



SCU
Sociedad Colombiana de Urología®

REVISTA
UROLOGÍA
Colombiana

www.elsevier.es/uroco



ORIGINAL

Diagnóstico molecular en hipospadias



Alejandro Abello^a, Paola Ayala^b, Ana María Ortiz^{c,*} y Nicolás Fernández^d

^a Médico Cirujano, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

^b Instituto de Genética, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

^c Médico Interno, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

^d Médico Urólogo, Unidad de Urología, Hospital Universitario San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Recibido el 15 de julio de 2016; aceptado el 4 de octubre de 2016

Disponible en Internet el 7 de noviembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Hipospadias;
Pene;
Malformación;
Congénita;
Diagnóstico;
Genético;
Molecular

Resumen

Objetivo: Realizar una revisión de la literatura sobre los principales métodos de diagnóstico de las hipospadias a nivel genético y molecular, y su utilidad en esta patología.

Métodos: Se realizó una búsqueda en las diferentes bases de datos como Pubmed y EMBASE con los siguientes términos MESH y sus combinaciones: «molecular diagnosis», «genes», «hipospadias», «karyotype», «wgs», «fish», «chg», «sanger», «microarray», «mps», «wes» y «gwas».

Se incluyeron artículos de metaanálisis, revisiones sistemáticas, revisiones de Cochrane, ensayos clínicos, revisiones narrativas y series de casos, entre 2001 y 2016, tanto en idioma español como en inglés. Se escogieron 33 artículos a partir de títulos, abstracts y referencias cruzadas que fueron incluidos dentro de esta revisión.

Resultados: Las hipospadias son el defecto en el desarrollo del aspecto ventral del pene acompañado de una ubicación ectópica del meato uretral. El 30% de las malformaciones congénitas de los recién nacidos corresponden a una malformación urológica. Dentro de las pruebas genéticas y moleculares que hay disponibles para su diagnóstico, existen múltiples de ellas de utilidad variable. Estas son el cariotipo, el FISH, la secuenciación de Sanger, entre otras.

Conclusiones: Gracias al avance de la tecnología, son múltiples los métodos de diagnóstico a nivel molecular que han permitido ampliar el conocimiento sobre las causas de hipospadias. Además, permiten en el ámbito de la práctica clínica diaria utilizarlos para realizar un estudio completo de los pacientes.

© 2016 Sociedad Colombiana de Urología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: aortizz.92@gmail.com (A.M. Ortiz).

KEYWORDS

Hipospadias;
Penis;
Malformation;
Congenital;
Diagnosis;
Genetic;
Molecular

Molecular diagnosis in hypospadias**Abstract**

Objective: The aim of this study is to perform a systematic review of the principal genetic and molecular diagnostic methods for hypospadias and their usefulness.

Methods: A Pubmed and EMBASE search was carried out using the following MESH terms: "molecular diagnosis", "genes", "hypospadias", "karyotype", "wgs", "fish", "chg", "sanger", "microarray", "mps", "wes", and "gwas".

Meta-analyses, systematic reviews, Cochrane reviews, clinical trials, narrative reviews and case series were included, between 2001 and 2016, in both Spanish and English. A total of 33 items were selected for review after reviewing titles, abstracts, and cross references.

Results: Hypospadias are the birth defect of the ventral aspect of the penis, accompanied by an ectopic location of the urethral meatus. 30% of all birth malformations in the newborns are urological malformations make up 30% of all birth malformations in newborns. Within the genetic and molecular test available for diagnosis, many are of varying usefulness. These include, among others, karyotyping, FISH, and Sanger sequencing.

Conclusions: Due to advances in technology, there are multiple molecular diagnosis methods that can widen the knowledge of the aetiology of hypospadias. They also allow them to be used in the everyday practice for a complete study of patients.

© 2016 Sociedad Colombiana de Urología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Las hipospadias son el defecto en el desarrollo del aspecto ventral del pene acompañado de una ubicación ectópica del meato uretral¹. Se presenta en uno de cada 250 nacidos vivos, con una prevalencia que varía de 4 a 43 casos por 10.000 nacimientos^{2,3}. De los nacimientos anuales, 2-3% presenta algún tipo de malformación congénita, dentro de las cuales las malformaciones urológicas representan alrededor del 30%⁴. En Colombia, se ha definido que la incidencia de malformaciones urológicas oscila entre 0,25 y 0,43%, y entre ellas las más frecuentes son hipospadias y criptorquidia⁴. Según datos del Instituto Nacional de Salud, en 2012 se reportaron 48 casos de hipospadias, que correspondió al 1,99% de las anomalías congénitas para el mismo año⁵. Las hipospadias se han relacionado con cerca de 200 síndromes genéticos⁶.

Teniendo en cuenta los genes involucrados en el desarrollo de las hipospadias, el objetivo del presente artículo es realizar una revisión de la literatura sobre los principales métodos de diagnóstico de las hipospadias a nivel genético y molecular, y su utilidad.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda en Pubmed y EMBASE con los siguientes términos MESH: «molecular diagnosis», «genes», «hipospadias», «karyotipe», «wgs», «fish», «chg», «sanger», «microarray», «mps», «wes» y «gwas».

Se incluyeron artículos de metaanálisis, revisiones sistemáticas, revisiones de Cochrane, ensayos clínicos, revisiones narrativas y series de casos, entre 2001 y 2016 tanto en idioma español como en inglés. Se escogieron 33 artículos a

partir de títulos, abstracts y referencias cruzadas que fueron incluidos dentro de esta revisión.

Resultados y discusión**Embriología y genes asociados**

El desarrollo uretral inicia con la formación del seno urogenital hacia la 6.ª semana de gestación, seguido por el crecimiento del tubérculo genital (TG) que ocurre de manera próximo-distal y dorso-ventral, junto con la formación de la placa uretral y la tubulo génesis epitelial. El TG junto con el epitelio de la placa uretral (EPU) tienen actividad polarizante, que guía las interacciones mesenquimales y epiteliales⁷.

La proteína Sonic Hedgehog expresada en el EPU es requerida para la iniciación y crecimiento del TG³. Proteínas como las homeobox (HOX) y Sonic Hedgehog guían y regulan todo el proceso. Factores de crecimiento fibroblástico (FGF) y Wnt5 promueven el desarrollo y crecimiento; y proteínas morfogenéticas óseas (BMP) cumplen un rol en la apoptosis^{3,7}.

El testículo desarrolla la capacidad de producir andrógenos, los cuales potencian la organogénesis del tracto reproductivo masculino e intervienen en la fusión de los pliegues uretrales.

La masculinización de los genitales externos, se da principalmente por dihidrotestosterona, donde el tubérculo genital se diferencia en glándula; los pliegues uretrales en el cuerpo del pene; y las eminencias genitales en escroto. De forma simultánea, las células de Sertoli secretan hormona antimülleriana la cual induce la regresión del conducto mülleriano. Estas células son esenciales para el funcionamiento de las células de Leydig y de los túbulos seminíferos⁸.

El gen HOXA13 es un importante regulador del proceso embriológico, y sus mutaciones; es responsable de síndromes como el mano-piè-genital, que incluye las hipospadias como una manifestación. Este gen se encuentra en el mesénquima del TG y del EPU. Estudios en ratones han podido comprobar cómo la pérdida de HOXA13 repercute en la formación y proliferación del mesénquima que rodea estas estructuras, con consecuencias posteriores en la fusión distal del meato. Así mismo, se ha comprobado cómo es esencial para la muerte celular programada, necesaria para la fusión, crecimiento y cierre de la uretra peneana⁹.

El factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF8) o factor de crecimiento inducido por andrógenos, es expresado durante el crecimiento inicial del TG y EPU, incrementando la expresión de FGF10, BMP Y HOXD. Alteraciones de estos genes impiden la maduración del epitelio uretral predisponiendo a hipospadias⁷.

El receptor de andrógenos contiene una región de iniciación de transcripción, denominada islas de CpG. Estas islas CpG son importantes debido a que son sitios de metilación de DNA, los cuales tienen un papel fundamental en el control de la expresión y actividad génica, imprinting genómico y la inactivación del cromosoma X. La hipermetilación de estas en la región promotora del gen receptor de esteroides ha sido asociada con una inactivación transcripcional de genes, y es vista funcionalmente como una mutación de inactivación, que puede resultar en alteración de la virilización¹⁰.

El gen que codifica el SRD5A, esencial para la producción de la enzima 5 alfa reductasa, es importante debido a que esta enzima se expresa durante el desarrollo genital masculino alrededor de la porción ventral de la uretra en remodelación, y convierte la testosterona en su más potente forma, dihidrotestosterona, la cual induce la formación de los genitales externos³.

También se han asociado genes encargados del balance entre andrógenos y estrógenos. Los receptores de estrógenos ESR1 y ESR2 son expresados en el desarrollo del tubérculo genital, y diferentes SNP de los genes que los codifican se han asociado con hipospadias⁷. A su vez, el factor de transcripción activador 3 (ATF3) es un gen que responde a estrógenos, y muestra una fuerte regulación positiva en pacientes con hipospadias.

Los genes WT1 y SF1 son esenciales para el desarrollo embriológico del sistema renal y urogenital, por lo tanto sus mutaciones llevan a alteraciones más severas. Se ha documentado como mutaciones de SF1 se encuentran en hipospadias severas peno escrotales acompañadas de criptorquidia, mientras que mutaciones de WT1 se han descrito en hipospadias pene-escrotales acompañadas de micropene³.

Etiología

Las hipospadias se pueden dividir en sindrómicas y no sindrómicas⁶. Del 10 al 30% de los casos son atribuidos a síndromes genéticos conocidos^{11,12}. La gran mayoría tiene un origen idiopático y multifactorial, con alteraciones genéticas, hormonales y ambientales^{6,12}. La exposición a químicos en el ambiente causa disregulación del control epigenético en el feto, alterando la acetilación o metilación normal de

genes⁸. Hasta el 30% de las hipospadias tienen causas moleculares identificadas³.

Se pueden encontrar alteraciones en genes responsables del desarrollo fállico, de la síntesis gonadal de esteroides, o de la respuesta a estas hormonas y sus receptores¹³. Refuerza la teoría genética el hecho de ver hipospadias en grupos familiares en alrededor del 10% de los casos, y recurrencia en hijos masculinos de padres afectados en el 15%^{2,8,13}. Por otro lado, se pueden heredar las alteraciones genéticas entre 57 y 77%, con igual transmisión a través de líneas maternas o paternas¹¹.

Estudios moleculares

Cariotipo: debe ser utilizado como aproximación diagnóstica inicial en todo paciente que comience con hipospadias sindrómica o no sindrómica. La anterior recomendación debido a que se pueden evidenciar alteraciones cromosómicas en el 3% de pacientes masculinos con anomalías genitales que se presentan con criptorquidia aislada, 7% que presentan hipospadias, y 13% cuando se presentan en combinación de las dos anteriores¹⁴. Es esencial en el estudio de trastornos del desarrollo sexual (DDS), que se presentan en asociación con hipospadias como en el síndrome de Klinefelter que tiene un cariotipo XXY, micropene hipospádico con cariotipo XXY¹⁵, o el trastorno de desarrollo testicular 46 XX (es un síndrome genético raro que cursa con microorquidia, hipospadias y ginecomastia)¹⁶. El cariotipo también ayuda en el diagnóstico de la disgenesia gonadal mixta o mosaicismo 45 X/46 XY, que cursa con hipospadias severas asociadas a otras malformaciones genitales¹⁷. En estos casos es esencial el diagnóstico temprano debido a que esta última condición se relaciona con riesgo aumentado de malignidad en un 20%¹⁸.

Hibridación por fluorescencia in situ (FISH): detecta secuencias de nucleótidos en células o tejidos. Existen pocos reportes de casos en la literatura donde se usa este estudio como diagnóstico. Entre los hallazgos más relevantes se han encontrado como causantes de hipospadias: translocación 3; 4¹⁹, cromosoma Y dicéntrico²⁰, o delección intersticial parcial del brazo largo del cromosoma 12²¹. Todas estas etiologías se encontraron en reportes de caso de pacientes con hipospadias de difícil manejo quirúrgico, por lo que puede ser una opción de diagnóstico en pacientes que hayan requerido múltiples correcciones quirúrgicas en búsqueda de estos síndromes. No se recomienda su uso en casos de hipospadias aisladas.

Hibridación genómica comparativa (CGH): permite detectar amplificaciones y delecciones en las regiones más pequeñas de los cromosomas. Sin embargo, no detecta mutaciones equilibradas²². Esta técnica permite la detección de trisomías y grandes anomalías cromosómicas (como el cariotipo), pero también detecta pequeños imbalances submicroscópicos, como delecciones, duplicaciones o triplicaciones²³. Se ha demostrado que el uso de la CGH ha aumentado la detección de anormalidades cromosómicas hasta un 18%²³. El uso más importante de la CGH, especialmente el array-CGH, es la detección de anomalías cromosómicas, especialmente desbalances genómicos, presentes en el 6% de los defectos congénitos. Como consecuencia, realizar estos estudios en neonatos, puede aumentar la posibilidad de detección

temprana de anormalidades cromosómicas consistentes con un desorden genético/genómico, cuando no se encuentran características clínicas que orienten hacia la causa²³. Lo anterior, especialmente en casos de hipospadias síndromicas.

Secuenciación del ADN (Sanger) o de terminación de cadena: se basa en el uso de la polimerasa DNA para sintetizar cadenas de DNA que tienen una terminación específica, generando fragmentos de todos los tamaños posibles, que se pueden distinguir por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico²⁴. Un primer o cebador complementario al DNA de interés inicia como punto de partida la síntesis de la cadena complementaria adicionando deoxinucleótidos trifosfato (dNTP), la cual se extiende hasta la adición de un nucleótido modificado, llamado terminador o ddNTP (di-deoxinucleótidos trifosfato), el cual está marcado por fluorescencia y no contiene grupo OH en el extremo 3'OH para seguir extendiendo la cadena²⁵.

La secuenciación directa de los exones que codifican los genes implicados en hipospadias se ha usado en múltiples estudios para determinar diferentes mutaciones. Kalfa et al., identificó 4 variantes genómicas del gen ATF3, en el 10% de los pacientes de su estudio, y en ninguno de los controles. Las variantes descritas fueron: una mutación *missense* heterocigótica en el exón 3 (L23M), y tres variantes genómicas sin transducción (C53070T, C53632A, Ins53943A) cerca del exón 6²⁶. Wang et al., encontró mutaciones en el 27% de los pacientes de los genes SRD5A2, WT1 y RA, las cuales estaban asociadas con hipospadias, e incluso a micropene²⁷. Otros polimorfismos se han reportado para los genes MALMD1, ATF3, SF1^{28,29}. Esta técnica ha documentado la mayor cantidad de variantes responsables de hipospadias por lo que se recomienda su uso en patología síndromica o no síndromica posterior a la realización de un cariotipo.

Microarray: es una técnica reciente que permite medir la expresión de cientos de genes de forma simultánea por medio del análisis del RNA mensajero (mRNA). Se lleva a cabo mediante hibridación entre una sonda específica o *probe* con una molécula diana. Se mencionó anteriormente como el uso del array-CGH puede ser útil en el diagnóstico temprano de las hipospadias, especialmente en el contexto de desórdenes genéticos que la acompañan.

Secuenciación de próxima generación o secuenciación masiva paralela: por medio de fragmentación del DNA, y posterior ligación, se añaden secuencias adaptadoras en sus extremos. Estos fragmentos se amplifican clonalmente y son agrupados como entidades que se van a secuenciar. Esta prueba permite detectar todos los tipos de variación genómica en un solo estudio. Por medio de la identificación de diferencias en la secuencia de DNA se pueden detectar variantes genéticas cuando se compara el DNA de un individuo a estudio con un DNA de referencia³⁰. Los avances recientes en hipospadias han demostrado nuevos genes asociados y posibles variantes causales; además estudios en animales han traído a luz nuevos conocimientos sobre la genética molecular del desarrollo normal y anormal del pene¹¹.

Secuenciación de exoma (WES): esta técnica ha permitido identificar deleciones en casos de disgenesia gonadal y trastornos del desarrollo sexual que incluyen hipospadias como una de sus manifestaciones. Se ha descrito cómo este estudio de bajo costo, puede ayudar a identificar

tempranamente la variante causante de las alteraciones. Un ejemplo es la deleción por desplazamiento del marco de lectura, localizada en el exón 6 de NR5A1, documentada por Eggers et al; este gen se ha identificado como un gen clave en la determinación del sexo gonadal³¹. Este método diagnóstico puede realizarse en casos de hipospadias síndromicas en las que no se haya establecido una causa con los estudios previos.

Secuenciación del genoma (WGS): no se encuentran artículos reportados en la literatura donde se describa su uso para el diagnóstico de hipospadias. Van der Zanden et al., uno de los principales investigadores sobre el tema, concluye en sus artículos que debido a los costos elevados de esta técnica, solo es usada en identificación de causas monogénicas. A medida que transcurra el tiempo y los costos disminuyan, podrá ser usada en grandes cohortes con hipospadias aisladas e identificar genes involucrados³.

Estudio de asociación del genoma completo (GWAS): la utilidad de este método diagnóstico se basa en documentar locus que puedan demostrarse como etiológicos. Geller et al., realizó un GWAS en 1.006 casos de hipospadias confirmadas quirúrgicamente y 5.486 controles, con posterior identificación de 18 locus asociados a hipospadias y 4 sugestivos de asociación, especialmente locus conectados a genes que se involucran en el desarrollo embriológico. Los locus encontrados más significativos en el estudio se encontraban cerca de los miembros de la familia homeobox, especialmente HOXA, IRX5, IRX6 Y ZFH3. El HOXA4 se ha documentado ampliamente como causante de hipospadias aisladas, y el HOXA13 como causante del síndrome de pie-mano-genital³². Van der Zanden et al., mediante el uso de GWAS, reportó 436 pacientes con hipospadias y 494 controles, y determinó que las variantes relacionadas con el gen de la diacylglyceron kinasa kappa están fuertemente relacionadas con hipospadias, principalmente para las hipospadias de tipo anterior y medio. Por lo que concluye que la estratificación del fenotipo de hipospadias basado en la localización de la apertura del meato uretral puede reducir la heterogeneidad genética y mejorar los resultados en estudios genéticos a futuro³³.

Conclusiones

Existen diferentes genes involucrados e identificados como causantes de hipospadias tanto síndromicas como no síndromicas. Realizamos una revisión de la literatura sobre ellos, los diferentes métodos de diagnóstico genético y molecular, y las causas detalladas en la literatura descritas con estos métodos.

Para complementar el estudio de los pacientes con esta patología, es recomendable iniciar tomando un cariotipo como aproximación diagnóstica inicial sexual, esencial en pacientes con trastorno del desarrollo sexual. La secuenciación de exones puede ser realizada en casos de hipospadias síndromicas o no síndromicas posterior a un cariotipo negativo ya que tiene la habilidad de detectar diferentes genes causantes previamente reportados. La secuenciación de exoma adquiere utilidad en aquellos pacientes con trastornos del desarrollo sexual, identificando tempranamente la variante causante. Es posible realizar también hibridación genómica comparativa en el caso de neonatos en los que

se tiene la sospecha de un desorden genético/genómico, y que las características clínicas no aporten orientación hacia el desorden. En embriones en donde se tenga sospecha de algún desorden genético, el microarray podría ser de ayuda para el diagnóstico temprano de las hipospadias y del síndrome en sí con el fin de enfocar un tratamiento prenatal. En el caso de pacientes que ya han sido sometidos a múltiples procedimientos quirúrgicos con hipospadias de difícil manejo, el FISH puede ayudar a identificar el trastorno asociado. El estudio de asociación del genoma completo, la secuenciación del genoma y la secuenciación de próxima generación son estudios más avanzados y costosos que se están realizando para encontrar nuevos genes asociados, los cuales en un futuro mejorarán nuestro conocimiento y manejo de esta patología.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al Instituto de Genética de la Pontificia Universidad Javeriana su ayuda y colaboración en la elaboración de este documento.

Bibliografía

- Manson JM, Carr MC. Molecular epidemiology of hypospadias: Review of genetic and environmental risk factors. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2003;67:825–36, <http://dx.doi.org/10.1002/bdra.10084>.
- Yang Q, Qu WY, Yang L, Wang K, Tu HY, Wang J. Literature on the aetiology of hypospadias in the last 5 years: Molecular mechanism and environmental factors. *Andrologia.* 2014;46:583–91, <http://dx.doi.org/10.1111/and.12125>.
- Van der Zanden LFM, van Rooij IALM, Feitz WFJ, Franke B, Knoers NVAM, Roeleveld N. Aetiology of hypospadias: A systematic review of genes and environment. *Hum Reprod Update.* 2012;18:260–83, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dms002>.
- Zarante I, Zarante AM, Fernández N. Frecuencia de malformaciones congénitas genitales y urológicas en Colombia Frequency of genito-urinary congenital malformation in Colombia. *Rev Arg Urol.* 2009;74:85–90.
- González Y. Informe final del evento anomalías congénitas hasta el periodo epidemiológico 13 del año 2012. *Inst Nac Salud* 2012:1-17.
- George M, Schmeuer FJ, Jamieson SE, Holland AJA. Genetic and environmental factors in the aetiology of hypospadias. *Pediatr Surg Int.* 2015;31:519–27, <http://dx.doi.org/10.1007/s00383-015-3686-z>.
- Beleza-Meireles A, Lundberg F, Lagerstedt K, Zhou X, Omrani D, Frisen L, et al. FGFR2, FGF8, FGF10 and BMP7 as candidate genes for hypospadias. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:405–10, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201777>.
- Svechnikov K, Stukenborg J-B, Savchuck I, Söder O. Similar causes of various reproductive disorders in early life. *Asian J Androl.* 2014;16:50–9, <http://dx.doi.org/10.4103/1008-682X.122199>.
- Morgan Ea, Nguyen SB, Scott V, Stadler HS. Loss of Bmp7 and Fgf8 signaling in Hoxa13-mutant mice causes hypospadias. *Development.* 2003;130:3095–109, <http://dx.doi.org/10.1242/dev.00530>.
- Vottero A, Minari R, Viani I, Tassi F, Bonatti F, Neri TM, et al. Evidence for epigenetic abnormalities of the androgen receptor gene in foreskin from children with hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:1953–62, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2011-0511>.
- Bouty A, Ayers KL, Pask A, Heloury Y, Sinclair AH. The genetic and environmental factors underlying hypospadias. *Sex Dev.* 2015;9:239–59, <http://dx.doi.org/10.1159/000441988>.
- Carmichael SL, Shaw GM, Lammer EJ. Environmental and genetic contributors to hypospadias: A review of the epidemiologic evidence. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012;94:499–510, <http://dx.doi.org/10.1002/bdra.23021>.
- Kalfa N, Philibert P, Sultan C. Is hypospadias a genetic, endocrine or environmental disease, or still an unexplained malformation? *Int J Androl.* 2009;32:187–97, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00899.x>.
- Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen A, Conway G, Edwards Z, et al. Society for Endocrinology UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development (Revised 2015). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016;84:771–88, <http://dx.doi.org/10.1111/cen.12857>.
- Hutson JM, Grover SR, O'Connell M, Pennell SD. Malformation syndromes associated with disorders of sex development. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10:476–87, <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2014.83>.
- Li T-F, Wu Q-Y, Zhang C, Li W-W, Zhou Q, Jiang W-J, et al. 46,XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. *BMC Urol.* 2014;14:104, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2490-14-104>.
- McAleer IMKG. Is routine karyotyping necessary in the evaluation of hypospadias and cryptorchidism? *J Urol.* 2001;165:2029–31.
- Boehmer AL1, Nijman RJ, Lammers BA, de Coninck SJ, van Hemel JO, Themmen AP, et al. Etiological studies of severe or familial hypospadias. *J Urol.* 2001;165:1246–54.
- Balkan M, Duran H, Önen A, Oral D, Isi H, Fidanboy M, et al. Cytogenetic and clinical studies of a male infant with disorder of sexual development: case report. *Fertil Steril.* 2008;90:2003–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.03.030>.
- Kojima Y, Hayashi Y, Yanai Y, Tozawa K, Sasaki SKK. Molecular analysis of hypospadias in a boy with dicentric Y chromosome. *J Urol.* 2001;165:1244–5.
- Paliwal P, Sharma A, Sahoo J, Ammini AC. An unusual association of hypospadias with partial deletion of chromosome 1q. *Fertil Steril.* 2010;93:2413.e11–2413.e13. DOI:10.1016/j.fertnstert.2009.12.003.
- Oostlander A, Meijer G, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet.* 2004;66:488–95, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00322.x>.

23. Emy Dorfman L, Leite JCL, Giugliani R, Riegel M. Microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: Detection of chromosomal imbalances. *J Pediatr (Rio J)*. 2015;91:59–67, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.05.007>.
24. Campion R, Canul J. Secuenciación de ácidos nucleicos. 2004:48.
25. Kalfa N, Cassorla F, Audran F, Oulad Abdennabi I, Philibert P, Bérourd C, et al. Polymorphisms of MAMLD1 gene in hypospadias. *J Pediatr Urol*. 2011;7:585–91, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpurol.2011.09.005>.
26. Kalfa N, Liu B, Klein O, Wang MH, Cao M, Baskin LS. Genomic variants of atf3 in patients with hypospadias. *J Urol*. 2008;180:2183–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2008.07.066>.
27. Wang Y, Li Q, Xu J, Liu Q, Wang W, Lin Y, et al. Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet*. 2004;12:706–12, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201232>.
28. Tantawy S, Mazen I, Soliman H, Anwar G, Atef A, El-Gamma M, et al. Analysis of the gene coding for steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in a cohort of 50 Egyptian patients with 46,XY disorders of sex development. *Eur J Endocrinol*. 2014;170:759–67, <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-13-0965>.
29. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenat*. 2012;23:56–66, <http://dx.doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.001>.
30. Wiltgen M, Tilz GP. DNA microarray analysis: principles and clinical impact. *Hematology*. 2007;12:271–87, <http://dx.doi.org/10.1080/10245330701283967>.
31. Eggers S, Smith KR, Bahlo M, Looijenga LH, Drop SL, Juniarto ZA, et al. Whole exome sequencing combined with linkage analysis identifies a novel 3 bp deletion in NR5A1. *Eur J Hum Genet*. 2015;23:486–93, <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2014.130>.
32. Geller F, Feenstra B, Carstensen L, Pers TH, van Rooij laLM, Körberg IB, et al. Genome-wide association analyses identify variants in developmental genes associated with hypospadias. *Nat Genet*. 2014;46:957–63, <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3063>.
33. Van der Zanden LF, van Rooij IA, Feitz WF, Knight J, Donders AR, Renkema KY, et al. Common variants in DGKK are strongly associated with risk of hypospadias. *Nat Genet*. 2011;43:48–50, <http://dx.doi.org/10.1038/ng0311-277b>.