

**PROTOCOLOS DE
DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO Y MOLECULAR
DE LAS ANOMALÍAS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL**

Dra. Laura Audí Parera

Dra. Mónica Fernández Cancio

**Unidad Investigación Endocrinología y Nutrición Pediátricas
Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron - Barcelona**

1ª PARTE: Fisiopatología de la diferenciación sexual. Orientación diagnóstica

La diferenciación sexual requiere durante la vida fetal el encadenamiento de una serie de procesos en cuya determinación y regulación interviene un gran número de genes que codifican la síntesis de proteínas cuyas acciones son imprescindibles para que el feto alcance una diferenciación completa hacia el sexo femenino o hacia el masculino (Fig. 1). Cada gen tiene que tener una estructura (secuencia) normal para que la proteína correspondiente pueda sintetizarse o para que su estructura sea normal y por lo tanto pueda ser activa. Clásicamente se han distinguido tres etapas o niveles de diferenciación sexual: el sexo genético, el sexo gonadal y el sexo genital que quedan determinados durante el período fetal. Ya durante la infancia, pero sobre todo durante la pubertad y en el adulto debemos añadir el sexo fenotípico (caracteres sexuales secundarios), el sexo psicosexual y el sexo social. El sexo genético queda determinado en el momento de la fertilización del ovocito por el espermatozoide. Dependiendo de la constitución gónosómica del espermatozoide, quedará determinado el sexo genético masculino 46XY si el espermatozoide lleva el cromosoma Y o el femenino 46XX cuando el espermatozoide lleva el gónosoma X.

La constitución genética de los cromosomas sexuales es determinante para la diferenciación masculina o femenina de la gonada primitiva, siendo imprescindible la expresión de un gen del cromosoma Y para la diferenciación testicular, aunque otros genes tanto autosómicos como en el cromosoma X son también necesarios para la diferenciación del testículo fetal. Los genes necesarios para la diferenciación y mantenimiento del ovario son aun menos conocidos. En cambio, la determinación del dimorfismo sexual de los genitales internos y externos depende de la secreción y acción de varias hormonas por parte de la gonada fetal masculina, es decir del testículo.

Para imponer la diferenciación masculina, los testículos fetales deben ser morfológica y funcionalmente normales. Las funciones del testículo tienen una determinada cronología durante la vida fetal. Dos tipos de secreciones testiculares son necesarias para la diferenciación masculina: la de andrógenos, testosterona, por parte de las células de Leydig del intersticio y la del factor inhibidor de los conductos de Müller (MIF) por parte de las células de Sertoli del túbulos seminífero. Andrógenos y MIF actúan sobre sus tejidos diana: conductos de Wolff y genitales externos para los andrógenos y conductos de Müller para el MIF. Se calcula que por lo menos unos 30 genes distintos (localizados en los cromosomas X, Y y en algunos autosomas) intervienen en la regulación de los distintos procesos necesarios para la determinación y diferenciación sexual (Fig. 1 y Fig. 2). Es seguro que no todos los genes que intervienen en estos procesos son conocidos y por lo tanto en el curso de los años próximos se caracterizarán nuevos genes y nuevas patologías que como tales ya existían pero cuyo origen o etiología eran aun desconocidos.

Cada gen puede adquirir cambios en su estructura, por lo tanto mutaciones, de manera que las que afectan a la cascada de genes que regulan la diferenciación sexual provocan las correspondientes anomalías de la diferenciación sexual.

La afectación más frecuente de la diferenciación femenina es debida a la llamada “Hiperplasia Suprarrenal Congénita” por anomalías en el gen del enzima 21-hidroxilasa que provocan, en el feto con sexo genético y gonadal femeninos, una virilización de los genitales externos. Se trata, con mucho, de la causa más frecuente entre las anomalías de la diferenciación sexual.

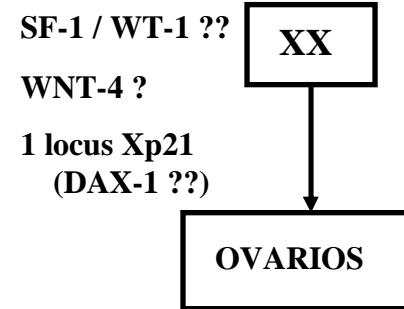
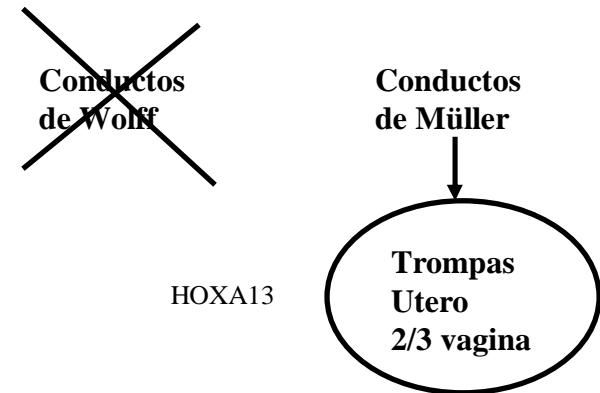
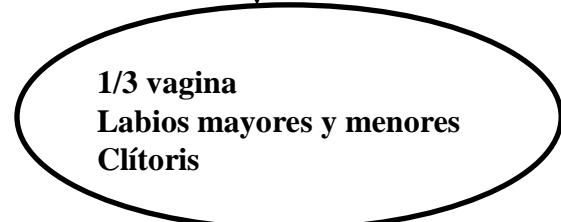
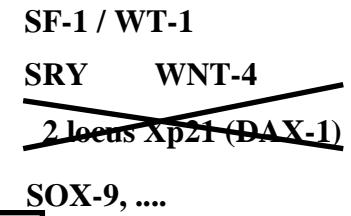
La afectación de la diferenciación masculina puede ser debida a alguna anomalía en alguno de los múltiples genes necesarios para alcanzar la virilización completa (Fig. 1 y Fig. 2). La anomalía más frecuente, aunque su incidencia real es desconocida, es la alteración de la acción de los andrógenos por mutaciones en el gen del receptor de andrógenos que provoca los llamados síndrome de insensibilidad o resistencia completa o parcial a los andrógenos (CAIS en inglés, *complete androgen insensitivity syndrome*, y PAIS, *partial androgen insensitivity syndrome*). Esta anomalía ocurre en el último eslabón de la cadena de acciones necesarias para la virilización (Fig. 2).

El diagnóstico y tratamiento de las anomalías de la diferenciación sexual requiere un abordaje multidisciplinario (pediatras y/o endocrinólogos, genetistas, bioquímicos, radiólogos, anatómo-patólogos, cirujanos, psicólogos y psiquiatras).

El diagnóstico de las anomalías de la diferenciación masculina (pseudohermafroditismo masculino cuando el cariotipo es 46,XY) requiere una serie de exploraciones y estudios que deben ser llevados a cabo de forma coordinada (Fig. 3 y Fig. 4). Para llegar al diagnóstico molecular con las máximas garantías de que éste pueda ser eficaz es absolutamente necesario que los pasos previos hayan sido realizados y analizados adecuadamente (Fig. 3).

Las anomalías de la diferenciación sexual pueden clasificarse según el tipo de gonadas presentes (Tabla 1) siendo la clasificación actual completa la presentada en las Tablas 2a y 2b.

La Tabla 3 presenta los genes por ahora conocidos cuyas mutaciones pueden dar lugar a los diferentes tipos de anomalías de la diferenciación sexual.

DMRT1 / DMRT2**SEXO GENÉTICO****SEXO GONADAL****Seno urogenital y genitales externos****EXTERNO****DMRT1 / DMRT2****TESTÍCULOS**hCG/LH
FSH

Célula de Leydig

Conductos de Wolff + Receptor andrógenos

Epidídimo
Deferente
Vesículas seminales

Célula de Sertoli

Conductos de Müller + Receptor AMH

Seno urogenital y genitales externos

DHT + 5α-reductasa (SRD5A2)

+ Receptor andrógenos (AR)

Próstata
Bolsas escrotales
Pene**FIGURA 1**

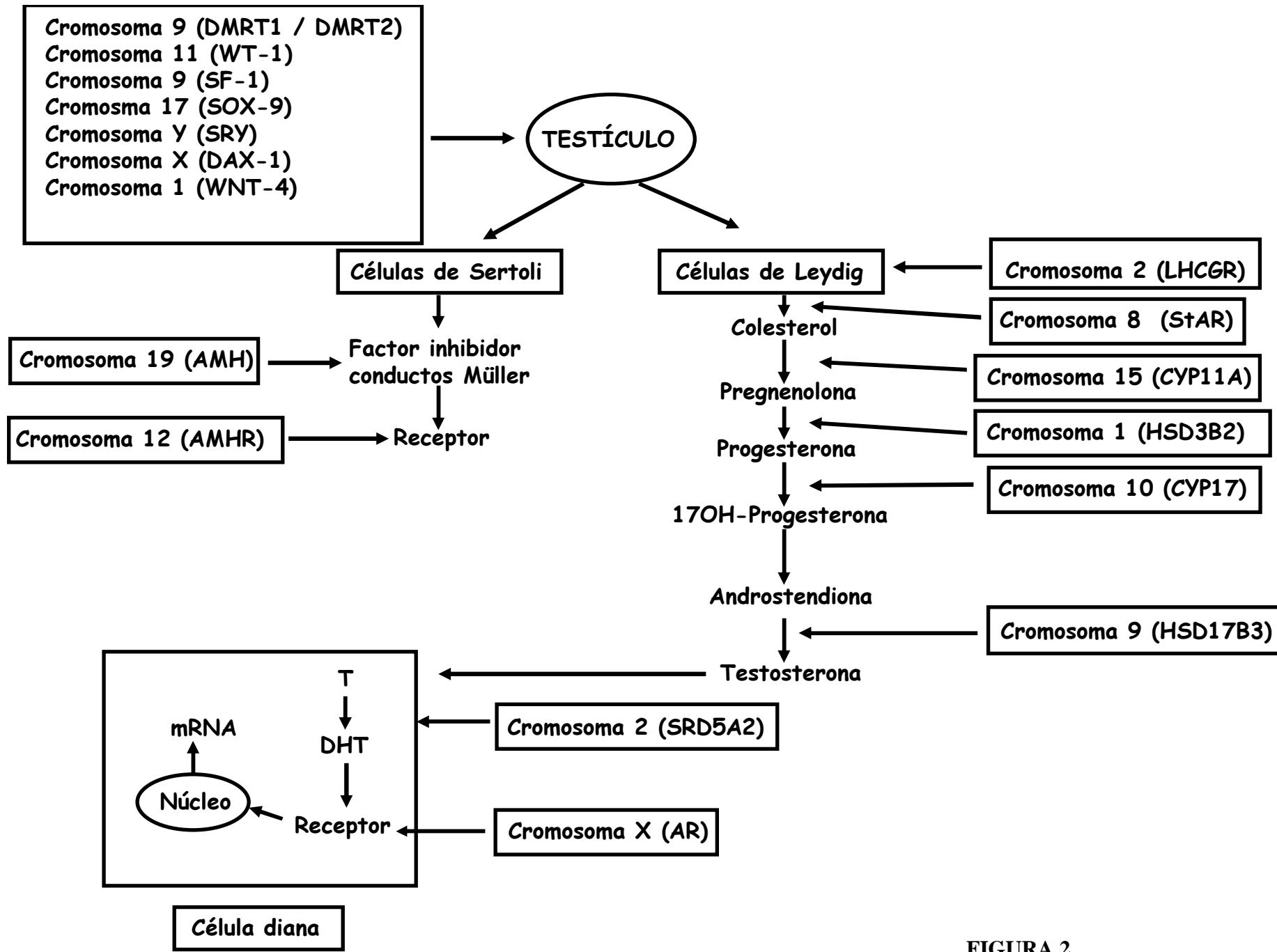


FIGURA 2

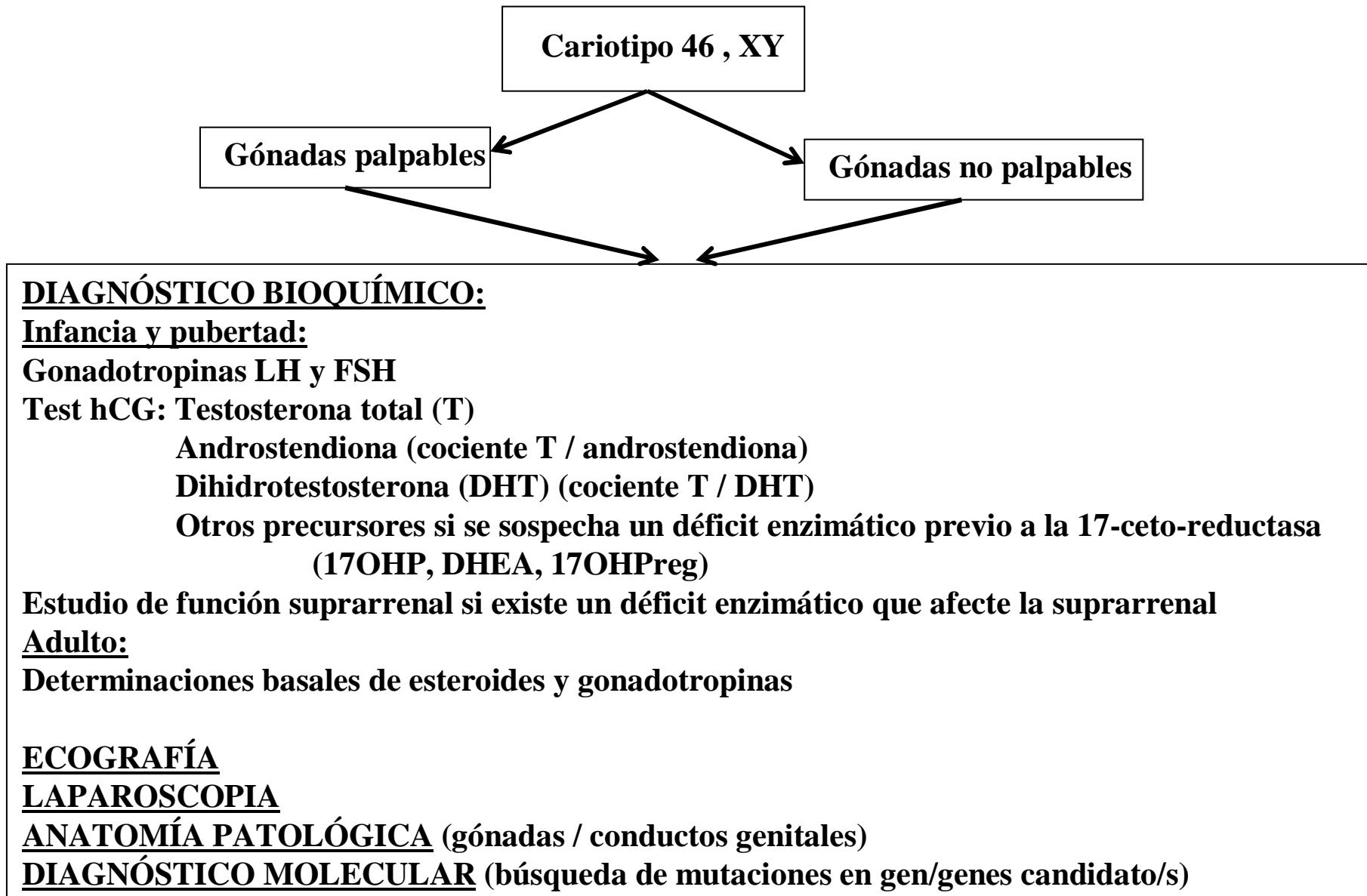


FIGURA 3

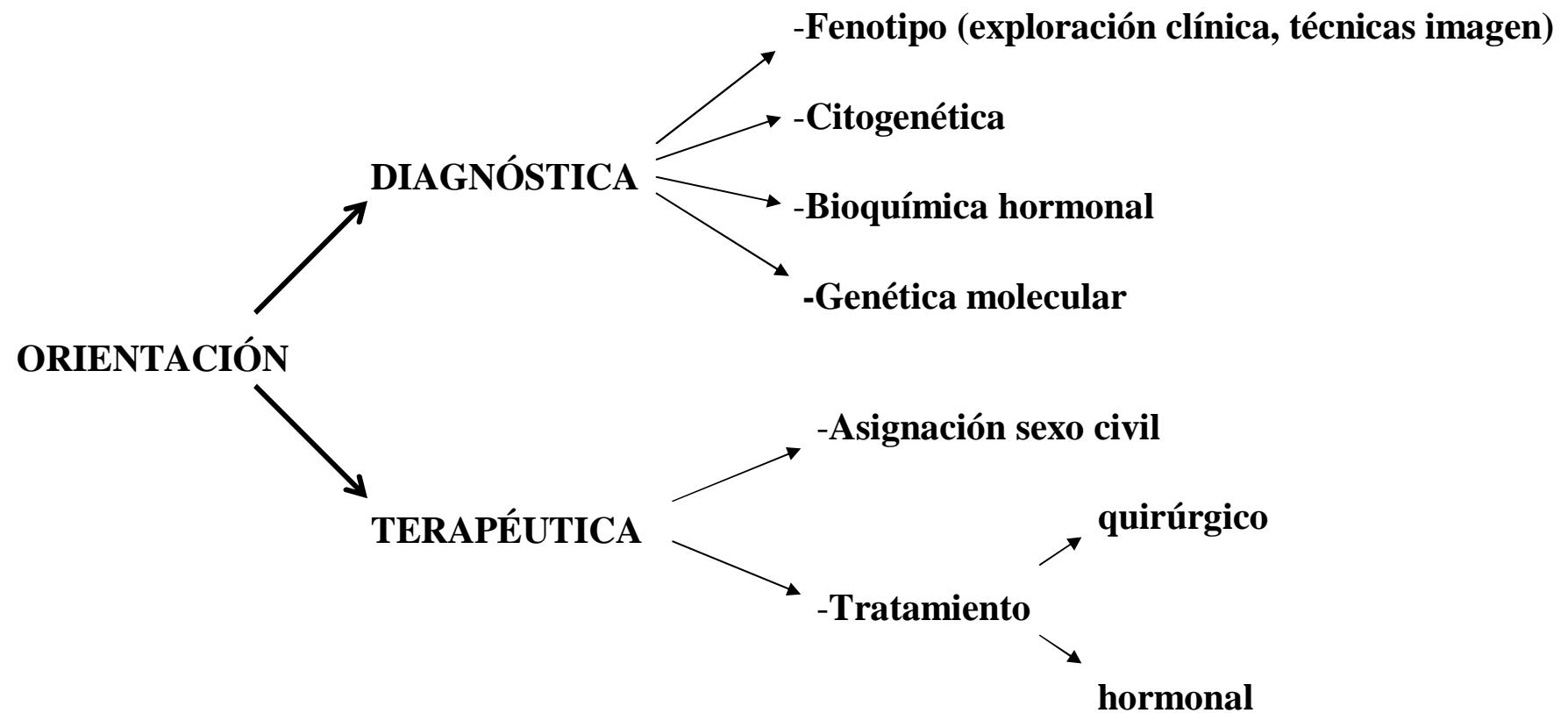


FIGURA 4

TABLA 1

**CLASIFICACIÓN DE LAS ANOMALÍAS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL
SEGÚN EL ESTADO DE DIFERENCIACIÓN DE LAS GONADAS**

GONADAS	DIAGNOSTICO
Ovarios bilaterales	Pseudohermafroditismo femenino
Testes bilaterales	Pseudohermafroditismo masculino
Ovario y testículo	Hermafroditismo verdadero
Testículo y cintilla gonadal	Disgenesia gonadal mixta
Cintillas gonadales indiferenciadas o ausencia de gonadas	Disgenesia gonadal pura Disgenesia ovárica (Síndrome de Turner) Síndromes de regresión testicular

TABLA 2a

CLASIFICACIÓN DE LAS ANOMALÍAS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL (1)

ANOMALIAS DE LA DIFERENCIACIÓN GONADAL

Anomalías de la diferenciación ovárica

Síndrome de Turner 45,XO y variantes

Disgenesias gonadales 46,XX

Masculinización de las gonadas con cariotipo 46,XX

Anomalías de la diferenciación testicular

Disgenesias gonadales 46,XY y pseudohermafroditismo masculino disgenético

Genes DMRT1 y DMRT2

Gen WNT4

Gen DAX-1

Gen SRY

Gen WT-1

Gen SOX-9

Gen SF-1

*Otros genes candidatos y síndromes malformativos asociados a
pseudohermafroditismo masculino disgenético*

Disgenesias gonadales mixtas

Hermafroditismo verdadero

Disgenesias del túbulo seminífero

Síndrome de Klinefelter 47,XXY y variantes

Varones 46,XX

Síndromes de regresión testicular

TABLA 2b

CLASIFICACIÓN DE LAS ANOMALÍAS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL (2)

ANOMALIAS DE LA DIFERENCIACIÓN GENITAL

Anomalías de la diferenciación genital interna en el sexo femenino

Pseudohermafroditismos femeninos

Hiperplasia suprarrenal congénita

Déficit de 21-hidroxilasa (gen CYP21B)

Déficit de 11 β -hidroxilasa (gen CYP11B1)

Déficit de 3 β -hidroxiesteroido deshidrogenasa (gen HSD3B2)

Déficit de aromatasa (gen CYP19)

Tumor fetal virilizante

Tumor materno virilizante

Virilización yatrogénica

Malformativo e idiopático

Pseudohermafroditismos masculinos

Pseudohermafroditismo masculino interno (gen AMH y gen AMHR)

Déficit de secreción de testosterona

LH fetal anómala (gen LH)

Aplasia/hipoplasia de células de Leydig (gen LHCGR)

Defecto de la biosíntesis del colesterol (déficit de 7-dehidro-colesterol reductasa) (gen DHCR7)

Déficits enzimáticos biosíntesis de la testosterona

Proteína StAR (gen StAR)

Colesterol desmolasa, 20-22-desmolasa (gen CYP11A)

3 β -hidroxiesteroido deshidrogenasa (gen HSD3B2)

17 α -hidroxilasa y 17,20 desmolasa (gen CYP17)

17 β -hidroxiesteroido deshidrogenasa (gen HSD17B3)

Anomalías en el mecanismo de acción de los andrógenos

Déficit de 5 α -reductasa (gen SRD5A2)

Resistencia a los andrógenos (gen AR)

Pseudohermafroditismo masculino yatrogénico

Pseudohermafroditismo masculino idiopático

MUTACIONES MONOGÉNICAS DESCRIPTAS CAUSANTES DE ANOMALÍAS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

<u>Gen</u>	<u>Nº OMIM</u>	<u>Diagnósticos</u>
DMRT1 / DMRT2	602424/604935	Disgenesia gonadal en ambos sexos
WNT4	603490	PSHM por duplicación
DAX-1	300473	PSHM por duplicación
WT-1	194080	PSHM
SF-1	184757	PSHM
SOX-9	608160	PSHM por mutación y PSHF por duplicación
SRY	480000	Disgenesia gonadal pura 46,XY / PSHM disgenético / (DGM / HV)
DHCR7	270400	PSHM en síndrome de Smith-Lemli-Opitz
CYP21B	201910	PSHF por déficit de 21-hidroxilasa
CYP11B1	202010	PSHF por déficit de 11 β -hidroxilasa
CYP19	107910	PSHF por déficit de aromatasa
AMH	600957	PSHM interno por déficit de AMH
AMHR	600956	PSHM interno por resistencia al AMH
LHB	152780	PSHM por LH anómala
LHCGR	152790	PSHM por aplasia/hipoplasia células Leydig
StAR	600617	PSHM con HSC lipoidea
CYP11A	118485	PSHM con HSC por déficit de colesterol desmolasa
HSD3B2	201810	PSHM y PSHF con HSC por déficit de 3 β -HSD
CYP17	202110	PSHM con HSC por déficit de 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa
HSD17B3	605573	PSHM por déficit de 17 β -HSD
SRD5A2	607306	PSHM por déficit de 5 α -reductasa
AR	300068	PSHM por resistencia a los andrógenos

PSHM= pseudohermafroditismo masculino. **DGM**= disgenesia gonadal mixta.

HV= hermafroditismo verdadero. **PSHF**= pseudohermafroditismo femenino.

HSC= hiperplasia suprarrenal congénita. **Rc**= receptor.

OMIM = Online Mendelian Inheritance in Man (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

TABLA 3

2º PARTE: PROTOCOLOS PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El cuerpo humano está constituido por entre diez y cien billones de células que se encuentran agrupadas en tejidos. En el interior de las células se encuentra un orgánulo más o menos esférico denominado núcleo que contiene los cromosomas. Estos cromosomas están formados por largas moléculas de DNA asociadas a proteínas, y que constituyen el sustrato del material genético. Alrededor del núcleo se encuentra el citoplasma, una densa solución acuosa en la que están disueltas miles de moléculas diferentes y una serie de orgánulos.

El genoma humano consiste en moléculas de DNA en forma de doble hélice en la que las dos cadenas están químicamente unidas por enlaces. Cada cadena de DNA está constituida por una sucesión lineal de unas moléculas denominadas nucleótidos. Estos nucleótidos son cuatro: ADENINA (A), TIMINA (T), CITOSINA (C) y GUANINA (G). Los genes son partes de la molécula de DNA que forma los cromosomas, y codifican la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Cada célula contiene el mismo número de cromosomas (44 autosomas y dos cromosomas sexuales, XX en la mujer y XY en el hombre) y, por tanto, de genes (de unos 70.000 a 100.000). El contenido total de DNA de una célula se denomina genoma.

La información genética está codificada por la secuencia de nucleótidos. En las uniones que se establecen entre las dos cadenas de DNA la A se une específicamente a la T y la C a la G.

Mientras que el DNA se encuentra localizado en el núcleo de la célula, la síntesis de las proteínas tiene lugar en el citoplasma. Esto sugiere que debe existir un mecanismo de transferencia física de la información desde el núcleo al citoplasma. Este mecanismo consiste en la síntesis en el núcleo y a partir del DNA de los genes, de unas moléculas intermediarias denominadas RNAs.

Los RNA son sintetizados, en un proceso llamado transcripción, a partir de una de las cadenas de DNA de los genes. Estas moléculas de RNA se denominan RNA mensajeros, y son transportadas al citoplasma donde la información que contienen en forma de su secuencia de bases es traducida en una secuencia específica de aminoácidos durante el proceso de síntesis de proteínas o traducción. Tres nucleótidos, es decir, un CODÓN, codifican un aminoácido. Es posible que un aminoácido pueda ser codificado por varios codones distintos, por lo que se dice que el código genético está degenerado. Existen además tres codones responsables de la parada de la síntesis de proteínas: codón stop.

Aunque parezca sorprendente, sólo una pequeña parte del genoma humano (2-3%) tiene capacidad codificante, es decir, está constituido por secuencias de DNA que especifican una proteína.

La secuencia de aminoácidos es responsable de la forma y función de las proteínas, y está determinada por la secuencia de nucleótidos de los genes. Los cambios que ocurren en la secuencia de bases en el DNA de los genes se convertirán primero en alteraciones en la secuencia de bases del RNAm, y luego en cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas.

Las **mutaciones** que tienen lugar a nivel de un gen se denominan mutaciones génicas. Podemos hablar de diferentes tipos de mutaciones:

- las **deleciones** consisten en la pérdida total o parcial, hasta de un solo nucleótido, de una parte de la secuencia del gen. La delección total del gen da lugar a la ausencia de la proteína mientras que la delección de uno o varios nucleótidos provoca un cambio en la pauta de lectura que da lugar a una proteína final anómala.

- las **inserciones** consisten en la adición de uno o varios nucleótidos. Estas inserciones provocan también un cambio en la pauta de lectura que da lugar a una proteína final anómala.

- otras mutaciones consisten en el **cambio de un nucleótido** por otro. Éstas se pueden clasificar en:

- mutaciones en las que el cambio de un nucleótido da lugar a la introducción de un **codón stop**. Este tipo de mutaciones da lugar a una proteína truncada que pierde parte de sus dominios funcionales y que además presenta una reducción o pérdida total de actividad.

- mutaciones en las que el cambio de un nucleótido da lugar al **cambio de un aminoácido** por otro diferente. El cambio de un solo aminoácido puede ser lo suficientemente importante para la función de la proteína ya que provoca un cambio conformacional de ésta.

- en algunos casos un cambio de nucleótido **no** da lugar a un cambio de aminoácido ya que el código genético lo permite. Sin embargo, este cambio puede ser importante ya que existen factores relacionados con la regulación del sistema que reconocen determinadas secuencias dentro del gen.

Tal como se menciona en la 1^a parte de esta exposición, el diagnóstico de las anomalías de la diferenciación sexual requiere un abordaje multidisciplinario (pediatras y/o endocrinólogos, genetistas, bioquímicos, radiólogos, anatómo-patólogos, cirujanos, psicólogos y psiquiatras).

La citogenética permite establecer el cariotipo y en consecuencia detectar posibles anomalías como las aneuploidias (número anómalo de cromosomas), la presencia de mosaicos por existir varias líneas celulares o la presencia de delecciones, duplicaciones o translocaciones. Si el cariotipo es 46,XX, estructuralmente normal, el diagnóstico se orienta hacia el PSHF (pseudohermafroditismo femenino) y si es 46,XY, estructuralmente normal, hacia el PSHM (pseudohermafroditismo masculino).

Las determinaciones hormonales permiten confirmar la mayor parte de diagnósticos sobre todo en el caso del PSHF y orientar buena parte de los diagnósticos del PSHM. En el caso del PSHM la posibilidad de cultivar fibroblastos de piel genital obtenida en el momento de una intervención quirúrgica permite caracterizar las anomalías en el mecanismo de acción de los andrógenos que pueden situarse a 2 niveles: la enzima 5 α -reductasa (gen SRD5A2) o el receptor de andrógenos (gen AR) (Figura 5).

Para llegar al diagnóstico molecular con las máximas garantías de que éste pueda ser eficaz es absolutamente necesario que los pasos previos hayan sido realizados y analizados adecuadamente. Es pues necesario que se haya orientado el diagnóstico para poder decidir qué gen o qué genes puede/n estar afectado/s y emprender su estudio.

La metodología utilizada para el diagnóstico molecular está esquematizada en la Figura 6.

PSEUDOHERMAFRODITISMO MASCULINO

CARIOTIPO 46, XY - GONADAS = Testes

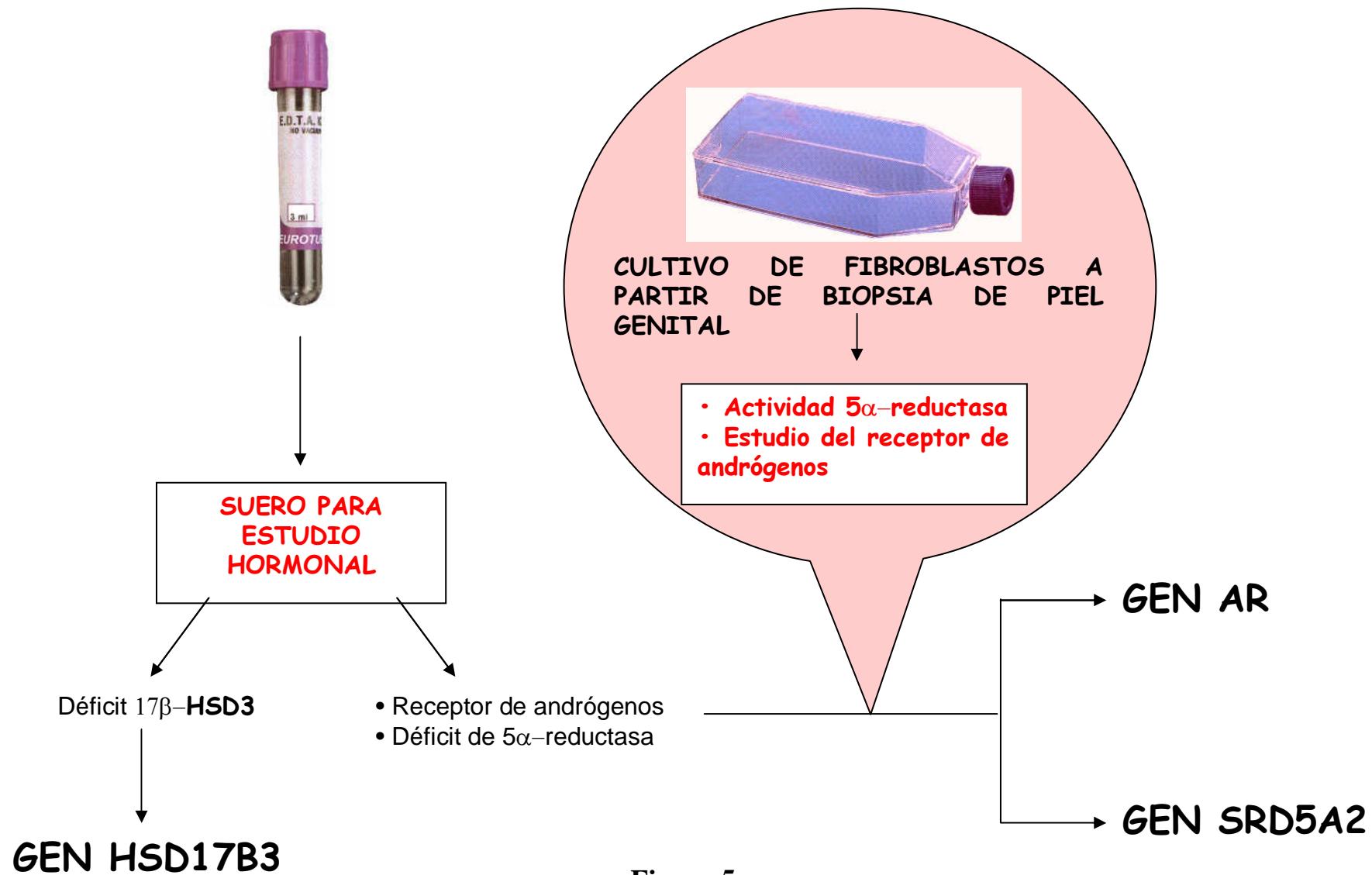
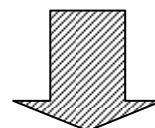


Figura 5

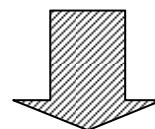
METODOLOGÍA



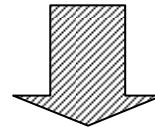
Extracción de DNA de leucocitos
de sangre periférica



PCR (reacción en cadena
de la polimerasa)



Electroforesis
en gel de acrilamida

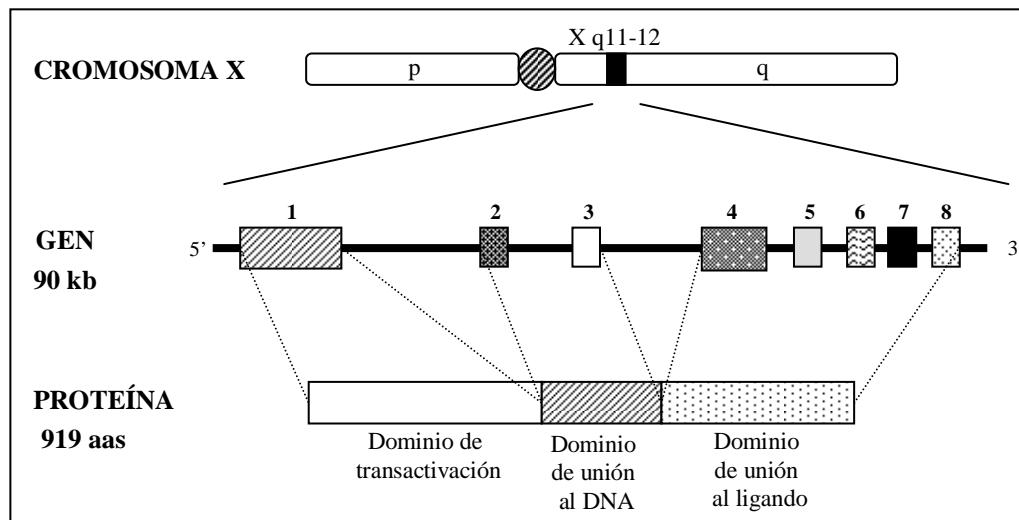


Secuenciación automática

Figura 6

MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El gen del receptor de andrógenos se localiza en el cromosoma X. Consta de 8 exones que codifican para una proteína de 919 aminoácidos. Esta proteína consta de tres dominios funcionales: el dominio de transactivación, codificado por el exón 1; el dominio de unión al DNA, codificado por los exones 2 y 3; y el dominio de unión al andrógeno, codificado por los exones del 4 al 8.



Las mutaciones en los dominios de unión al andrógeno y al DNA pueden dar lugar a formas tanto completas como incompletas, mientras que las mutaciones en el exón 1 dan lugar a formas completas en la mayor parte de los casos.

Actualmente es recomendable el diagnóstico molecular de los casos de resistencia total o parcial a los andrógenos. Ello es importante, además, para poder establecer un estudio familiar que permita la detección de las mujeres portadoras del cromosoma X anómalo y, en caso necesario, hacer posible el diagnóstico prenatal.