiencia de la Unidad de Genética de La Universidad del Zulia, Maracaibo Venezuela. *Invest Clin*, 39,273-292.

Álvarez G., Parra M., Farías, A., & Velásquez M. (2011). Disgenesia gonadal parcial 46,XY, a propósito de un caso. *Rev Venez Endocrinol Metab*, 10,111.

Alikaşifoğlu, A., Vurallı, D., Hiort, O., Gönç, N., Özön, A., & Kandemir, N. (2015). Severe undervirilization in a 46,XY case due to a novel mutation in HSD17B3 gene. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 7(3), 249–252.

Andersson, S., Berman, D. M., Jenkins, E. P., & Russell, D. W. (1991). Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*, 354(6349), 159–161.

Andersson, S., & Russell, D. W. (1990). Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases. *Proc Natl Acad Sci*, 87(10), 3640–3644.

Andersson, S., Bishop, R. W., & Russell, D. W. (1989). Expression Cloning and Regulation of Steroid 5 $\alpha$ -Reductase, an Enzyme Essential for Male Sexual Differentiation. *J Biol Chem*, 264(27), 16249–16255.

Arcos-Burgos, M., & Muenke, M. (2002). Genetic of population isolates. *Clin Genet*, 61, 233-247.

Arias, S. (1994). Selective detection among the high risk populations, instead of mass screening, proposed for countries with various homogeneous origins and stratified distribution of abnormal genes. *N Hor Neonatal Screen*, 1041, 97–108.

Auchus, R., & Miller, W. (2012). Defects in androgen biosynthesis causing 46,XY disorders of sexual development. *Sem Reprod Med*, 30(5), 417–426.

Avendaño, A., Rodríguez-Larralde, A., & González-Coira, M. (2010). Análisis genético-molecular de nueve marcadores de ADN (STRs autosómicos) en la población de Los Nevados del Estado Mérida-Venezuela. XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica ALAB. Bogotá, Colombia.

Azzouni, F., Godoy, A., Li, Y., & Mohler, J. (2012). The 5 alpha-reductase isozyme family, a review of basic biology and their role in human diseases. *Adv Urol*, 2012(1), 530121.

Baldinotti, F., Majore, S., Fogli, A., Marrocco, G., Ghirri, P., Vuerich, M., Tumini, S., Boscherini, B., Vetri, M., Scommegna, S., Rinaldi, R., Simi, P., & Grammatico, P. (2008). Molecular characterization of 6 unrelated Italian patients with 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency. *J Androl*, 29(1), 20–28.

Bassam, B., & Gresshoff, P. (2007). Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nat Prot*, 2(11), 2649-2654.

Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2013). Gene Mutations Associated with Anomalies of Human Gonad Formation. *Sex Devel*, 7(1–3), 126–146.

Bashamboo, A., & Mcelreavey, K. (2016). Mechanism of Sex Determination in Humans : Insights from Disorders of Sex Development. *Sex Devel*, 10, 313–325.

Berra, M., Williams, E. L., Muroi, B., Creighton, S. M., Honour, J. W., Rumsby, G., & Conway, G. S. (2011). Recognition of 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency in an adult female 46XY DSD clinic. *Eur J Endocrinol*, 164(6), 1019–1025.



Birk, O. S., Casiano, D. E., Wassif, C. A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., Griberg, A., Huang, S., Kreidberg, J. A., Parker, K. L., Forbes, P., & Westphal, H. (2000). The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature*, 403(6772), 909–913.

Boudon, C., Lumbroso, S., Lobaccaro, J. M., Szarras-Czapnik, M., Romer, T. E., Garandeau, P., Montoya, P., & Sultan, C. (1995). Molecular study of the 5 alpha-reductase type 2 gene in three European families with 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Met*, 80(7), 2149–2153.

Bouma, G. J., Washburn, L. L., Albrecht, K. H., & Eicher, E. M. (2007). Correct dosage of *Fog2* and *Gata4* transcription factors is critical for fetal testis development in mice. *Proc Natl Acad Sci*, 104(38), 14994–14999.

Bowles, J., Schepers, G., & Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX Family of Developmental Transcription Factors Based on Sequence and Structural Indicators. *Develop Biol*, 255, 239–255.

Brandt, B., Greger, B., Yandell, D., Passarge, E., & Horsthemke, B. (1992). A simple and nonradioactive method for detecting the Rb1.20 DNA polymorphism in the retinoblastoma gene. *Am J Hum Genet*, 51, 1450-1451.

Caldas Ferraz, L. F., Guerra, G., Baptista, M. T., Maciel-Guerra, A. T., & Hackel, C. (1998). Detection of Gly-196-Ser mutation in 5alpha-reductase type II gene in a Brazilian patient with female assignment and behavior. *J Pediatr Endocrinol Met*, 11(3), 465–466.

Carlson, B. (2009). *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 4<sup>o</sup> Edición. Editorial Elsevier - Mosby, pp.416.

Castro de Guerra, D., Pinto-Cisternas, J., & Rodriguez-Larralde, A. (1990). Inbreeding as measured by isonymy in two Venezuelan populations and its relationship to other variables. *Hum Biol*, 62(2), 269-278.

Castro de Guerra, D., & Zambrano, O. (1997). Los Canarios de San Antonio de los Altos, Edo Miranda, Venezuela. Aislamiento y uniones matrimoniales entre los años 1900 a 1981. *Acta Cient Venez*, 48, 167-172.

Cavalli-Sforza L., & Bodmer W. (1971). *The Genetics of Human Populations*. WH Freeman and Company. San Francisco. USA.

Chan, A., But, M., Lee, Y., Lam, Y., Ng, K., Tung, J, Kwan, E., Chan, Y., Tsui, T., Lam, A., Tse, W., Cheung, P., & Shek, C. (2013). Diagnosis of 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency: Is measurement of dihydrotestosterone essential?. *Clin Chem*, 59(5), 798–806.

Chassot, A., Ranc, F., Gregoire, E. P., Roepers-Gajadien, H. L., Taketo, M. M., Camerino, G., Rooij, D., Schedl, A., & Chaboissier, M. C. (2008). Activation of  $\beta$ -catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Gen*, 17(9), 1264–1277.

Cheng, J., Lin, R., Zhang, W., Liu, G., Sheng, H., Li, X., Zhihong, Z., Mao, X., & Liu, L. (2015). Phenotype and molecular characteristics in 45 Chinese children with 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency from South China. *Clin Endocrinol*, 83(4), 518–526.

Cheon, C. K. (2011). Practical approach to steroid 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency. *Eur J Pediatr*, 170(1), 1–8.

Clark, D., Pazdernik, N. & McGehee, M. (2019). *Molecular Biology*. Tercera Edición, Editorial Academic Press, pp.168.

Cools, M., Looijenga, L., Wolffenbuttel, K., & Drop, S. (2009). Disorders of sex development: Update on the genetic background, terminology and risk for the development of germ cell tumors. *World J Pediatr*, 5(2), 93–102.

Cooper, D. & Youssoufian, H. (1988). The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet*, 78: 151-155.

Costa, E. F., Domenice, S., Sircili, M., Inacio, M., & Mendonca, B. (2012). DSD due to 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency - From diagnosis to long term outcome. *Sem Reprod Med*, 30(5), 427–431.

Cotinot, C., Pailhoux, E., Jaubert, F., & Fellous, M. (2002). Molecular genetics of sex determination. *Sem Reprod Med*, 20 (3), 157-167.

Cox, J. J., Willatt, L., Homfray, T., & Woods, C. G. (2011). A SOX9 duplication and familial 46,XX developmental testicular disorder. *N Eng J Med*, 364(1), 91–93.

Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A., & Pilia, G. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inverses syndrome. *Nature Gen*, 27(2), 159–166.

Crow, J. & Mange, A. (1965). Measurement of inbreeding from the frequency of marriages between persons of the same surname. *Eugen Quart*, 12(4):199-203.

Deeb, A., Suwaidi, H. Al, Ibukunoluwa, F., & Attia, S. (2016). Phenotype, Sex of Rearing, Gender Re-Assignment, and Response to Medical Treatment in Extended Family Members with a Novel Mutation in the SRD5A2 Gene. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 8(2), 236–240.

Di Marco, C., Bulotta, A., Varetti, C., Dosa, L., Michelucci, A., Baldinotti, F., Meucci, D., Castagnini, C., Los Rizzo, C., Di Maggio, G., Simi, P., Mari, F., ertelloni, S., Rinieri, A., & Messina, M. (2013). Ambiguous external genitalia due to defect of 5- $\alpha$ -reductase in seven Iraqi patients: Prevalence of a novel mutation. *Gene*, 526(2), 490–493.

Earl, D & vonHoldt, B. (2012). Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Cons Genet Res*, 4,359-361.

Eggers, S., Ohnesorg, T., & Sinclair, A. (2014). Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nature Rev Endocrinol*, 10(11), 673–683.

Eid, W., & Biason-lauber, A. (2016). Why Boys Will Be Boys and Girls Will Be Girls : Human Sex Development and Its Defects. *Birth Defects Res*, 108(4), 365–379.

Eid, W., Opitz, L., & Biason-Lauber, A. (2015). Genome-Wide Identification of CBX2 Targets: Insights in the Human Sex Development Network. *Mol Endocrinol*, 29(2), 247–257.

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*,14,2611-2620.

Fareed, M & Afzal, M. (2017). Genetics of consanguinity and inbreeding in health and disease. *Annal Hum Biol*, 44, 99-107.

Fernández-Cancio, M., Audí, L., Andaluz, P., Torán, N., Piró, C., Albisu, M., ... Carrascosa, A. (2011). SRD5A2 gene mutations and polymorphisms in Spanish 46,XY patients with a disorder of sex differentiation. *Int J Androl*, 34(6 Pt 2), e526-35.

Fernández-Cancio, M., Esteban, C., Andaluz, P., Rodríguez, J., Piró, C., Albisu, M., Torán, N., Carrascosa, A., Blanco, A., Granada, M., Marco, M., & Audi, L. (2005). SRD5A2 gene Q126R exon 2 point mutation in unrelated Spanish male pseudohermaphrodite patients. *Int J Human Dev*, 4(2), 71–76.

Fonseca-Pérez, T., González-Coira, M., & Arias, S. (1996). PI locus (alpha-1-antitrypsin) allelic frequencies in an Andean Venezuelan population. *Gene Geogr*, 10, 65-74.

Fonseca-Pérez, T., Arias, S., González, M., & Pérez, E. (2009). Allelic frequencies for ALA213/VAL213 polymorphism of the PI (alpha-1-antitrypsin) locus in a mountainous region of Mérida-Venezuela. Estimation of the Caucasoid contribution. *Saber*, 21, 20-26

Ford, C., & Jones, K. (1959). A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *The Lancet*, 1(7075), 711–713.

Friedl, J. & Ellis, W. (1974). Inbreeding, isonymy and isolation in a Swiss community. *Hum Biol*, 46, 699-712.

Gialluisi, A., Pippucci, T., Anikster, Y., Ozbek, U., Medlej-Hashim, M., Mégarbané, A., Romeo, G. (2012). Estimating the allele frequency of autosomal recessive disorder through mutational records and consanguinity: The homozygosity index (HI). *Annal Hum Genet*, 76, 159-167.

Gillespie, J. (1998). Population genetics: a concise guide. Primera Edición. The Johns Hopkin University Press, pp.19-47.

González-Coira, M., Mora, J.C., Sepúlveda, S., Cuevas, J., Pérez, J., Román, D., & Velázquez N. (1997). Evolución temporal "aparente" de la frecuencia génica de los sistemas sanguíneos ABO y Rh en una población de Mérida, Venezuela. In: VII Congreso Venezolano de Genética. Maracaibo: Av. Genét. VII, 270.

González-Coira, M., & Rodríguez-Larralde, A. (1998). Estimación del Coeficiente de Parentesco a través de Isonimia en una muestra con cuatro abuelos nacidos en el Estado Mérida, Venezuela. V Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica. La Habana, Cuba.

Gottlieb, B., Beitel, L., Nadarajah, A., Paliouras, M., Trifiro, M. 2012. The androgen receptor gene mutation database:2012 update. *Hum Mutat*, 33(5), 887-894

Greenbaum, G., Templeton, A. & Bar-David, S. (2016). Inference and analysis of population structure using genetic data and network theory. *Genetics*, 202: 1299-1312.

Gui, B., Song, Y., Su, Z., Luo, F., Chen, L., Wang, X., Chen, R., Yang, Y., Wang, J., Zhao, X., Fan, L., Liu, X., Wang, Y., Chen, S., Gong, C. (2019). New insight into 5 $\alpha$ -reductase type 2 deficiency based on a multi-centre study: regional distribution and genotype-phenotype profiling of SRD5A2 in 190 Chinese patients. *J Med Genet*, 56, 685-602.

Gunes, S. O., Mahmutoglu, A. M., & Agarwal, A. (2016). Genetic and Epigenetic Effects in Sex Determination. *Birth Def Res*, 108(C), 321–336.

Hackel, C., Eduardo, L., Oliveira, C., Fabio, L., Ferraz, C., Oliveira, M., Nunes, D., Toralles, M., Stuchi-Perez, E., & Guerra-Junior, G. (2005). New mutations, hotspots, and founder effects in Brazilian patients with steroid 5  $\alpha$  -reductase deficiency type 2. *J Mol Med*, 83(7), 569–576.

Hiort, O., Willenbring, H., Albers, N., Hecker, W., Engert, J., Dibbelt, L., & Sinnecker, G. (1996). Molecular genetic analysis and human chorionic gonadotropin stimulation tests in the diagnosis of prepubertal patients with partial 5 $\alpha$ -reductase deficiency. *Eur J Pediat*, 155(6), 445–451.

Hu, Y., Okumura, L. M., & Page, D. C. (2013). Gata4 Is Required for Formation of the Genital Ridge in Mice. *PLoS Genetics*, 9(7), e1003629.

Hughes, I.A., Werner, R., Bunch, T., & Hiort, O. (2012). Androgen insensitivity syndrome. *Semin Reprod Med*, 30 (5), 432-442.

Hughes, I. (2008). Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Prac Res. Clin Endocrinol Met*, 22(1), 119–134.

Humphries, S., Gudnason, V., Whittall, R., & Day, I. (1997). Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughout modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clin Chem*, 43(3), 427-435.

Imperato-McGinley, J., Guerrero, L., Gautier, T., & Peterson, R. (1974). Steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science*, 186, 1213–1215.

Ingraham, H., Lala, D., Ikeda, Y., Luo, X., Shen, W., Nachtigal, M., Abbud, R., Nilson, J., & Parker, K. (1994). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes and Dev*, 8(19), 2302–2312.

Izquierdo, G., & Glassberg, K. I. (1993). Gender assignment and gender identity in patients with ambiguous genitalia. *Urol*, 42(3), 232–242.

Jacobs, P., & Strong, J. (1959). A Case of Human Intersexuality Having a Possible XXY Sex-Determining Mechanism. *Nature*, 183(4657), 302–303.

Jameson, S., Lin, Y., & Capel, B. (2012). Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Devel Biol*, 370(1), 24–32.

Jenkins, E., Hsieh, C., Milatovich, A., Normington, K., Berman, D., Francke, U., & Russell, D. (1991). Characterization and chromosomal mapping of a human steroid 5alpha-reductase gene and pseudogene and mapping of the mouse homologue. *Genomics*, 11(4), 1102–1112.

Karczewski, K., Francioli, L., Tiao, G., Cummings, B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R., ... MacArthur, D. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581, 434-443.

Kim, M., Yoon, S., Bollig, F., Kitagaki, J., Hur, W., Whye, N., Wu, Y., Rivera, M., Park, J., Kim, H., Malik, J., Bell, D., Englert, C., Perantoni, A., & Lee, S. (2010). A Novel Wilms Tumor 1 (WT1) Target Gene Negatively Regulates the WNT Signaling Pathway. *J Biol Chem*, 285(19), 14585–14593.



Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M. C., Poulat, F., Behringer, R., Lovell.Badge, R., & Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*, 4(6), 1000–1009.

Ko, J., Cheon, C., Kim, G., Kim, S., Kim, K., & Yoo, H. (2010). Clinical characterization and analysis of the SRD5A2 gene in six Korean patients with 5alpha-reductase type 2 deficiency. *Horm Res Pædiatr*, 73(1), 41–48.

Kuroki, S., Matoba, S., Akiyoshi, M., Matsumura, Y., Miyachi, H., Mise, N., Abe, K., Ogura, A., Wilhelm, D., Koopman, P., Nozaki, M., Kanai, Y., Shinkai, Y., & Tachibana, M. (2014). Epigenetic Regulation of Mouse Sex Determination by the Histone Demethylase Jmjd1a. *Science*, 341(6150), 1106–1109.

Lahiri, D. & Nurnberger, J. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 19(19), 5444.

Lala, D. S., Rice, D. a., & Parker, K. L. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol*, 6(8), 1249–1258.

Landrum, M., Lee, J., Riley, G., Jang, W., Rubinstein, W., Church, D., & Maglott, D. (2014). ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nuc Acid Res*, 42, D980-D985.

Lassmann, T., & Sonnhammer, E. (2005). Kalign – an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC Bioinformatics*, 6, 298.

Lee, P. A., Nordenström, A., Houk, C. P., Ahmed, S. F., Auchus, R., Baratz, A., Liao, L., Lin-Su., K., Looijenga, L., Mazur, T., Meyer-Bahlburg, H., Mouriquand, P., Quigley, C., Sandberg, D., Vilani, E., Witchel, S., & the Global DSD Update Consortium. (2016). Global disorders of sex development update since 2006: Perceptions, approach and care. *Horm Res Paediatr*, 85(3), 158–180.

Lee, P., Houk, C., Ahmed, F., & Hughes, I. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *Pediatr*, 118(2), e488-500.

Lewis, R. (2015). Human genetics: concepts and applications. 11<sup>o</sup> Edición. Editora McGraw-Hills, pp.282-283.

Loch R. & Bilharinho B. (2020). Integrative and analytical review of the 5-alpha-reductase type 2 deficiency worldwide. *Aplic Clin Genet*, 13,83-96.

Lucas-Herald, A. K., & Bashamboo, A. (2014). Gonadal Development. Understanding Differences and Disorders of Sex Development (DSD). *Endocr Dev Basel Karger*, 27, 1–16.

Machiela, M., & Chanock, S. (2015). LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics*, 31(21), 3555-3557.

Maimoun, L, Philibert, P., Cammas, B., Audran, F., Pienkowski, C., Kurtz, F., Heinrich, C., Cartigny, M., & Sultan, C. (2010). Undervirilization in XY newborns may hide a 5 $\alpha$ -reductase deficiency: report of three new SRD5A2 gene mutations. *Int J Androl*, 33(6), 841–847.

Maimoun, Laurent, Philibert, P., Bouchard, P., Gönül, Ö., Leheup, B., Fenichel, P., Servant, N., Paris, F., & Sultan, C. (2011a). Primary amenorrhea in four adolescents revealed 5 $\alpha$ -reductase deficiency confirmed by molecular analysis. *Fertil Steril*, 95(2), 804.e1-804.e5.

Maimoun, Laurent, Philibert, P., Cammas, B., Audran, F., Bouchard, P., Fenichel, P., ... Sultan, C. (2011b). Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5 $\alpha$ -reductase deficiency: An extensive international experience of 55 patients. *J Clin Endocrinol Met*, 96(2), 296–307.

Makridakis, N. M., di Salle, E., & Reichardt, J. K. (2000). Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 alpha-reductase type II. *Pharmacogenetics*, 10(5), 407–413.

Markert, C. L., & Moller, F. (1959). Multiple Forms of Enzymes: Tissue, Ontogenetic, and Species Specific Patterns. *Proc Nat Acad Sci USA*, 45, 753–763.

Massanyi, E. Z., Dicarolo, H. N., Migeon, C. J., & Gearhart, J. P. (2013). Review and management of 46,XY Disorders of Sex Development. *J Ped Urol*, 9(3), 368–379.

Mathews, M. B., Roseman, S., & Dorfman, A. (1952). Determination of the chondroitinase activity of bovine testicular preparations. *J Biol Chem*, 194(1), 235–247.

Matson, C., Murphy, M., Sarver, A., Griswold, M., Bardwell, V., & Zarkower, D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, 476(7358), 101–104.

Mazen, I., Gad, Y. Z., Hafez, M., Sultan, C., & Lumbroso, S. (2003). Molecular analysis of 5alpha-reductase type 2 gene in eight unrelated Egyptian children with suspected

5alpha-reductase deficiency: prevalence of the G34R mutation. *Clin Endocrinol*, 58(5), 627–631.

Mendonca, B. B., Batista, R. L., Domenice, S., Costa, E. M. F., Arnhold, I. J. P., Russell, D. W., & Wilson, J. D. (2016). Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 163, 206–211.

Mendoca B.B., Gomes N., Costa E., Inacio M., Martin R., Nishi M., Carvalho F., Tibor F., Domenice S. 2017. 46,XY disorder of sex development (DSD) due to 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 165(PtA), 79-85.

Miller, N. D., Nance, M. A., Wohler, E. S., Hoover-fong, J. E., Lisi, E., Thomas, G. H., & Pevsner, J. (2009). Molecular (SNP) Analyses of Overlapping Hemizygous Deletions of 10q25.3 to 10qter in Four Patients: Evidence for HMX2 and HMX3 as Candidate Genes in Hearing and Vestibular Function. *Am J Med Genet*, 149A(4), 669–680.

Mongan, N. P., Tadokoro-Cuccaro, R., Bunch, T., & Hughes, I. A. (2015). Androgen insensitivity syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Met*, 29(4), 569–580.

Moore, K., & Persaud, T. (2004). *Embriología clínica* (7<sup>o</sup> Edición). Madrid, España: Elsevier Saunders.

Morel, Y., Roucher, F., Mallet, D., & Plotton, I. (2014). Genetic of gonadal determination. *Ann Endocrinol*, 75(2), 32–39.

Nesta, A., Tatur, D. & Beck, C. (2021). Hotspots of human mutation. *Trends Genet*, 37: 717-729.

Nicoletti, A., Baldazzi, L., Balsamo, A., Barp, L., Pirazzoli, P., Gennari, M., Radetti, G., Cacciari, E. & Cicognani, A. (2005). SRD5A2 gene analysis in an Italian population of under-masculinized 46,XY subjects. *Clin Endocrinol*, 63(4), 375–380.

Nussbaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2016). *Genetics in Medicine*. 8° Edición. Editorial Elsevier, pp. 130

Ocal, G., Adiyaman, P., Berberoğlu, M., Cetinkaya, E., Akar, N., Uysal, A., Duman, T., Evliyaoglu, O., Aycan, Z., Lumbrasso, S., & Sultan, C. (2002). Mutations of the 5 $\alpha$ -steroid reductase type 2 gene in six Turkish patients from unrelated families and a large pedigree of an isolated Turkish village. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 15(4), 411–421.

Okeigwe, I., & Kuohung, W. (2014). 5-Alpha reductase deficiency: a 40-year retrospective review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21(6), 483–487.

Peakall, R., & Smouse, P. (2006). GenA1Ex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*, 6, 288–295.

Peakall, R., & Smouse P. (2012). GenA1Ex 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—An update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.

Piard, J., Mignot, B., Arbez-Gindre, F., Aubert, D., Morel, Y., Roze, V., McElreavy, K., Jonveaux, P., Valduga, M. & van Maldergem, L. (2014). Severe sex differentiation disorder in a boy with a 3.8 Mb 10q25.3-q26.12 microdeletion encompassing EMX2. *Am J Med Genet A*, 164(10), 2618–2622.

Pineda, L., Pinto Cisternas, J., & Arias, S. (1985). Consanguinity in Colony Tovar, a Venezuelan isolate of German origin (1843-1977). *J Hum Evol*, 14, 587-596.

Pinto-Cisternas, J., & Castro de Guerra, D. (1988). Utilidad de los apellidos en estudios de biología humana. Usos y perspectivas en poblaciones latinoamericanas. *Rev Med Chile*, 116, 1191-1197.

Prader, A., & Gurtner, H. (1955). The syndrome of male pseudo-hermaphroditism in congenital adrenocortical hyperplasia without overproduction of androgens (adrenal male pseudo-hermaphroditism). *Helv Paediatr Acta*, 10(4), 397–412.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.

Porras, B. (1995). Fondos documentales del estado Mérida (s.XVI-XX), diagnósticos e inventarios. Editorial Alarcón Fernández. Caracas Venezuela. pp 118

Pulido, N., Osorio, L., Rolo, M., Moreno, N., Martínez, J., Linares, M., Díaz, Y., Villegas, C., Braxo, Y & Hernández, M. (2015). Alteraciones de la diferenciación sexual en pacientes de las regiones capital y centro occidental de Venezuela. *Comunidad y Salud*, 12, 33-42.

Rhéaume, E., Simard, J., Morel, Y., Mebarak, F., Zachmann, M., Forest, M., New, I & Labrie, F. (1992). Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nat Genet*, 1(4), 246–250.

Rice, D., Mouw, A., Bogerd, A., & Parker, K. (1991). A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol*, 5(10), 1552–1561.

Rink, R. C., Adams, M. C., & Misseri, R. (2005). A new classification for genital ambiguity and urogenital sinus anomalies. *BJU Int*, 95(4), 638–642.

Rodríguez-Larralde A., Barraí I. (1988). Estructura Genética Poblacional del Estado Guárico, Venezuela, Estimada a Través de Isonimia. *Acta Cient Venez*, 48,160-166

Rodríguez-Larralde, A., Barraí, I., Alfonzo, JC. (1993). Isonymy structure of four Venezuelan States. *Ann Hum Biol*, 20, 131-135.

Rodríguez Larralde, A & Barraí, I. (1997). Estructura genética poblacional del Estado Guárico, Venezuela, estimada a través de isonimia. *Acta Cient Venez*, 43: 160-167.

Rodríguez Larralde, A & Barraí, I. (1998). Estructura genética poblacional del Estado Zulia, Venezuela, estimada a través de isonimia. *Acta Cient Venez*, 49, 134-143.

Rodríguez-Larralde, A., Castro de Guerra, D., González-Coira, M., & Morales, J. (2001). Frecuencia génica y porcentaje de mezcla en diferentes áreas geográficas de Venezuela, de acuerdo a los grupos Rh y ABO. *Interciencia*, 26, 8-12.

Rothhammer, F. (1977). Genética de poblaciones humanas. Washington. Editado por la Organización de Estados Americanos.

Rudan, I. (2006). Health effects of human population isolation and admixture. *Croat Med J*, 47,526-531.

Russell, D. W., & Wilson, J. D. (1994). Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Ann Rev Biochem*, 63, 25–61.

Sa, Y., Mc, K., Pi, B., Corzo, D., Schuette, J., & Ce, K. (2009). Identification of critical regions for clinical features of distal 10q deletion syndrome. *Clinic Genet*, 76(1), 54–62.

Sadler, T. (2012). *Embriología Médica* (12° Edición). Philadelphia, USA: Wolters Kluwer.

Sahu, R., Boddula, R., Sharma, P., Bhatia, V., Greaves, R., Rao, S., Desai, M., Wakhlu, A., Phadke, S., Shukla, M., Dabadghao, P., Mehrotra, R. & Bhatia, E. (2009). Genetic analysis of the SRD5A2 gene in Indian patients with 5 $\alpha$ -reductase deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 22(3), 247–254.

Sambrook, J., Russel, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Tercera Edición, Cold Spring Harbor Press, pp. 463

Samtani, R., Bajpai, M., Ghosh, P., & Saraswathy, K. (2010). SRD5A2 Gene Mutations: A Population-based review. *Pediatr Endocrinol Rev*, 8(1), 34–40.

Sánchez de La Cruz, B., Guzmán, J., Carrero, F., Nieto, A., Pérez, M., Caraballo, A., & García, V. (2005). Hermafroditismo Verdadero. *Rev Ven Endocrinol y Metabol*, 3(2), 25-29.

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

Sasaki, G., Ogata, T., Ishii, T., Kosaki, K., Sato, S., Homma, K., Takahashi, T., Hasegawa, T & Matsuo, N. (2003). Micropenis and the 5 $\alpha$ -reductase-2 (SRD5A2) gene: Mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. *J Clin EndocrinolMet*, 88(7), 3431–3436.



Schimmer, B. P., & White, P. C. (2010). Minireview: Steroidogenic Factor 1: Its Roles in Differentiation, Development, and Disease. *Mol Endocrinol*, 24(7), 1322–1337.

Shalev, S. (2019). Characteristics of genetic diseases in consanguineous populations in the genomic era: Lessons from Arab communities in North Israel. *Clin Genet*, 95:3-9.

Sharkia, R., Zaid, M., Athamna, A., Cohen, D., Azem, A & Zalan, A. (2008). The changing pattern of consanguinity in a selected region of the Israeli Arab community. *Am J Hum Biol*, 20,70-77.

Sharpe, R. M. (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 20(1), 91–110.

She, Z., & Yang, W. (2017). Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development?. *Sem Cell Dev Biol*, 63, 13–22.

Silver, R. I., & Russell, D. W. (1999). 5 $\alpha$ -Reductase type 2 mutations are present in some boys with isolated hypospadias. *J Urol*, 162(3 II), 1142–1145.

Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., ... Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240–244.

Sinnecker, G. H. G., Hiort, O., Dibbelt, L., Albers, N., Dörr, H. G., Hauss, H., Heinrich, U., Hemminghaus, M., Hoepffner, W., Holder, M. & Kruse, K. (1996). Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *Am J Med Genet*, 63(1), 223–230.

Sokal, R., & Rohlf, F. (1969). *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. San Francisco, W.H. Freeman and Company.

Soliman, H., Amr, K., El-Ruby, M., Mekkawy, M., Elaidy, A., & Mazen, I. (2015). Mutational pattern in the 5 $\alpha$  reductase 2 (SRD5A2) gene in 46,XY Egyptian DSD patients. *Middle East J Med Genet*, 4(2), 77–82.

Speicher, M., Antonarakis, S. E., Motulsky, A. G. (2010). *Vogel & Motulsky's Human genetics problems and approaches*. Editorial Springer. Cuarta Edición. pp. 507-525.

Strachan, T. & Read, A. (2018). *Human molecular genetics*. CRC Press. Quinta Edición. pp. 399-404.

Tay, J. & Yip, W. (1984). The estimation of inbreeding from isonymy: relationship to the average inbreeding coefficient. *Ann Hum Genet*, 48, 185-194.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725–2729.

Thai, H. T. T., Kalbasi, M., Lagerstedt, K., Frisé, L., Kockum, I., & Nordenskjöld, A. (2005). The valine allele of the V89L polymorphism in the 5- $\alpha$ -reductase gene confers a reduced risk for hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(12), 6695–6698.

Thigpen, A. E., Davis, D. L., Milatovich, A., Mendonca, B. B., Imperato-McGinley, J., Griffin, J. E., Franke, U., Wilson, J.D. & Russell, D. W. (1992a). Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Invest*, 90(3), 799–809.

Thigpen, A. E., Davis, D. L., Gautier, T., Imperato-McGinley, J., & Russell, D. W. (1992b). Brief report: the molecular basis of steroid 5 alpha-reductase deficiency in a large Dominican kindred. *N Engl J Med*, 327(17), 1216–1219.

Thyen U., Lanz, K., Holterhus, P., Hiort, O. (2006). Epidemiology and initial management of ambiguous Genitalia at Birth in Germany. *Horm Res*, 66, 195-203.

Tiosano, D., Knopf, C., Koren, I., Levanon, N., Hartmann, M. F., Hochberg, Z., & Wudy, S. A. (2008). Metabolic evidence for impaired 17 $\alpha$ -hydroxylase activity in a kindred bearing the E305G mutation for isolate 17,20-lyase activity. *Eur J Endocrinol*, 158(3), 385–392.

Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K., Eisenberger, T., Sekido, R., Kress, J., Treier, A.C., Klugmann, C., Klasen, C., Holter, N., Riethmacher, D., Schütz, G., Cooney, A., Lovell-Badge, R. & Treier, M. (2009). Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell*, 139(6), 1130–1142.

Vilchis, F., Méndez, J. P., Canto, P., Lieberman, E., & Chávezz, B. (2000). Identification of missense mutations in the SRD5A2 gene from patients with steroid 5 a - reductase 2 deficiency. *Clinl Endocrinol*, 52(2), 383–387.

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

Vilchis, F., Ramos, L., Méndez, J., Benavides, S., Canto, P., & Chávez, B. (2010). Molecular analysis of the SRD5A2 in 46,XY subjects with incomplete virilization: The

P212R substitution of the steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 may constitute an ancestral founder mutation in Mexican patients. *J Androl*, 31(4), 358-364.

Walsh, P. C., Madden, J. D., Harrod, M. J., Goldstein, J. I., MacDonald, P. C., & Wilson, J. D. (1974). Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. *N Engl J Med*, 291(18), 944–949.

Wang, R., Dong, Z., Wang, W., Xiao, Y., Ni, J., & Wang, D. (2013). Mutation analysis of the SRD5A2, AR and SF-1 genes in 52 Chinese boys with hypospadias. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 26(9–10), 887–893.

Wang, Y., Li, Q., Xu, J., Liu, Q., Wang, W., Lin, Y., Ma, F., Chen, T., Li, S. & Shen, Y. (2004). Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet*, 12(9), 706–712.

Welzel, M., Wüstemann, N., Šimić-Schleicher, G., Dörr, H. G., Schulze, E., Shaikh, G., Clayton, P., Grötzinger, J., Holterhus, P. & Riepe, F. G. (2008). Carboxyl-terminal mutations in 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II cause severe salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. *J Clin EndocrinolMetab*, 93(4), 1418–1425.

Wigley, W., Prihoda, J., Mowszowicz, I., Mendonca, B., New, M., Wilson, J., Russell, D. (1994). Natural mutagenesis study of the human steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 isozyme. *Biochem*, 33, 1265-1270.

Wilhelm, D., Palmer, S., Koopman. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev*, 87, 1-28

Wilhelm, D., Yang, J. X., & Thomas, P. (2013). Mammalian Sex Determination and Gonad Development. *Curr Top Dev Biol*, 106,89-121.

Wilson, J. D., Griffin, J. E., & Russell, D. W. (1993). Steroid 5alpha-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev*, 14(5), 577–593.

Wright, S. (1922). Coefficients of inbreeding and relationship. *Am Natur*, 56, 330-338.

Yanase, T., Imai, T., Simpson, E., & Waterman, M. (1992). Molecular basis of 17 $\alpha$ -hydroxylase-17,20-lyase deficiency.pdf. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43(8), 973–979.

Yao, H. H. C., Whoriskey, W., & Capel, B. (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Devel*,16(11), 1433–1440.

Zerbino, D., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M., Barrell, D., ... & Flicek, P. (2018). Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res*, 46 (Database issue), D754–D761.

Zhu, H., Liu, W., Han, B., Fan, M., Zhao, S., Wang, H., Lu, Y., Pan, C., Chen, F., Chen, M., Song, M., Cheng, K. & Qiao, J. (2014). Phenotypic and molecular characteristics in eleven Chinese patients with 5alphaPhenotypic and molecular characteristics in eleven Chinese patients with 5a-reductase Type 2 deficiency. *Clin Endocrinol*, 81(5), 711–720.

Zhu, Y. S., Katz, M. D., & Imperato-McGinley, J. (1998). Natural potent androgens: Lessons from human genetic models. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*,12(1), 83–113.