

Etiopatogenia del hipospadias

Laura Audí, Mónica Fernández-Cancio.

Unidad de Investigación en Endocrinología Pediátrica.

Servicio de Pediatría y Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). Barcelona

CIBERER (CIBER de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III). Madrid

Hospital Vall d'Hebron y Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.

Resumen

El hipospadias representa la anomalía congénita más frecuente identificable en un recién nacido. Presenta grados variables, clasificados desde el más leve (hipospadias anteriores), el intermedio (hipospadias medios) hasta el más severo (hipospadias posterior). Son más frecuentes los anteriores. Representan grados variables de fallo en la virilización de los genitales externos en el sexo masculino pero también grados variables de virilización de los genitales femeninos. Debido a la compleja regulación del desarrollo sexual durante la vida fetal, la presencia de un hipospadias puede ser consecuencia de fallos en alguno/s de las etapa/s de dicho desarrollo. Cuanto más severo es el hipospadias, y más aún si se acompaña de otros signos y síntomas, más probable será poder detectar la causa que lo ha provocado. El itinerario diagnóstico requiere el establecimiento de una buena historia clínica con antecedentes familiares y personales, la realización de un cariotipo, una ecografía abdominal para detectar la presencia de genitales internos femeninos, la palpación de gonadas, la determinación urgente de la 17-OH-P sérica cuando las gonadas no son palpables para descartar o diagnosticar una hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) en una niña 46,XX y, finalmente, unas determinaciones hormonales de testosterona (T), posibles precursores y dihidrotestosterona (DHT), hormona antimülleriana (AMH) y gonadotropinas LH y FSH cuando el cariotipo no es 46, XX. En los casos más severos y también si hay antecedentes familiares se intentará orientar un posible diagnóstico genético y se solicitará el análisis de posibles genes candidatos. Las causas genéticas detectables en los 46, XY alcanzan actualmente proporciones alrededor de un 40% en los casos más severos. Se describen también variaciones polimórficas en algunos genes, de cuya combinación se derivaría una mayor predisposición. Los estudios epidemiológicos también han detectado que diver-

sos factores maternofetales y medioambientales se asocian a una mayor frecuencia de hipospadias.

Palabras clave: Hipospadias, desarrollo sexual, anomalías del desarrollo sexual (ADS), desarrollo sexual diferente (DSD).

Abstract

Hipospadias represents the most frequently detected congenital anomaly in the newborn. Different degrees are classified into the mildest (anterior hypospadias), the intermediate (medium hypospadias) and the most severe (posterior hypospadias). Anterior hypospadias are the most frequent. Hypospadias represents variable degrees of external genitalia masculinization failure in the males but also of external genitalia virilization in the females. Due to the complex process of sexual development during foetal life, the presence of an hypospadias may be the consequence of an anomaly in any of the involved steps. The most severe is the hypospadias and even more if accompanied by other signs and symptoms the most probable will be the detection of the causal etiology. Diagnostic process requires establishing a good family and personal history, a karyotype, a pelvic ultrasound to detect the presence of female internal genitalia, exploring the presence of palpable gonads, an urgent 17-OH-P serum determination when gonads are not palpable to rule out or diagnose a congenital adrenal hyperplasia (CAH) in a girl 46,XX and, finally, hormone determinations of testosterone (T), possible precursors and dihydrotestosterone (DHT), anti-müllerian hormone (AMH) and gonadotropins LH and FSH when the karyotype is not 46,XX. In the most severe cases and when a family history exists, orienting a possible genetic diagnosis is recommended and analysis of possible candidate genes will be requested. Recognizable genetic causes of hypospadias in the 46,XY with the most severe forms amount at pre-

sent 40%. Polymorphic gene sequence variations in several genes and their combinations are now described as a genetic predisposing factor. Epidemiologic studies have also detected that various materno-foetal and medioambiental factors are associated to increased frequency of hypospadias.

Key words: Hypospadias, sexual development, disorders/differences of sex development (DSD)

INTRODUCCIÓN

El hipospadias es una malformación genital que consiste en la localización anómala del meato urinario y de la uretra en relación al fenotipo genital normal del sexo masculino. Su etimología griega queda bien demostrada en la literatura y el arte⁽¹⁾. Se asocia a menudo a un desarrollo incompleto del prepucio y a una incurvación del pene⁽²⁾. Ésta es una definición "teórica", ya que la observación de que el abocamiento de una uretra, en principio masculina, no se localiza en la punta del pene, sin un recorrido completo por los cuerpos cavernosos, constituye un signo de virilización incompleta de los genitales masculinos, pero también puede corresponder a una virilización parcial de los genitales femeninos. Ello dependerá de la etiopatogenia.

Se distinguen diferentes grados de hipospadias, en función de la localización del orificio del meato urinario a lo largo del pene, desde la punta hasta el periné, clasificándose en anteriores o leves (balánico y balanoprepucial), medios o de grado medio (peneano distal, medio y proximal) y posteriores o de grado severo (penoscrotal, escrotal y perineal).

El hipospadias constituye la malformación congénita más frecuente en los niños (1 de cada 200-300 nacidos ó 4-6 por cada 1.000 niños de sexo masculino). Constituye el ejemplo clínico de la interacción de factores hormonales y genéticos durante el desarrollo normal o anómalo de los genitales externos en el sexo masculino⁽³⁾. Su frecuencia depende del grado que se considere y veremos posteriormente que puede variar según las poblaciones. Se admite, en general, que un 50% son anteriores con el meato uretral en la zona del glande. Estos hipospadias si no se acompañan de disminución del tamaño del pene ni de criptorquidia no precisan exploraciones endocrinológicas. Un tercera parte de los hipospadias son medios y un 30% son posteriores, estando estos últimos más relacionados con otras anomalías. El componente genético es frecuente ya que en un 5-10% existen otros casos en la familia, concordando en los gemelos entre un 18 y un 50%. Se considera, en general, que un 15% de los hipospadias severos (posteriores) son portadores de alguna anomalía monogénica. Su frecuencia parece haber aumentado a lo largo de las tres últimas

décadas, hipotetizándose que pueden haber aumentado tanto la susceptibilidad genética como los factores medioambientales; sin embargo, también se puede pensar que ello puede ser debido al aumento de registro de los casos más leves y/o al aumento de supervivencia de los niños de bajo peso debido a la mejora de los cuidados neonatales⁽⁴⁾.

Es recomendable analizar todos los datos posibles con el fin de intentar aclarar si existe una causa demostrable, generalmente genética, ya que contribuirá a muchos de los aspectos relacionados con el manejo de los llamados "estados intersexuales", incluyendo entre ellos la asignación de sexo, la necesidad o no de tratamiento médico farmacológico, de cirugía, de apoyo psicológico y de consejo genético. Como malformación genital, puede manifestarse como tal en la mayoría de las causas de "anomalías del desarrollo sexual" (ADS) o "desarrollo sexual diferente" (DSD), de modo que será necesario combinar todas las estrategias conocidas con el fin de establecer, a ser posible, la etiología de esta malformación. Sin embargo, en un porcentaje superior al 50% de los casos, no se llega a poder demostrar la existencia de ninguna causa conocida y, entonces, queda clasificado como de etiología desconocida o idiopática; esta incidencia se da principalmente en los niños que tienen un cariotipo masculino 46,XY. Se especula entonces que pueden existir factores genéticos o medioambientales que predisponen a este defecto de virilización^(4, 5). Aunque en algunos casos se llega a diagnosticar una etiología monogénica, debe ser considerado, en general, como de etiología multifactorial⁽³⁾. Entre los grados variables del hipospadias, según la localización del meato urinario, cuanto más alejado de la punta del pene, mayor es el grado del hipospadias y mayor la posibilidad de llegar a detectar una causa en los 46,XY. También su asociación con otras anomalías como la criptorquidia o la ausencia de palpación de gónadas, aumenta la posibilidad de detección de la etiología.

Esta revisión discute el estado actual de conocimientos sobre la actitud diagnóstica y las estadísticas etiológicas en los casos más graves que requieren estudios previos a la cirugía reparadora.

ITINERARIO DIAGNÓSTICO

Ante un hipospadias es necesario realizar exploraciones anatómicas y bioquímicas, a la vez o antes de su exploración por un cirujano, sobre todo si su localización es posterior, va asociado a criptorquidia, escroto bífido, micropene de menos de 2 cm (recién nacido a término) o cualquier otra anomalía (esquelética, renal, cardíaca, etc.).

Tipos de hipospadias que requieren estudios clínicos, bioquímicos y genéticos:

- Los hipospadias severos situados a nivel de la base del pene y más posteriores (penoscrotales, escrotales y perineales).
- Los hipospadias familiares.
- Cualquier tipo de hipospadias si va asociado a criotorquidia, uni o bilateral.
- Hipospadias asociado a escroto bífido.
- Hipospadias asociado a micropene (< 2 cm en un recién nacido a término).
- Hipospadias asociado a alguna anomalía esquelética, renal, cardíaca o cualquier dismorfia.
- Aspecto femenino de los genitales pero con hiperfroia de clítoris, fusión posterior de labios mayores y/o gónada palpable.

Antecedentes personales y familiares

Es importante recabar antecedentes familiares aunque suelen ser poco informativos, pero, en caso de serlo, son muy orientativos: consanguinidad, hipospadias, criotorquidia, ginecomastia puberal, infertilidad, tratamientos recibidos por la madre durante el embarazo o para su inducción, fallecidos en período neonatal, etc.

Exploración física

La exploración del hipospadias requiere:

- La definición de su nivel de localización, el cual no siempre coincide con una aparente visualización del meato uretral, ya que su nivel debe definirse a partir del nivel en el que divergen los cuerpos cavernosos. Por lo tanto, hay que definir la localización del meato uretral y de la divergencia de los cuerpos cavernosos.
- La medición de la longitud del pene (desde la punta del glande hasta el pubis: normalmente unos 3 cm).
- El encorvamiento, más frecuente en los hipospadias severos.
- El aspecto del escroto (bífido e implantado por encima del pene, estriado o no, fusionado o no).
- La posición de las gónadas y su tamaño
- La exploración completa del recién nacido (RN) o lactante.

La distancia anogenital (DAG) (distancia entre el centro del ano y el punto más caudal de la base peno-escrotal) es utilizada en animales de experimentación como marcador de la virilización durante la etapa fetal e indicador de efectos inhibidores ejercidos por diversas manipulaciones. Su aplicación a la exploración de niños con hipospadias o criotorquidia ha demostrado que la DAG está significativamente disminuida en ambas situaciones (6), siendo la disminución superior en el hipospadias y, en éste, su disminución es proporcional a la intensidad del hipospadias (7).

Cariotipo

Es obligatoria la realización de un cariotipo. Permite definir las ADS/DSD por anomalías cromosómicas y orientar el diagnóstico diferencial si se trata de un cariotipo femenino 46,XX o masculino 46,XY.

Técnicas de imagen

Se practicará una ecografía abdomino-pélvica para visualizar la posible presencia de derivados de los conductos de Müller (vagina y útero) y medir el tamaño renal. No es útil para la localización de gónadas que no hayan sido palpadas por el clínico.

La genitografía con contraste y la RNM permitirán posteriormente obtener detalles anatómicos más precisos.

Exploración bioquímica

No hay que olvidar que ante un RN con hipospadias y criotorquidia bilateral, mientras no se demuestre lo contrario, puede tratarse de una niña con hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) (2). Por lo tanto, hay que solicitar la determinación de los niveles séricos de 17-OH-P con urgencia, así como controlar el equilibrio hidroelectrolítico.

En el RN y a lo largo de los 4 a 6 primeros meses es necesario cuantificar los niveles de testosterona (T) y de hormona anti-mülleriana (AMH). La T basal puede ser elevada al nacer, pero disminuye hasta el día 12 para aumentar después hasta un máximo muy variable pero que puede situarse en valores similares a los del hombre adulto. Es recomendable realizar una estimulación con gonadotropina coriónica (hCG) para estimular las células de Leydig y conocer la capacidad de esteroidogénesis de la gonada así como el patrón de esteroides secretado (8). La AMH es un marcador muy sensible de las células de Sertoli, no siendo tan útil la determinación de inhibina B. Las gonadotrofinas basales (LH y FSH) pueden ser elevadas pasados los 12 días cuando la gonada es disgenética (afectación del intersticio y del túbulo).

Estudio genético

La orientación de un estudio molecular es difícil en el hipospadias “aislado”, no asociado a otras malformaciones. En caso de alcanzarse un diagnóstico molecular, su utilidad es evidente al permitir avanzar un pronóstico de cara a la asignación de sexo, al desarrollo puberal, a la adecuación sexual y a hacer posible un futuro diagnóstico prenatal y un consejo genético a la familia. Los genes candidatos son numerosos y se trata de intentar orientarlos, en función de los antecedentes y las exploraciones bioquímicas. En la serie de 140 pacientes con cariotipo 46,XY y genitales ambiguos, por lo tanto todos ellos afectos de hipospadias, en los que hemos analizado algunos genes candidatos, el orden de frecuencia de genes en los que se han detectado mutaciones es el siguiente: *AR* (12,9%), *SRD5A2* (7,9%), *NR5A1* (5,0%), *MAMLD1* (4,3%), *HSD17B3* (2,9%), *HSD3B2* (0,7%), *LHCGR* (0,7%), delecciones autosómicas y otros síndromes asociados (3,6%), causa desconocida (62,0%).

En cuanto al diagnóstico prenatal, cuando existe una discordancia entre el sexo genético y el genital o se evidencia una ambigüedad de los genitales externos, el rendimiento diagnóstico es elevado cuando hay antecedentes familiares pero es muy bajo sin éstos⁽⁹⁾.

Algoritmos diagnósticos

Presentamos varios algoritmos diagnósticos para las ADS/DSD, según sean el cariotipo, la presencia o no de genitales internos femeninos (conductos Müllerianos) y las determinaciones hormonales (Figuras 1-3).

CAUSAS GENÉTICAS

Incidencia familiar

Diversos estudios han descrito que el hipospadias tiene una clara incidencia familiar, apareciendo como heredable en un 57 a un 77% de los casos, observándose una herencia tanto por vía paterna como materna⁽¹⁰⁾; el 7% de los pacientes con hipospadias tienen algún familiar afectado y el hermano de un niño con hipospadias tiene un riesgo del 9-17% de presentarlo⁽¹⁰⁾. También son más frecuentes los casos familiares de grados anterior y medio y menos los más graves de localización posterior.

Mutaciones génicas

La mayor parte de ADS o DSD pueden manifestarse en el recién nacido con algún grado o tipo de hipospadias, excepto en aquellos casos en los que no hay ambigüedad de los genitales externos porque

aparecen como femeninos o masculinos de apariencia normal, aunque haya alguna discordancia entre los sexos genotípico (cariotipo o cromosomas sexuales) y fenotípico (genitales externos).

Revisamos los diferentes tipos de DSD, clasificados según el Consenso de 2006⁽¹¹⁾ en función del cariotipo y la Tabla 1 indica los genes y anomalías cromosómicas implicados en los diferentes tipos de ADS/DSD.

Las series que han analizado genes candidatos en pacientes con ADS/DSD 46,XY que presentaban hipospadias han descrito la incidencia de mutaciones en diversos de estos genes.

El primer gen candidato por el relevante papel de los andrógenos en la virilización genital externa es el del receptor de andrógenos (*AR*). Sin embargo, aunque debe ser investigado cuando la secreción de T es normal, su incidencia como causa de resistencia parcial a los andrógenos es inferior al 15% en todas las series porque son más frecuentes las formas completas que ya no presentan hipospadias⁽¹²⁻¹⁴⁾. También el número de repeticiones CAG (polilglutaminas) y GGN (poliglicinas) ha sido asociado a la incidencia de hipospadias, aunque lo discutiremos entre los factores genéticos de predisposición o polimorfismos, excepto cuando el aumento de repeticiones CAG es claramente superior a 37 y condiciona la distrofia muscular bulboespinal o enfermedad de Kennedy que se asocia a una resistencia parcial a los andrógenos (OMIM 313200).

El segundo gen candidato por su frecuencia en las series de pacientes con hipospadias es el del enzima 5-alfa-reductasa de tipo 2 (*SRD5A2*). La herencia es autosómica recesiva por lo que los pacientes son homocigotos por consanguinidad o heterocigotos compuestos, aunque algunos pacientes presentan una sola mutación pero el fenotipo clínico y bioquímico es muy sugestivo del déficit⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

El gen *NR5A1* (proteína SF1) que codifica un factor de transcripción que regula la transcripción de varios genes implicados en los ejes hipotálamo-hipófiso-suprarrenal e hipotálamo-hipófiso-gonadal ha sido analizado a lo largo de la última década, de modo que mutaciones en heterocigosis están implicadas en la posible afectación del desarrollo y función de ambas gonadas, aunque el testículo manifiesta esta afectación ya en la etapa fetal, mientras que la afectación ovárica es más tardía y la afectación suprarrenal en humanos ha sido raramente descrita. Allali *et al*⁽¹⁸⁾ detectan mutaciones en el 6,5% de una serie de 77 pacientes con ADS 46,XY que incluye la presencia de hipospadias; Tantawy *et al*⁽¹⁹⁾ las detectan en el 8,5% de una serie de 50 pacientes egipcios; Camats *et al*⁽²⁰⁾ en el 9% de una serie de pacientes candidatos; Harrison

Tabla 1. Anomalías de la diferenciación sexual (ADS) de causa monogénica o cromosómica conocida con sus características fenotípicas y bioquímicas .

| Anomalía | Gen | OMIM ⁵ | Útero | Afectación suprarrenal | Anomalías asociadas | Diagnóstico bioquímico |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------|-------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Anomalías de la diferenciación sexual (ADS) con cariotipo 46,XX por anomalías del desarrollo ovárico | | | | | | |
| Translocación SRY | SRY | 480000 | + / - | - | - | Respuesta a hCG (↑andrógenos) |
| Duplicación SOX9 | SOX9 | 114290 | + / - | - | - | Respuesta a hCG (↑andrógenos) |
| Hiperqueratosis palmoplantar en hombres 46,XX | RSPO1 | 610644 | + / - | - | Hiperqueratosis palmoplantar carcinomas | Respuesta a hCG (↑andrógenos) |
| Anomalías de la diferenciación sexual (ADS) con cariotipo 46,XX por exceso de andrógenos | | | | | | |
| Déficit 3β-hidroxiesteroido deshidrogenasa tipo 2 | HSD3B2 | 201810 | + | + | Virilización parcial por conversión periférica de DHEA | ↑ACTH ↑cociente ₅ / ₄ Déficit mineralocorticoides +/- |
| Déficit de 21-hidroxilasa | CYP21A2 | 201910 | + | + | Virilización precoz | ↑ACTH, ↑17-OHP Déficit mineralocorticoides +/- |
| Déficit de 11β-hidroxilasa | CYP11B1 | 202010 | + | + | Virilización precoz, hipertensión por DOCA, pero normotensión o pérdida de sal en el lactante | ↑ACTH, ↑DOCA, ↑11-desoxicortisol |
| Déficit de P450-oxido-reductasa | POR | 124015 | + | + | Síndrome de Antley-Bixler, craniosinostosis (+/-) | Características mixtas de déficit de 21-hidroxilasa y de 17α-hidroxilasa/17,20-desmolasa, pérdida salina poco frecuente |
| Déficit de aromatasa | CYP19 | 107910 | + | - | Virilización materna, ausencia desarrollo mamario, ovarios poliquísticos, retraso maduración ósea | ↑ ₄ , ↑T ↓Estrógenos ↑FSH/LH |
| Resistencia a glucocorticoides | GR _α (NR3C1) | 138040 | + | - | Hipertensión | ↑ACTH, 17-OHP, cortisol, mineralocorticoides y andrógenos No supresión por dexametasona |
| Anomalías de la diferenciación sexual (ADS) con cariotipo mosaico 46,X/46,XY | | | | | | |
| Disgenesia gonal mixta | - | | + / - | - | Características de síndrome de Turner (+ / -) | - |

| Anomalía | Gen | OMIM ⁵ | Útero | Afectación suprarrenal | Anomalías asociadas | Diagnóstico bioquímico |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|-------|------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Anomalías de la diferenciación sexual (ADS) con cariotipo 46,XY por anomalías del desarrollo testicular (disgenesia gonadal) | | | | | | |
| WAGR, síndromes de Denys-Drash y de Frasier | WT1 | 607102 | + / - | - | Tumor de Wilms, anomalías renales, tumores gonadales | Proteinuria |
| Steroidogenic factor1 | NR5A1 | 184757 | + / - | + / - | Hipogonadismo hipogonadotropo parcial (+/-) | Déficit de biosíntesis de andrógenos, déficit de biosíntesis suprarrenal (+/-) |
| SRY | SRY | 480000 | + / - | - | - | - |
| SOX9 | SOX9 | 114290 | + / - | - | Displasia campomélica | - |
| Ovarios en 46,XY | CBX2 | 602770 | + | - | - | LH N, ↑FSH AMH indetectable |
| Desert hedgehog | DHH | 605423 | + | - | Neuropatía minifascicular (+/-) | - |
| Lisencefalía ligada al X | ARX | 300382 | - | - | Lisencefalía, epilepsia | - |
| Síndrome SIDDT | TSPYL1 | 604714 | - | - | Muerte súbita infantil | - |
| Delección 9p24.3 | DMRT1 | 602424 | + / - | - | Retardo mental | - |
| Delección Xq13.3 | ATRX | 300032 | - | - | Retardo mental, a-talasemia | - |
| Duplicación Xp21 | DAX1 | 300018 | + / - | - | - | - |
| Duplicación 1q35 | WNT4 (?) | 603490 | + / - | - | - | - |
| Disgenesia testicular | GATA4 | 600576 | - | - | Cardiopatía congénita familiar | - |
| Disgenesia testicular | MAP3K1 | 613762 | + / - | - | - | - |
| Disgenesia testicular | FOG2 | 603693 | + / - | - | Cardiopatía congénita. Hernia diafragmática | - |
| Anomalías de la diferenciación sexual (ADS) con cariotipo 46,XY por anomalías en la secreción o la acción de andrógenos | | | | | | |
| LH anómala | LH β | 152780 | - | - | LH bioinactiva | Déficit andrógenos testiculares Respuesta a hCG |
| Insensibilidad a la LH/CG | LHCGR | 152790 | - | - | Aplasia/ Hipoplasia de células de Leydig | Déficit andrógenos testiculares ↑LH No respuesta ó ↓respuesta hCG |

| Anomalía | Gen | OMIM ⁵ | Útero | Afectación suprarrenal | Anomalías asociadas | Diagnóstico bioquímico |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|-------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Síndrome de Smith-Lemli-Opitz | DHCR7 | 602858 | - | + / - | Facies tosca, sindactilia pie, retraso psicomotor, anomalías cardíacas y viscerales | ↑7-dehidro-colesterol |
| Hiperplasia suprarrenal lipoidea | STAR | 600617 | - | + | Acúmulo lípidos suprarrenales, fallo puberal | Déficit de todos los esteroides (suprarrenales y gonadales) ↑ACTH |
| Déficit de colesterol desmolasa | CYP11A1 | 118485 | - | + | Fallo puberal | Déficit de todos los esteroides (suprarrenales y gonadales) |
| Déficit de 3β-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa | HSD3B2 | 201810 | - | + | Fallo puberal | Cociente $\frac{5}{4}$ déficit mineralocorticoide (+/-) ↑ACTH |
| Déficit de 17α-hidroxilasa/17,20-desmolasa | CYP17 | 202110 | - | + | Hipertensión por ↑DOCA (excepto en déficit aislado de 17,20 -desmolasa) Fallo puberal | ↑Pregnenolona, progesterona, DOCA ↓esteroides 17-hidroxilados (17-OHP, $\frac{4}{4}$, cortisol) Déficit andrógenos suprarrenales y gonadales ↑LH, ACTH |
| Déficit de P450-oxido-reductasa | POR | 124015 | - | + | Síndrome de Antley-Bixler, craniosinostosis (+/-) | Características mixtas de déficit de 21-hidroxilasa y de 17α-hidroxilasa/17,20-desmolasa, pérdida salina poco frecuente |
| Déficit de 17β-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa tipo 3 (17-ceto-reductasa) | HSD17B3 | 605573 | - | - | Virilización parcial durante pubertad | ↓cociente testosterona/ $\frac{4}{4}$ ($<0,6$) |
| Déficit de 5α-reductasa tipo 2 | SRD5A2 | 607306 | - | - | Virilización parcial durante pubertad | ↑cociente testosterona/DHT (>20 , test hCG) |
| Resistencia a andrógenos | AR | 313700 | - | - | - | Aumento variable de testosterona y LH/FSH |
| Anomalías de la diferenciación sexual (ADS) con cariotipo 46,XY por anomalías en la secreción o la acción del factor inhibidor de los conductos de Müller u hormona anti-Mülleriana | | | | | | |
| Persistencia conductos de Müller (hernia uterina inguinal) | AMH o MIIF | 600957 | + | - | Criptorquidia | ↓AMH |
| Persistencia conductos de Müller (hernia uterina inguinal) | AMHR | 600956 | + | - | Criptorquidia | ↑AMH |

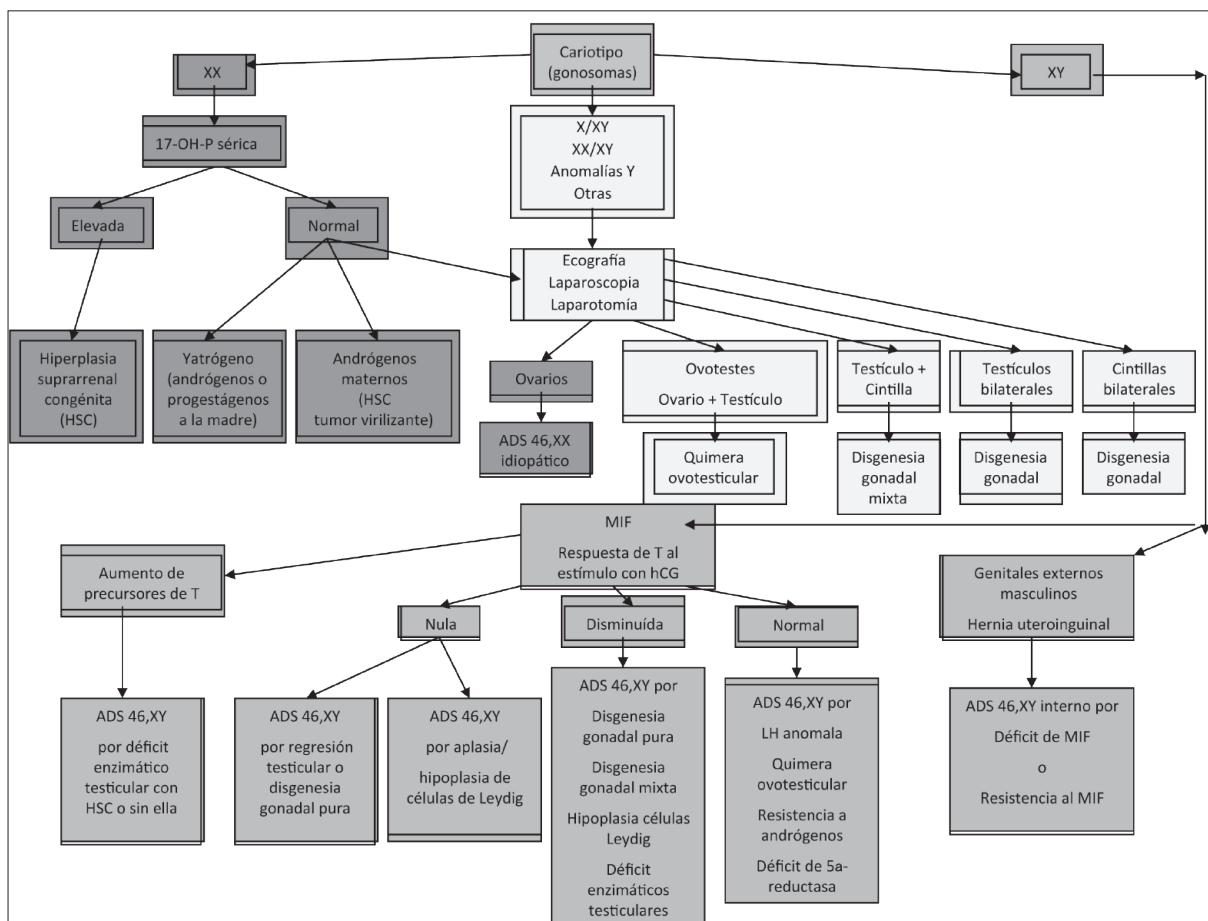


Figura 1. Algoritmo diagnóstico de las anomalías de la diferenciación sexual (ADS/DSD) según los cariotipos, las técnicas de imagen y los resultados de las determinaciones hormonales.

et al⁽²¹⁾ describen la transmisión materna de una microdelección que engloba este gen en un niño con hipospadias, aunque no detectan ningún otro caso en una pequeña serie de pacientes con ADS 46,XY sin causa conocida. La incidencia de mutaciones en este gen sigue aumentando en las series de diversos autores^(20, 22, 23) y se describe un paciente con niveles elevados de T y de gonadotrofinas en el período neonatal⁽²⁴⁾.

Se han detectado mutaciones en el gen *MAMLD1* (*CXOrf6*) (codifica una proteína de una vía de señalización Notch cuya región codificante está controlada por SF1) en niños con hipospadias leves (anteriores) y también severos (posteriores) con secreción normal de T, siendo por lo tanto uno de los genes candidatos para la etiología del hipospadias sin alteraciones hormonales detectables o cuando se han descartado la presencia de mutaciones en *AR*, *SRD5A2* y *NR5A1*⁽²⁵⁻²⁸⁾.

El gen *WT1* codifica la proteína Wilms tumor 1 que interviene en el desarrollo embrionario del sistema urogenital. Sus mutaciones inactivadoras provocan nefropatía, con o sin tumor de Wilms, y disgenesia testicular de grados variables en los 46,XY: su diag-

nóstico es relevante en los síndromes que asocian nefropatía y disgenesia testicular con (síndrome de Denys-Drash) o sin (síndrome de Frasier) tumor de Wilms, pero también se han descrito mutaciones en pacientes con hipospadias sin nefropatía⁽²⁹⁾.

El gen *SRY*, localizado en el cromosoma Y, cuya proteína es determinante para el inicio de la diferenciación del testículo, presenta mutaciones inactivadoras en pacientes con disgenesia gonadal pura y cariotipo 46,XY y fenotipo completo (síndrome de Swyer); sin embargo, la incidencia de mutaciones en formas parciales que se manifiestan con un hipospadias es muy baja⁽²⁹⁾.

Las formas más leves de mutaciones en el gen *LHCGR* pueden manifestarse como micropene y/o hipospadias o sólo como infertilidad sin ambigüedad genital⁽³⁰⁾. Las mutaciones con efecto menos grave en el gen *CYP11A1* (proteína colesterol desmolasa) pueden manifestarse con un fenotipo de hipospadias severo pudiendo la insuficiencia suprarrenal no provocar una clínica grave hasta los 2 años de edad⁽³¹⁾. También las mutaciones inactivadoras en otros genes de enzimas de la esteroidogénesis provocan en los 46,XY una ADS/DSD con

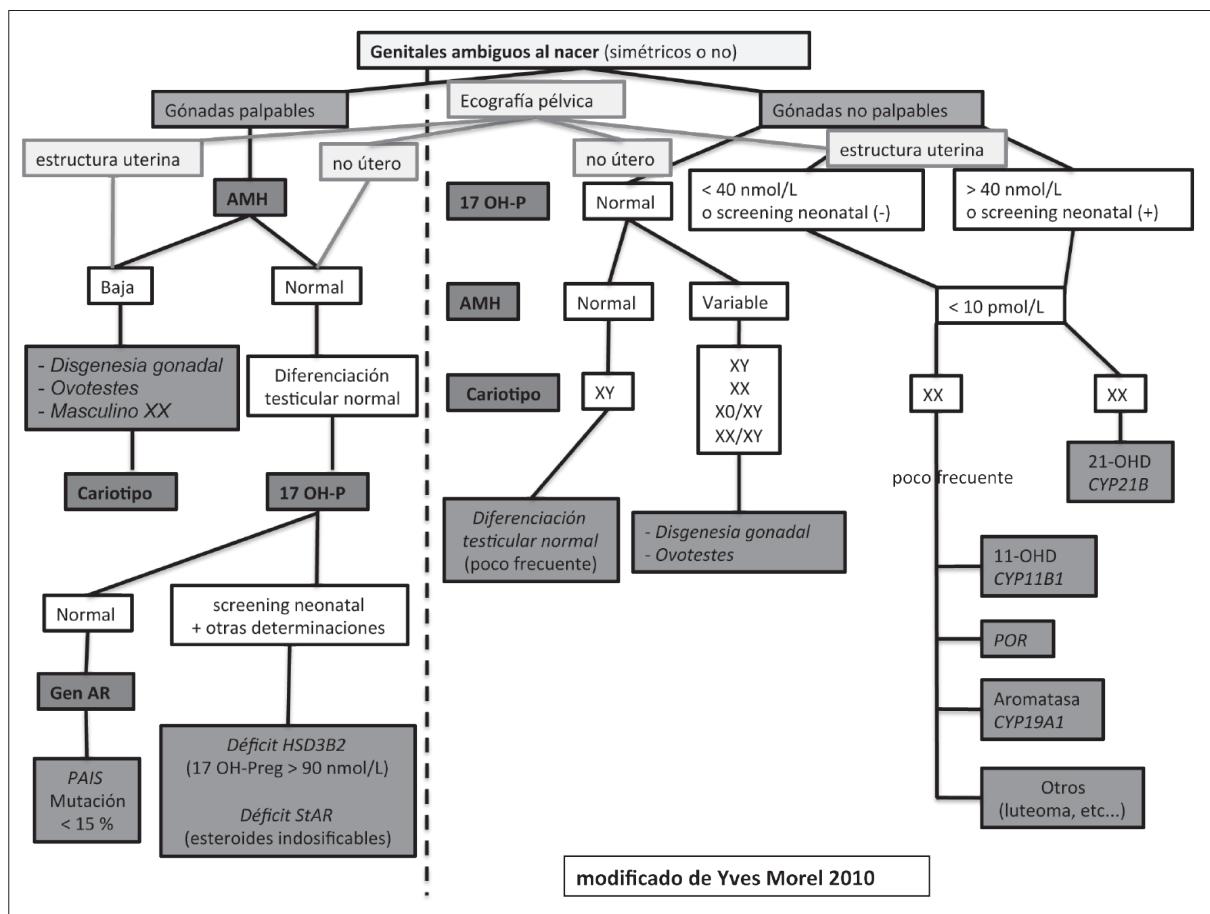


Figura 2. Algoritmo diagnóstico ante un recién nacido con genitales ambiguos, en función de la ecografía pélvica, la palpación de gonadas, el cariotipo y las determinaciones hormonales.

fenotipo completo (genitales externos femeninos) o parcial (hipospadias), con o sin afectación de la suprarrenal dependiendo del enzima. Rara vez las mutaciones en *HSD3B2* provocan un hipospadias sin afectación grave de la función suprarrenal⁽³²⁾. Las mutaciones en *CYP17A1* suelen también provocar un fenotipo completo, aunque las mutaciones que sólo afectan a la actividad 17,20-desmolasa no afectan la esteroidogénesis suprarrenal y pueden dar lugar a fenotipos parciales^(33, 34). Finalmente, las mutaciones en *HSD17B3* (déficit de 17-cetoreductasa o 17-beta-hidroxiesteroidoide deshidrogenasa) sólo afectan a la esteroidogénesis gonadal y los fenotipos suelen manifestarse con ambigüedad genital al nacer^(35, 36).

En la serie de 140 pacientes con cariotipo 46,XY y genitales ambiguos, por lo tanto todos ellos afectos de hipospadias, en los que nosotros hemos analizado algunos genes candidatos, el orden de frecuencia de genes en los que se han detectado mutaciones es el siguiente: *AR* (12,9%), *SRD5A2* (7,9%), *NR5A1* (5,0%), *MAMLD1* (4,3%), *HSD17B3* (2,9%), *HSD3B2* (0,7%), *LHCGR* (0,7%), delecciones autosómicas y otros síndromes asociados (3,6%) y causa desconocida (62,0%).

Otros genes cuyas proteínas intervienen en el desarrollo de la piel que recubre los cuerpos cavernosos que envuelven la uretra masculina son *HOXA4* y *HOXB6* y en ellos se han detectado mutaciones inactivadoras en pacientes con hipospadias^(37, 38).

Factores genéticos de predisposición (polimorfismos)

Diversos autores han analizado los genotipos para variantes polimórficas en diversos genes, habiendo podido describir asociaciones entre algunos genotipos y la incidencia de hipospadias.

Uno de los genes más analizado ha sido *AR* porque es conocido que el polimorfismo consistente en un número variable de repeticiones CAG (poliglutaminas) en el exón 1, modifica la actividad transcripcional del gen. Un estudio sueco en 211 hipospadias y 208 controles detecta un número superior de repeticiones en los hipospadias y una frecuencia tres veces superior de formas largas del polimorfismo⁽³⁹⁾; también un estudio chileno detecta una asociación similar con el número de repeticiones CAG y no existe asociación para el número de repeticiones GGN (poliglicinas)⁽⁴⁰⁾. También se ha sugerido que

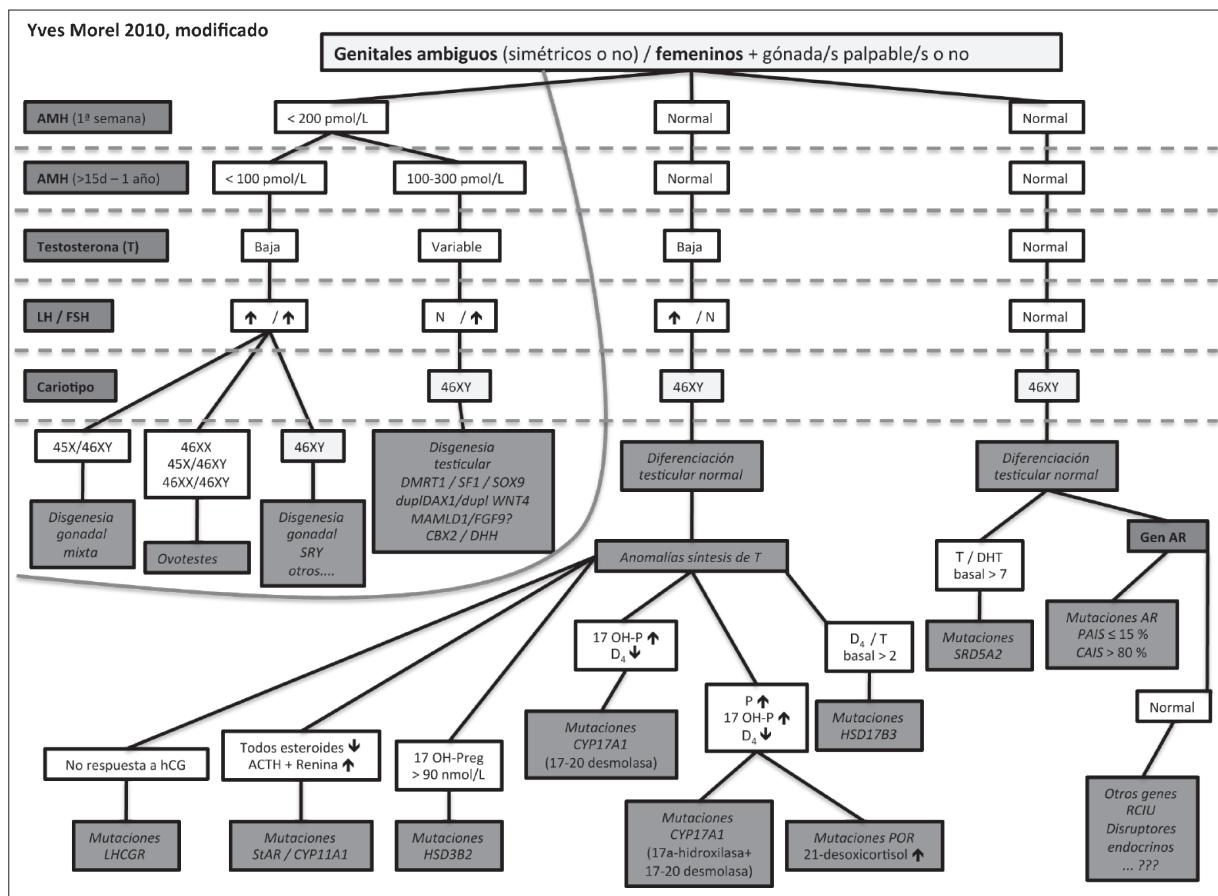


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de las anomalías de la diferenciación sexual (ADS/DSD) en función del seguimiento longitudinal de las determinaciones de AMH (hormona antimülleriana), T (testosterona) y gonadotrofinas LH y FSH en los cariotípicos 46,XY y en las anomalías del cariotipo.

la predisposición al hipospadias podría ser debida a cambios epigenéticos en el gen *AR*, puesto que el estado de metilación del gen *AR* en fibroblastos de piel genital está aumentado en los niños con hipospadias frente a controles normales⁽⁴¹⁾.

Un estudio reciente ha analizado 332 SNPs (polimorfismos) en 20 genes relacionados con la biosíntesis y el metabolismo de los esteroides sexuales en 633 niños con hipospadias de diversos grados y 855 niños control, demostrando los resultados asociaciones significativas entre el hipospadias y los genotipos en varios de estos genes (entre ellos *CYP3A4*, *HSD17B3*, *HSD3B1*, *STARD3*, *SRD5A2* y *STS*)⁽⁴²⁾. En otros estudios, los genotipos de los receptores tipo 1 (*ESR1*) y tipo 2 (*ESR2*) para el estradiol han sido asociados al hipospadias^(43, 44). Otros genes asociados al hipospadias son el del factor activador de la transcripción 3 (*ATF3*)⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾, variantes del gen de la 5-alfa-reductasa tipo 2 (*SRD5A2*)^(29, 47) y los genes *FGFR2* y *FGF8*⁽³⁷⁾. Un estudio holandés realizado en 712 hipospadias ha analizado si existen interacciones entre genotipos de predisposición y factores maternos y/o medioambientales: se determinaron 4 SNPs para los genes *SRD5A2*, *ESR1*, *ESR2* y *ATF3* y se analizaron datos de exposición a

estrógenos, citoquinas, tabaco, gestaciones múltiples, ser pequeño para la edad gestacional (PEG), hipertensión materna o preeclampsia, BMI y primiparidad; los resultados demuestran que sólo existen asociaciones de genotipos combinados con algún otro dato, así el rs523349 de *SRD5A2* interacciona con la exposición a estrógenos y la preeclampsia o hipertensión materna, los genotipos de *ATF3* con la exposición a citoquinas y el rs6932902 de *ESR1* de origen materno aumenta el riesgo de hipospadias⁽⁴⁸⁾. Otro estudio realizado en California en 665 hipospadias frente a 928 controles nacidos entre 1990 y 2003 ha analizado 27 SNPs en el gen de la diacilgliceroquinasa K (*DGKK*) localizado en el cromosoma X, concluyendo que para 8 variantes que conforman dos haplotipos, el riesgo de presentar hipospadias se multiplica por 3,3 para los grados severos y por 4,1 para los leves y moderados⁽⁴⁹⁾. También se han detectado asociaciones entre la incidencia de criptorquidia e hipospadias con genotipos de genes implicados en el metabolismo de disruptores endocrinos en contaminantes ambientales (*CYP1A1*)⁽⁵⁰⁾. Varios polimorfismos en genes cuyas proteínas están implicadas en el desarrollo del tubérculo genital y de la uretra han sido analizados describiéndose asociaciones con la incidencia

de hipospadias: 4 SNPs en *BMP7*, 5 en *FGF10*, 12 en *GLI1*, *GLI2* y *GLI3* y 1 en *SHH*⁽⁵¹⁾. Otros genes regulados por los estrógenos y con variaciones asociadas al hipospadias serían *CTGF* (factor de crecimiento del tejido conectivo) y *CYR61* (inductor angiogénico 61 rico en cisteínas)⁽⁵²⁾.

También hay variantes polimórficas que, por su estudio funcional, han sido descartadas como predisponentes al hipospadias, como es el caso de 2 variantes en el gen *NR5A1* (proteína SF1)⁽⁵³⁾, así como también del gen *MAMLD1* en la población china⁽⁵⁴⁾. Sin embargo los dos polimorfismos p.P286S y p.N589S del gen *MAMLD1* se presentan asociados y con frecuencias aumentadas en los niños con hipospadias⁽⁵⁵⁾.

El análisis de posibles alteraciones en el desarrollo de la programación epigenética que modifica el estado de metilación del DNA durante el desarrollo fetal ha identificado varios genes cuyo estado de metilación era significativamente distinto en 12 hipospadias con respecto a 8 controles, aunque sólo dos de ellos están más significativamente asociados (*SCARB1* y *MYBPH*)⁽⁵⁶⁾.

Síndromes genéticos que se asocian a hipospadias

Numerosos síndromes de origen genético (de causa mono o multigénica o por cambios estructurales cromosómicos o por aneuploidías) asocian un hipospadias en los 46,XY. Ello da cuenta del gran número de genes implicados en la diferenciación genital masculina, no sólo en las vías clásicas endocrinas sino también en las implicadas en la morfogénesis. En estos casos, el hipospadias puede ir asociado al fenotipo pero no es específico, por lo que otros signos y síntomas del fenotipo son los que pueden orientar el diagnóstico. Sirvan como referencia las clasificaciones más recientes⁽⁴⁾. Los hipospadias asociados a síndromes complejos representan menos del 10% del total de ellos⁽⁵⁷⁾.

FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS MATERNALES, PLACENTARIOS Y MEDIOAMBIENTALES

Las series más recientes que refieren incidencia de hipospadias en poblaciones pediátricas de sexo masculino son: en la población china de 3 a 6 años su incidencia sería relativamente baja (0,2%)⁽⁵⁸⁾; en una amplia población pediátrica de Texas, el 0,9% de los recién nacidos de sexo masculino presentaba algún tipo de malformación genital, siendo la incidencia del hipospadias de cualquier grado del 0,4%, representando el 51,6% de todas estas malformaciones⁽⁵⁹⁾, detectándose múltiples asociaciones con el número previo de embarazos y factores maternos; un estudio sueco publicado recientemente analiza la incidencia y factores de riesgo en su población entre los años 1973 y 2009, observán-

dose una incidencia de 0,45% en recién nacidos masculinos hasta el año 1990, aumentando dicha incidencia a 0,8% durante la década siguiente, siendo la incidencia superior en los PEG, gemelos, productos de fertilización *in vitro* o padres procedentes de Asia y Europa continental⁽⁶⁰⁾. El estudio epidemiológico realizado en Arkansas sobre prevalencia del hipospadias en nacidos entre los años 1998 y 2007 muestra una incidencia de 0,74%, con un 60,7% de formas anteriores, 18,8% intermedias y 4,6% proximales; la prevalencia aumentó desde 0,669% entre 1998 y 2002 a 0,81% entre 2003 y 2007, aunque los autores reconocen que este aumento podría ser debido a la mejora en los sistemas de detección y declaración⁽⁶¹⁾.

Entre los *factores fetales y placentarios* todas las series describen una mayor incidencia de hipospadias en los recién nacidos con retraso intrauterino del crecimiento (RIUC) con o sin prematuridad con respecto a los adecuados para la edad gestacional (AEG) y a término⁽⁶²⁻⁶⁴⁾. En diversos estudios refieren haber analizado posibles causas genéticas, siendo en ellos mucho menor la incidencia de mutaciones en genes candidatos para ADS/DSD. Se desconoce el mecanismo por el cual la incidencia de hipospadias es mayor en estos niños, proponiendo algunos autores la asignación de una categoría específica a este hipospadias asociado a RCIU/PEG. Se hipotetiza que podría ser consecuencia de un retraso o cronopatía de la maduración global, que englobaría el desarrollo genital.

También se demuestra que la incidencia de malformaciones genitales como el hipospadias es superior en los niños concebidos mediante técnicas de reproducción asistida, aunque es similar en los nacidos de parejas con problemas de fertilidad, hayan utilizado estas técnicas o no⁽⁶⁵⁾.

Entre los *factores maternos*, diversos estudios epidemiológicos parecen indicar que diversos factores podrían aumentar la incidencia de hipospadias. Entre ellos están el tabaco (aunque éste también ha sido desmentido), la obesidad⁽⁶⁶⁾, la hipertensión arterial no tratada o tratada tarde y la pre-eclampsia^(67, 68), el tratamiento con ácido valproico⁽⁶⁹⁾, nistatina y estrógenos⁽⁷⁰⁾ y la diabetes tipo 1⁽⁷¹⁾. También la incidencia materna de hipertensión y oligohidramnios es superior en los RN PEG con hipospadias⁽⁶³⁾. En cuanto a la edad materna un estudio en EE.UU. asocia la edad materna ≥ 40 años a un aumento de varias malformaciones, entre ellas el hipospadias⁽⁷²⁾, la edad temprana de la menarqua⁽⁷³⁾ y la primiparidad^(74, 75). En cambio, un estudio sobre factores dietéticos maternos no ha conseguido demostrar ninguna asociación⁽⁷⁶⁾.

Finalmente, los *factores medioambientales* van siendo analizados a lo largo de los últimos 20 años

(3, 27, 77). Por una parte, numerosos trabajos en animales de experimentación han demostrado que productos contaminantes ambientales, procedentes tanto de la contaminación atmosférica como del uso de fertilizantes e insecticidas, así como plásticos incorporados en utensilios y envases de uso doméstico, tienen efectos inhibidores de las acciones de los andrógenos, generalmente por actuar como estrógenos débiles. También se ha podido demostrar *in vitro* en cultivos de fibroblastos procedentes de piel genital de pacientes con hipospadias que las dosis bajas de BPA (bisfenol) inhiben la expresión génica, entre ellos la de la metallopeptidasa de la matriz (MMP11) (78). Los estudios en humanos son epidemiológicos: grados de contaminación medioambiental e incidencia de hipospadias y/o de criotorquidia en determinadas áreas y épocas y, también, incidencia de infertilidad y cáncer testicular en hombres, en función del área geográfica de nacimiento y/o de residencia y contaminación medioambiental. La exposición materna a pesticidas ha sido asociada a una mayor incidencia de criotorquidia, hipospadias y micropene (79-81). Se han publicado trabajos que demuestran que las madres y padres, así como los niños que presentan hipospadias tienen en su cabello concentraciones muy superiores de pesticidas organofosforados y organoclorados que la población general o sin hipospadias (82). Sin embargo, algunos trabajos que han intentado relacionar la exposición materna temprana a diversos productos pesticidas aplicados en su área de residencia no han logrado asociar la incidencia de hipospadias con dicha exposición, por ejemplo un estudio reciente en 8 áreas de California (83), aunque en este trabajo no se ha medido la posible contaminación personal. Un estudio sueco ha cuantificado las concentraciones de varios contaminantes organoclorados en el suero de madres que tuvieron un varón con o sin hipospadias, llegándose a la conclusión de que en los cuartiles superiores de concentraciones de hexaclorobenceno y de p,p'-DDE es 1,65 y 1,69 veces más frecuente el hipospadias (84). En Corea, las concentraciones en orina y plasma de algunos disruptores endocrinos [DEHP (2-etiletil-fthalato), n-NP (n-nonalfenol) y PA (ácido ftálico)], eran significativamente superiores en los niños con hipospadias, no siéndolo en sus madres (85). También se ha demostrado que la exposición de los soldados neozelandeses a DBP (dibutilftalato) por su uso en los uniformes militares como acaricida entre los años 1948 y 1960 ha aumentado la incidencia de hipospadias, criotorquidia y cáncer de mama en su descendencia; se trata pues de un efecto multigeneracional tras la exposición de humanos de sexo masculino (86). Un estudio reciente realizado en Dinamarca (todos los niños nacidos entre 1980 y 2007) ha descartado la posible asociación entre la exposición materna a productos utilizados en las peluquerías y la incidencia de criotorquidia o de hipospadias (87).

REFERENCIAS

- Laios K, Karamanou M, Androutsos G 2012 A unique representation of hypospadias in ancient Greek art. *Can Urol Assoc J* 6:E1-2.
- Bouvattier C 2013 [How and when to evaluate hypospadias?]. *Arch Pediatr 20 Suppl* 1:S5-S10.
- Blaschko SD, Cunha GR, Baskin LS 2012 Molecular mechanisms of external genitalia development. *Differentiation* 84:261-268.
- Shih EM, Graham JM, Jr. 2014 Review of genetic and environmental factors leading to hypospadias. *Eur J Med Genet*.
- Carmichael SL, Shaw GM, Lammer EJ 2012 Environmental and genetic contributors to hypospadias: a review of the epidemiologic evidence. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94:499-510.
- Hsieh MH, Eisenberg ML, Hittelman AB, Wilson JM, Tasian GE, Baskin LS 2012 Caucasian male infants and boys with hypospadias exhibit reduced anogenital distance. *Hum Reprod* 27:1577-1580.
- Thankamony A, Lek N, Carroll D, Williams M, Dunger DB, Acerini CL, Ong KK, Hughes IA 2014 Anogenital distance and penile length in infants with hypospadias or cryptorchidism: comparison with normative data. *Environ Health Perspect* 122:207-211.
- Audí Parera L, Gracia Bouthelier R, Castaño González L, Carrascosa Lezcano A, Barreiro Conde J, Bermúdez de la Vega JA, Gutiérrez Macías A; Grupo de Trabajo sobre Anomalías de la Diferenciación Sexual de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica 2011 Anomalías de la diferenciación sexual. In: Junta Directiva de la SEEP: Juan Pedro López Siguero (Presidente) María Chueca Guindulain (Secretaria), Ana Lucía Gómez Gila (Tesorera), Sofía Quinteiro González (Vocal), Beatriz García Cuartero (Vocal) y Alfonso Lechuga Sancho (Vocal) ed. Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos en Pediatría: *Ex Libris*; pp. 1-12.
- Adam MP, Fechner PY, Ramsdell LA, Badaru A, Grady RE, Pagon RA, McCauley E, Cheng EY, Parisi MA, Shnorhavorian M 2012 Ambiguous genitalia: what prenatal genetic testing is practical? *Am J Med Genet A* 158A:1337-1343.
- Schnack TH, Zdravkovic S, Myrup C, Westergaard T, Christensen K, Wohlfahrt J, Melbye M 2008 Familial aggregation of hypospadias: a cohort study. *Am J Epidemiol* 167:251-256.
- Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA 2006 Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child* 91:554-563.

12. Deeb A, Mason C, Lee YS, Hughes IA 2005 Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63:56-62.
13. Audi L, Fernandez-Cancio M, Carrascosa A, Andaluz P, Toran N, Piro C, Vilaro E, Vicens-Calvet E, Gussinye M, Albusu MA, Yeste D, Clemente M, Hernandez de la Calle I, Del Campo M, Vendrell T, Blanco A, Martinez-Mora J, Granada ML, Salinas I, Forn J, Calaf J, Angerri O, Martinez-Sopena MJ, Del Valle J, Garcia E, Gracia-Bouthelier R, Lapunzina P, Mayayo E, Labarta JI, Lledo G, Sanchez Del Pozo J, Arroyo J, Perez-Aytes A, Beneyto M, Segura A, Borras V, Gabau E, Caimari M, Rodriguez A, Martinez-Aedo MJ, Carrera M, Castano L, Andrade M, Bermudez de la Vega JA, GrApSIA 2010 Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1876-1888.
14. Kalfa N, Philibert P, Werner R, Audran F, Bashamboo A, Lehors H, Haddad M, Guys JM, Reynaud R, Alessandrini P, Wagner K, Kurzenne JY, Bastiani F, Breaud J, Valla JS, Lacombe GM, Orsini M, Daures JP, Hiort O, Paris F, McElreavey K, Sultan C 2013 Minor hypospadias: the “tip of the iceberg” of the partial androgen insensitivity syndrome. *PLoS One* 8:e61824.
15. 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 5alpha-reductase deficiency: report of three new SRD5A2 gene mutations. *Int J Androl* 33:841-847.
16. Maimoun L, Philibert P, Cammas B, Audran F, Bouchard P, Fenichel P, Cartigny M, Pienkowski C, Polak M, Skordis N, Mazen I, Ocal G, Berberoglu M, Reynaud R, Baumann C, Cabrol S, Simon D, Kayemba-Kay's K, De Kerdanet M, Kurtz F, Leheup B, Heinrichs C, Tenoutasse S, Van Vliet G, Gruters A, Eunice M, Ammini AC, Hafez M, Hochberg Z, Einaudi S, Al Mawlawi H, Nunez CJ, Servant N, Lumbroso S, Paris F, Sultan C 2011 Phenotypical, biological, and molecular heterogeneity of 5alpha-reductase deficiency: an extensive international experience of 55 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 96:296-307.
17. Fernandez-Cancio M, Audi L, Andaluz P, Toran N, Piro C, Albusu M, Gussinye M, Yeste D, Clemente M, Martinez-Mora J, Blanco A, Granada ML, Marco M, Ferragut J, Lopez-Siguero JP, Beneyto M, Carles C, Carrascosa A 2011 SRD5A2 gene mutations and polymorphisms in Spanish 46,XY patients with a disorder of sex differentiation. *Int J Androl* 34:e526-535.
18. Allali S, Muller JB, Brauner R, Lourenco D, Boudjenah R, Karageorgou V, Trivin C, Lottmann H, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fekete C, De Dreuxy O, McElreavey K, Bashamboo A 2011 Mutation analysis of NR5A1 encoding steroidogenic factor 1 in 77 patients with 46,XY disorders of sex development (DSD) including hypospadias. *PLoS One* 6:e24117.
19. Tantawy S, Mazen I, Soliman H, Anwar GM, Atef A, El-Gammal M, El-Kotoury A, Mekkawy M, Torky A, Rudolf A, Schrumpf P, Gruters A, Krude H, Dumargne MC, Astudillo R, Bashamboo A, Bieermann H, Koehler B 2014 Analysis of the gene coding for Steroidogenic Factor 1 (SF-1, NR5A1) in a cohort of fifty Egyptian patients with 46,XY disorders of sex development. *Eur J Endocrinol* Mar 3.
20. Camats N, Pandey AV, Fernandez-Cancio M, Andaluz P, Janner M, Toran N, Moreno F, Bereket A, Akcay T, Garcia-Garcia E, Munoz MT, Gracia R, Nistal M, Castano L, Mullis PE, Carrascosa A, Audi L, Fluck CE 2012 Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1294-1306.
21. Harrison SM, Campbell IM, Keays M, Granberg CF, Villanueva C, Tannin G, Zinn AR, Castrillon DH, Shaw CA, Stankiewicz P, Baker LA 2013 Screening and familial characterization of copy-number variations in NR5A1 in 46,XY disorders of sex development and premature ovarian failure. *Am J Med Genet A* 161:2487-2494.
22. El-Khairi R, Achermann JC 2012 Steroidogenic factor-1 and human disease. *Semin Reprod Med* 30:374-381.
23. Ciaccio M, Costanzo M, Guercio G, De Dona V, Marino R, Ramirez PC, Galeano J, Warman DM, Berensztein E, Saraco N, Baquedano MS, Chaler E, Maceiras M, Lazzatti JM, Rivarola MA, Belgorosky A 2012 Preserved fertility in a patient with a 46,XY disorder of sex development due to a new heterozygous mutation in the NR5A1/SF-1 gene: evidence of 46,XY and 46,XX gonadal dysgenesis phenotype variability in multiple members of an affected kindred. *Horm Res Paediatr* 78:119-126.
24. Wu JY, McGown IN, Lin L, Achermann JC, Harris M, Cowley DM, Aftimos S, Neville KA, Choong CS, Cotterill AM 2013 A novel NR5A1 variant in an infant with elevated testosterone from an Australasian cohort of 46,XY patients with disorders of sex development. *Clin Endocrinol (Oxf)* 78:545-550.
25. Ogata T, Sano S, Nagata E, Kato F, Fukami M 2012 MAMLD1 and 46,XY disorders of sex development. *Semin Reprod Med* 30:410-416.

26. Mendonca BB, Domenice S, Arnhold IJ, Costa EM 2009 46,XY disorders of sex development (DSD). *Clin Endocrinol (Oxf)* 70:173-187.
27. van der Zanden LF, van Rooij IA, Feitz WF, Franke B, Knoers NV, Roeleveld N 2012 Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. *Hum Reprod Update* 18:260-283.
28. Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill J, Pinto G, Manouvrier S, Polak M, Ogata T, Sultan C 2012 Screening of MAMLD1 mutations in 70 children with 46,XY DSD: identification and functional analysis of two new mutations. *PLoS One* 7:e32505.
29. 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* 12:706-712.
30. Latronico AC, Arnhold IJ 2012 Inactivating mutations of the human luteinizing hormone receptor in both sexes. *Semin Reprod Med* 30:382-386.
31. Parajes S, Chan AO, But WM, Rose IT, Taylor AE, Dhir V, Arlt W, Krone N 2012 Delayed diagnosis of adrenal insufficiency in a patient with severe penoscrotal hypospadias due to two novel P450 side-change cleavage enzyme (CYP11A1) mutations (p.R360W; p.R405X). *Eur J Endocrinol* 167:881-885.
32. Codner E, Okuma C, Iniguez G, Boric MA, Avila A, Johnson MC, Cassorla FG 2004 Molecular study of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene type II in patients with hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab* 89:957-964.
33. Geller DH, Auchus RJ, Mendonca BB, Miller WL 1997 The genetic and functional basis of isolated 17,20-lyase deficiency. *Nat Genet* 17:201-205.
34. Van Den Akker EL, Koper JW, Boehmer AL, Themmen AP, Verhoef-Post M, Timmerman MA, Otten BJ, Drop SL, De Jong FH 2002 Differential inhibition of 17alpha-hydroxylase and 17,20-lyase activities by three novel missense CYP17 mutations identified in patients with P450c17 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5714-5721.
35. Andersson S, Geissler WM, Wu L, Davis DL, Grumbach MM, New MI, Schwarz HP, Blethen SL, Mendonca BB, Bloise W, Witchel SF, Cutler GB, Jr., Griffin JE, Wilson JD, Russel DW 1996 Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 81:130-136.
36. Bilbao JR, Loridan L, Audi L, Gonzalo E, Cas-
tano L 1998 A novel missense (R80W) mutation in 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 gene associated with male pseudohermaphroditism. *Eur J Endocrinol* 139:330-333.
37. Beleza-Meireles A, Lundberg F, Lagerstedt K, Zhou X, Omrani D, Frisen L, Nordenskjold A 2007 FGFR2, FGF8, FGF10 and BMP7 as candidate genes for hypospadias. *Eur J Hum Genet* 15:405-410.
38. Chen T, Li Q, Xu J, Ding K, Wang Y, Wang W, Li S, Shen Y 2007 Mutation screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet* 15:23-28.
39. Adamovic T, Nordenskjold A 2012 The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene modifies the risk for hypospadias in Caucasians. *BMC Med Genet* 13:109.
40. Parada-Bustamante A, Lardone MC, Madariaga M, Johnson MC, Codner E, Cassorla F, Castro A 2012 Androgen receptor CAG and GGN polymorphisms in boys with isolated hypospadias. *J Pediatr Endocrinol Metab* 25:157-162.
41. Vottero A, Minari R, Viani I, Tassi F, Bonatti F, Neri TM, Bertolini L, Bernasconi S, Ghizzoni L 2011 Evidence for epigenetic abnormalities of the androgen receptor gene in foreskin from children with hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E1953-1962.
42. Carmichael SL, Witte JS, Ma C, Lammer EJ, Shaw GM 2014 Hypospadias and variants in genes related to sex hormone biosynthesis and metabolism. *Andrology* 2:130-137.
43. Beleza-Meireles A, Kockum I, Lundberg F, Soderhall C, Nordenskjold A 2007 Risk factors for hypospadias in the estrogen receptor 2 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3712-3718.
44. Sathyaranayana S, Swan SH, Farin FM, Wilkerson HW, Bamshad M, Grady R, Zhou C, Schwartz SM 2012 A pilot study of the association between genetic polymorphisms involved in estrogen signaling and infant male genital phenotypes. *Asian J Androl* 14:766-772.
45. Beleza-Meireles A, Tohonen V, Soderhall C, Schwentner C, Radmayr C, Kockum I, Nordenskjold A 2008 Activating transcription factor 3: a hormone responsive gene in the etiology of hypospadias. *Eur J Endocrinol* 158:729-739.
46. Kalfa N, Liu B, Klein O, Wang MH, Cao M, Baskin LS 2008 Genomic variants of ATF3 in patients with hypospadias. *J Urol* 180:2183-2188; discussion 2188.

47. Samtani R, Bajpai M, Vashisht K, Ghosh PK, Saraswathy KN 2011 Hypospadias risk and polymorphism in SRD5A2 and CYP17 genes: case-control study among Indian children. *J Urol* 185:2334-2339.
48. van der Zanden LF, Galesloot TE, Feitz WF, Brouwers MM, Shi M, Knoers NV, Franke B, Roeleveld N, van Rooij IA 2012 Exploration of gene-environment interactions, maternal effects and parent of origin effects in the etiology of hypospadias. *J Urol* 188:2354-2360.
49. Carmichael SL, Mohammed N, Ma C, Iovannisci D, Choudhry S, Baskin LS, Witte JS, Shaw GM, Lammer EJ 2013 Diacylglycerol kinase K variants impact hypospadias in a California study population. *J Urol* 189:305-311.
50. Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H 2012 Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet* 57:434-441.
51. Carmichael SL, Ma C, Choudhry S, Lammer EJ, Witte JS, Shaw GM 2013 Hypospadias and genes related to genital tubercle and early urethral development. *J Urol* 190:1884-1892.
52. Wang Z, Liu BC, Lin GT, Lin CS, Lue TF, Willeham E, Baskin LS 2007 Up-regulation of estrogen responsive genes in hypospadias: microarray analysis. *J Urol* 177:1939-1946.
53. Adamovic T, Chen Y, Thai HT, Zhang X, Markljung E, Zhao S, Nordenskjold A 2012 The p.G146A and p.P125P polymorphisms in the steroidogenic factor-1 (SF-1) gene do not affect the risk for hypospadias in Caucasians. *Sex Dev* 6:292-297.
54. Zhuang LK, Fu QH, Wang J, Sun J 2012 [Single-nucleotide polymorphisms of MAMLD1 and hypospadias in Chinese]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 18:727-730.
55. Kalfa N, Cassorla F, Audran F, Oulad Abdennabi I, Philibert P, Beroud C, Guys JM, Reynaud R, Alessandrini P, Wagner K, Bread J, Valla JS, Morisson Lacombe G, Daures JP, Baskin L, Fukami M, Ogata T, Sultan C 2011 Polymorphisms of MAMLD1 gene in hypospadias. *J Pediatr Urol* 7:585-591.
56. Choudhry S, Deshpande A, Qiao L, Beckman K, Sen S, Baskin LS 2012 Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in hypospadias. *J Urol* 188:1450-1455.
57. Manson JM, Carr MC 2003 Molecular epidemiology of hypospadias: review of genetic and environmental risk factors. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67:825-836.
58. Wan S, Wang Y, Gu S 2014 Epidemiology of male genital abnormalities: a population study. *Pediatrics* 133:e624-627.
59. Agopian AJ, Langlois PH, Ramakrishnan A, Canfield MA 2014 Epidemiologic features of male genital malformations and subtypes in Texas. *Am J Med Genet A* 164:943-949.
60. Nordenvall AS, Frisen L, Nordenstrom A, Lichtenstein P, Nordenskjold A 2014 Population based nationwide study of hypospadias in Sweden, 1973 to 2009: incidence and risk factors. *J Urol* 191:783-789.
61. Canon S, Mosley B, Chipollini J, Purifoy JA, Hobbs C 2012 Epidemiological assessment of hypospadias by degree of severity. *J Urol* 188:2362-2366.
62. Sekaran P, O'Toole S, Flett M, Cascio S 2013 Increased occurrence of disorders of sex development, prematurity and intrauterine growth restriction in children with proximal hypospadias associated with undescended testes. *J Urol* 189:1892-1896.
63. Huisma F, Thomas M, Armstrong L 2013 Severe hypospadias and its association with maternal-placental factors. *Am J Med Genet A* 161:2183-2187.
64. Nemec SF, Nemec U, Brugger PC, Bettelheim D, Weber M, Graham JM, Jr., Rimoin DL, Prayer D 2012 Male genital abnormalities in intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* 32:427-431.
65. Simpson JL 2014 Birth defects and assisted reproductive technologies. *Semin Fetal Neonatal Med*.
66. Carmichael SL, Shaw GM, Laurent C, Olney RS, Lammer EJ 2007 Maternal reproductive and demographic characteristics as risk factors for hypospadias. *Paediatr Perinat Epidemiol* 21:210-218.
67. Greenhill C 2014 Development: Hypospadias linked with maternal hypertension. *Nat Rev Endocrinol* 10:189.
68. Van Zutphen AR, Werler MM, Browne MM, Romitti PA, Bell EM, McNutt LA, Druschel CM, Mitchell AA 2014 Maternal hypertension, medication use, and hypospadias in the National Birth Defects Prevention Study. *Obstet Gynecol* 123:309-317.
69. Rodriguez-Pinilla E, Mejias C, Prieto-Merino D, Fernandez P, Martinez-Frias ML 2008 Risk of hypospadias in newborn infants exposed to valproic acid

- during the first trimester of pregnancy: a case-control study in Spain. *Drug Saf* 31:537-543.
70. Mavrogenis S, Urban R, Czeizel AE, Acs N 2013 Maternal risk factors in the origin of isolated hypospadias - a population-based case-control study. *Congenit Anom (Kyoto)*.
71. Porter MP, Faizan MK, Grady RW, Mueller BA 2005 Hypospadias in Washington State: maternal risk factors and prevalence trends. *Pediatrics* 115:e495-499.
72. Gill SK, Broussard C, Devine O, Green RF, Rasmussen SA, Reefhuis J 2012 Association between maternal age and birth defects of unknown etiology: United States, 1997-2007. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94:1010-1018
73. Giordano F, Abbalie A, De Felip E, di Domenico A, Ferro F, Grammatico P, Ingelido AM, Marra V, Marruccio G, Vallasciani S, Figa-Talamanca I 2010 Maternal exposures to endocrine disrupting chemicals and hypospadias in offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:241-250.
74. Kallen K 2002 Role of maternal smoking and maternal reproductive history in the etiology of hypospadias in the offspring. *Teratology* 66:185-191.
75. Duong HT, Hoyt AT, Carmichael SL, Gilboa SM, Canfield MA, Case A, McNeese ML, Waller DK 2012 Is maternal parity an independent risk factor for birth defects? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94:230-236.
76. Carmichael SL, Ma C, Feldkamp ML, Munger RG, Olney RS, Botto LD, Shaw GM, Correa A 2012 Nutritional factors and hypospadias risks. *Paediatr Perinat Epidemiol* 26:353-360.
77. Fernandez MF, Olmos B, Granada A, Lopez-Espinosa MJ, Molina-Molina JM, Fernandez JM, Cruz M, Olea-Serrano F, Olea N 2007 Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1:8-14.
78. Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T, Sone H 2012 Identification of novel low-dose bisphenol a targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS One* 7:e36711.
79. Gaspari L, Paris F, Philibert P, Audran F, Orsini M, Servant N, Maimoun L, Kalfa N, Sultan C 2011 'Idiopathic' partial androgen insensitivity syndrome in 28 newborn and infant males: impact of prenatal exposure to environmental endocrine disruptor chemicals? *Eur J Endocrinol* 165:579-587.
80. Gaspari L, Paris F, Jandl C, Kalfa N, Orsini M, Daures JP, Sultan C 2011 Prenatal environmental risk factors for genital malformations in a population of 1442 French male newborns: a nested case-control study. *Hum Reprod* 26:3155-3162.
81. Gaspari L, Sampaio DR, Paris F, Audran F, Orsini M, Neto JB, Sultan C 2012 High prevalence of micropenis in 2710 male newborns from an intensive-use pesticide area of Northeastern Brazil. *Int J Androl* 35:253-264.
82. Michalakis M, Tzatzarakis MN, Kovatsi L, Alegakos AK, Tsakalof AK, Heretis I, Tsatsakis A 2013 Hypospadias in offspring is associated with chronic exposure of parents to organophosphate and organochlorine pesticides. *Toxicol Lett*.
83. Carmichael SL, Yang W, Roberts EM, Kegley SE, Wolff C, Guo L, Lammer EJ, English P, Shaw GM 2013 Hypospadias and residential proximity to pesticide applications. *Pediatrics* 132:e1216-1226
84. Rignell-Hydbom A, Lindh CH, Dillner J, Jonsson BA, Rylander L 2012 A nested case-control study of intrauterine exposure to persistent organochlorine pollutants and the risk of hypospadias. *PLoS One* 7:e44767.
85. Choi H, Kim J, Im Y, Lee S, Kim Y 2012 The association between some endocrine disruptors and hypospadias in biological samples. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 47:2173-2179.
86. Carran M, Shaw IC 2012 New Zealand Malayan war veterans' exposure to dibutylphthalate is associated with an increased incidence of cryptorchidism, hypospadias and breast cancer in their children. *N Z Med J* 125:52-63.
87. Jorgensen KT, Jensen MS, Toft GV, Larsen AD, Bonde JP, Hougaard KS 2013 Risk of cryptorchidism and hypospadias among boys of maternal hairdressers - a Danish population-based cohort study. *Scand J Work Environ Health* 39:302-309.