

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOMÉDICAS**

17

**Análisis Molecular del Cromosoma Y  
en Pacientes con Reversión Sexual**

**T E S I S**

Que para obtener el grado Académico de  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Presenta M. en C. Marisol López López

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Susana Kofman Epstein'.

Tutora de Tesis: Doctora Susana Kofman Epstein

México, D.F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A mis padres, a mi marido y a mis hijas.

A mis familiares y amigos.

A mi tutora.

A los miembros del Jurado.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

# INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	6
I. INTRODUCCIÓN .....	10
1.2 DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....	10
1.3 SRY, EL GEN DETERMINANTE TESTICULAR .....	12
1.3.1 Expresión de SRY .....	12
1.3.2 Regulación del nivel de expresión de SRY .....	13
1.3.3 Proteína SRY .....	14
1.3.4 Evolución de SRY .....	15
1.3.5 Estructura y función de SOX9.....	16
1.4 GENES QUE PARTICIPAN EN EL DESARROLLO GONADAL .....	17
1.4.1 El gen WT1 .....	18
1.4.2 Factor esteroideogénico 1 (SF-1) .....	20
1.4.3 El gen DAX-1 .....	21
1.5 INTERACCIONES GENÉTICAS EN EL DESARROLLO GONADAL ....	24
1.5.1 SF-1 y WT1 .....	24
1.5.2 SF-1 y DAX-1 .....	25
1.6 ANOMALIAS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL .....	28
1.6.1 Síndrome de Turner .....	28
1.6.2 Reversión Sexual.....	32
1.6.2.1 Disgenesia Gonadal Pura 46,XY .....	33
1.6.2.2 Varones XX .....	37
1.6.2.3 Hermafroditismo Verdadero.....	38

2. OBJETIVOS .....	41
3. MATERIALES Y METODOS .....	42
3.1 Pacientes .....	42
3.2 Estudios citogenéticos .....	42
3.3. Estudios moleculares .....	42
3.3.1 Aislamiento de DNA genómico de sangre periférica .....	42
3.3.2 Extracción de DNA genómico de tejido embebido en parafina .....	43
3.3.3 Procesamiento de las muestras de DNA genómico .....	43
3.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa .....	44
3.3.5 Análisis electroforético de los productos de PCR .....	48
3.3.6 Elusión de productos de PCR a partir de geles de agarosa .....	48
3.3.7 Cuantificación de DNA mediante fluorometría .....	49
3.3.8 Purificación de productos de PCR por columnas de filtración en gel (Spin columns) .....	49
3.3.9 Secuencias de DNA .....	50
4. RESULTADOS .....	52
5. DISCUSION .....	72
6. CONCLUSIONES .....	80
7. REFERENCIAS .....	81

## RESUMEN

La determinación sexual se refiere a los eventos genéticos que conducen a un desarrollo gonadal, masculino o femenino, normal. La diferenciación sexual comprende todos los eventos morfogenéticos y fisiológicos subsecuentes que resultan en sexualidad funcional, dimorfismo sexual y características sexuales secundarias.

En el ser humano, la determinación y la diferenciación se llevan a cabo en etapas consecutivas. El establecimiento del sexo genético se realiza por el complemento cromosómico 46,XX o 46,XY. Esta constitución cromosómica marca el inicio de una cascada de eventos genéticos que conducen al desarrollo de la gónada indiferenciada en testículo u ovario, y que se denomina sexo gonadal. Las gónadas, a su vez, secretan hormonas que son esenciales para la diferenciación subsecuente de los genitales internos y externos, que constituyen el sexo fenotípico. El sexo de asignación de un individuo normalmente depende de la determinación y de la diferenciación sexual normal.

En 1990, se identificó al gen *SRY* (*sex-determining region of the Y-chromosome*) como resultado del análisis de una región específica del Y de 35 kb que estaba presente en individuos con reversión sexual XX. Subsecuentemente, se demostró que *SRY* correspondía al gen *TDF* (*testis-determining factor*). El gen *SRY* codifica un factor de transcripción con 204 residuos de aminoácidos que comprende una caja HMG, un dominio de unión a DNA de 79 aminoácidos compartido con la familia SOX de factores de transcripción. La expresión de *SRY* en gónadas 46,XY coincide con la formación de cordones testiculares y persiste en las células de Sertoli como una proteína nuclear en la semana 18 de la gestación.

Recientemente se han identificado varios genes que participan junto con *SRY* en la determinación sexual, apoyando el papel de *WT-1*, *SF-1*, *SOX-9* y *DAX-1* en la gonadogénesis.

El gen *WT-1* se localiza en 11p13 y codifica para un polipéptido con cuatro dedos de zinc que es tanto factor de transcripción como supresor de tumores, siendo esencial para el desarrollo de los riñones y la diferenciación gonadal. Se han

descrito mutaciones en *WT-1* en cuatro patologías humanas (tumor de Wilms, síndrome de Denny-Drash, síndrome de Frasier y síndrome de WAGR), todas con características de reversión sexual XY.

El gen *SF-1* se expresa en la cresta urogenital que forma tanto gónadas como suprarrenales y también se observa en regiones cerebrales en desarrollo. Los ratones que carecen de *Sf-1* no desarrollan gónadas, suprarrenales ni hipotálamo. Las mutaciones en *SOX9*, un gen relacionado a *SRY*, son la causa de la reversión sexual y de las anomalías esqueléticas observadas en los casos XY de displasia campomélica. Este gen está asociado a la condrogénesis y a la diferenciación gonadal y se transcribe después de la expresión de *SRY* en las estructuras gonadales masculinas. Recientemente se demostró que en el humano *SOX9* muestra una translocación subcelular sexo específica, del citoplasma al núcleo, en las células de la cresta genital masculina durante la diferenciación testicular.

El gen *DAX-1* está implicado en la reversión sexual sensible a dosis génica, de masculino a femenino, debida a la microduplicación de Xp21. Este gen se expresa durante el desarrollo ovárico pero se suspende durante la formación del testículo, sugiriendo una función crítica en la formación del ovario. *DAX-1* es reprimido por la acción de *SRY* durante el desarrollo testicular. Sin embargo, si se presenta duplicación de la región de *DAX-1* en pacientes XY, la sobre expresión de este gen impide la formación del testículo.

Además, se han descrito deleciones en 9p y 10q que han sido asociadas a la reversión sexual en individuos XY, sugiriendo que en estas regiones existan uno o más genes requeridos en doble copia para el desarrollo testicular normal.

Como se expuso anteriormente, todos los pasos de la cascada de diferenciación sexual están sujetos a control genético, por lo que mutaciones en estos genes pueden resultar en diferentes anomalías.

Los estudios citogenéticos en las pacientes con síndrome de Turner han mostrado que 40-60% son 45,X mientras que el resto presentan anomalías estructurales del cromosoma X o son mosaicos con una segunda línea celular con cromosoma X o Y normal o anormal. Sin embargo, los estudios moleculares han demostrado una mayor proporción de individuos mosaicos, pero los informes de varias poblaciones

muestran una frecuencia muy variable (0-61%) de mosaicismo con cromosoma Y. En las pacientes con síndrome de Turner la presencia de cromosoma Y o de material derivado de éste, se correlaciona con 20-40% de riesgo de desarrollar gonadoblastoma o disgerminoma, requiriendo la remoción preventiva de las gónadas. Recientemente se han descrito algunos casos de mutación en *SRY* en individuos con fenotipo Turner.

En el ser humano existen dos tipos de reversión sexual completa: los varones XX que en ausencia de cromosoma Y tienen testículos bilaterales, y las mujeres XY que en presencia de cromosoma Y no desarrollan testículos. La reversión sexual parcial o incompleta incluye varones XX con ambigüedad genital y los hermafroditas verdaderos 46,XX o 46,XY.

La mayoría de las mujeres XY presentan un cromosoma Y intacto pero 10-15% tienen mutaciones en el gen *SRY*, particularmente en la caja HMG. De manera contraria la transferencia accidental de secuencias específicas del Y, que incluyen *SRY*, al cromosoma X durante la meiosis paterna se observa en la mayoría de los varones XX pero es un hallazgo raro en hermafroditas verdaderos 46,XX. Se han descrito mutaciones en *SRY* en dos hermafroditas verdaderos 46,XY.

En este trabajo se realizó el análisis molecular de 105 pacientes con diferentes anomalías de la diferenciación sexual: síndrome de Turner, disgenesia gonadal 46,XY, síndrome de varón XX y hermafroditismo verdadero, para detectar la presencia de secuencias específicas del cromosoma Y, identificar mutaciones en *SRY*, y correlacionar los datos moleculares con la etiología del padecimiento y el fenotipo de los pacientes.

En 75 pacientes con síndrome de Turner y diferentes cariotipos se detectó material derivado del cromosoma Y en 6 individuos. Esto resulta en 8% de incidencia de mosaicismo con Y en pacientes con fenotipo Turner en nuestra población. Los 8 casos de disgenesia gonadal 46,XY fueron positivos para todas las secuencias analizadas. En 10 casos esporádicos de varones XX se excluyó mosaicismo críptico con cromosoma Y por la ausencia de la región centromérica de éste, pero en 6 de ellos se identificó material derivado de Yp en su genoma. En

dos hermanos varones XX sin ambigüedad genital se demostró que carecían de secuencias del cromosoma Y.

También se estudiaron 10 hermafroditas verdaderos, 6 con cariotipo 46,XX mientras que el resto fueron mosaicos con una segunda línea celular con cromosoma Y. El análisis molecular en los sujetos 46,XX documentó la ausencia de la región centromérica del cromosoma Y, demostrando que no poseen mosaicismo oculto. Sólo un individuo 46,XX presentó secuencias de Yp. Los 4 casos con cromosoma Y citogenéticamente observable fueron positivos para todas las secuencias estudiadas de este cromosoma.

Se realizó el análisis molecular del marco abierto de lectura de *SRY* en los casos positivos para este gen: 3 pacientes 45,X con síndrome de Turner, 8 con disgenesia gonadal 46,XY, 4 casos esporádicos de varones XX, un hermafrodita 46,XX y 4 hermafroditas mosaicos con cromosoma Y. Los resultados sólo revelaron una mutación sin sentido en la caja HMG de *SRY* en una mujer XY, mientras que el resto de los individuos mostró una secuencia consenso.

De acuerdo a lo informado en la literatura, nuestros datos demuestran que en el ser humano la mayoría de los casos de reversión sexual XY, y todos los casos negativos para *SRY* de varones XX y hermafroditas verdaderos 46,XX permanecen sin resolver.

También se demostró que no siempre existe correlación del fenotipo con la presencia o ausencia de secuencias del Y en el genoma, confirmando que la reversión sexual es genéticamente heterogénea. Nuestros datos son consistentes con la hipótesis de que se desconocen muchos genes que participan en la cascada de la determinación sexual.

Aun cuando la función de *SRY* es indiscutible y a pesar de haber sido descubierto hace diez años, conocemos poco de su mecanismo de acción o de sus blancos biológicos.

En mamíferos, la mayoría de los genes implicados en la determinación sexual (*WT-1*, *SRY*, *SOX9*, *DAX-1*) han sido identificados al estudiar individuos con reversión sexual. Por lo tanto, la investigación de pacientes con diferentes anomalías de la diferenciación sexual parece una estrategia promisoría para

detectar otros genes. En un futuro cercano, la caracterización de estos genes será fundamental para el diagnóstico, tratamiento y consejo genético de pacientes con padecimientos de la determinación sexual.

## ABSTRACT

Sex determination refers to the genetic events that bring about male or female gonadal development, and sex differentiation to all subsequent morphogenetic and physiological events that establish functional sexuality, sexual dimorphism and secondary sexual characteristics.

Human sex determination and differentiation can be divided into several steps. Genetic sex is mediated through the chromosomal set, 46,XX or 46,XY. This chromosomal pattern is the beginning of a cascade of genetic events leading to the development of the undifferentiated gonads into testis or ovaries, referred as gonadal sex. The gonads, in turn, secrete both steroidal as well as peptide hormones which are essential for the development of the internal and external genitalia. Hormone action mediates phenotypic sex. The gender of an individual is the sex of assignment and usually depends both on normal sexual determination and differentiation.

In 1990, *SRY* (sex-determining region of the Y-chromosome) was identified following the analysis of 35 kb of Y-specific DNA from XX sex-reversed patients. This gene was equated to *TDF* (testis-determining factor). *SRY* encodes a transcription factor of 204 aminoacid residues, encompassing a conserved HMG box, a DNA-binding domain of 79 residues shared by the SOX family of transcription factors. *SRY* is expressed in 46,XY gonads coincident with sex cord formation and persists as a nuclear protein within Sertoli cells at 18 weeks of gestation.

Recently, potential protein partners of *SRY* have been identified and there has been considerable activity to understand the roles of *WT-1*, *SF-1*, *SOX9* and *DAX-1* in gonadogenesis.

The gene *WT-1* is located on chromosome 11p13. It encodes a polypeptide with four zinc finger motifs that is both a transcription factor and a tumor suppressor, that is essential for renal development and gonadal differentiation. Mutations in *WT1* are involved in four different human pathologies (Wilms' tumor, Denny-Drash

syndrome, Frasier syndrome and WAGR syndrome) each with characteristics of XY sex reversal.

*SF-1* is expressed in the urogenital ridge which forms both gonads and adrenals, and is also found in developing brain regions. Mice lacking *Sf-1* fail to develop gonads, adrenals and the hypothalamus.

Mutations in an *SRY*-box-related gene, *SOX9*, are the cause of both the sex reversal and the skeletal dysplasia in XY cases of campomelic dysplasia. It is associated to chondrogenesis and gonadal differentiation and is transcribed especially following *SRY* expression in male gonadal structures. In the mouse, high levels of *Sox9* mRNA are found in male (XY) but not female (XX) genital ridges and are localized in Sertoli cells within the sex cords of the developing testis. Recently, it was shown that in humans *SOX9* harbors a sex-specific subcellular translocation from the cytoplasm to the nucleus in male genital ridge cells at the time of testis differentiation.

The *DAX-1* gene has been involved in the dosage sensitive (*DSS*) sex reversal phenotype, a male to female sex reversal syndrome due to a microduplication of Xp21. This gene is expressed during ovarian development but is suspended during testicular formation, implying a critical role in ovarian formation. *DAX1* is repressed by *SRY* during testicular development. However if a duplication of the *DAX1* region is present in a 46,XY patient and the activity of its gene product is thus enhanced, testicular formation is hindered.

Deletions of 9p and 10q have also been associated with sex reversal in 46,XY individuals, suggesting that these regions contain one or more genes required in two copies for normal testis development.

As noted above, all the steps in the sex differentiation cascade are under genetic control, consequently mutations in these genes can cause several sex differentiation anomalies.

Cytogenetic studies have shown that 40-60% of patients with Turner syndrome are 45,X, whereas the rest have structural aberrations of the X chromosome or mosaicism with a second cell line containing a structurally normal or abnormal X or Y chromosome. However, molecular studies have demonstrated a higher

proportion of mosaicism, and studies in different populations have shown an extremely variable frequency of Y mosaicism of 0-61%. In Turner patients the presence of a Y chromosome or Y-derived material is correlated with 10-20% risk of developing gonadoblastoma or dysgerminoma, requiring preventive removal of the gonads. Recently, a few mutations in *SRY* have been reported in subjects with Turner phenotype.

In humans two types of complete sex reversal are observed: XX males that lack a Y chromosome and have bilateral testes and XY females that in the presence of a Y chromosome fail to develop testes. Partial or incomplete sex reversal includes XX males with genital ambiguity and true hermaphrodites 46,XX or 46,XY.

Most 46,XY females have an intact Y chromosome but 10-15% of them have mutations in *SRY*, the majority localized within the HMG box. Conversely, the accidental transfer of Y-specific sequences including *SRY*, onto the X chromosome during male meiosis is found in many 46,XX males but is uncommon in 46,XX true hermaphrodites. Two mutations in *SRY* have been described in 46,XY true hermaphrodites.

We performed molecular analysis in 105 patients with different sex differentiation anomalies: Turner syndrome, 46,XY gonadal dysgenesis, XX maleness and true hermaphroditism to detect the presence of Y-specific sequences, to identify *SRY* mutations and to correlate molecular data with the etiology of the disease and the patients phenotype

In 75 Turner patients with different karyotypes, we detected Y derived material in 6 subjects, resulting in 8% incidence of Y mosaicism in Turner syndrome patients in our population. The 8 cases of 46,XY gonadal dysgenesis were positive for all the Y-sequences analyzed. In 10 sporadic cases of XX males cryptic Y mosaicism was ruled out due to the absence of the Y centromeric region, but in 6 of them molecular data indicated the presence of Yp derived material in their genome. In two XX male brothers without genital ambiguity, no Y sequences were detected.

We also studied 10 true hermaphrodites, 6 of them had a 46,XX karyotype while the rest were mosaics with a second cell line with Y chromosome. Molecular analysis in 46,XX subjects documented the absence of Y-centromeric sequences

in all cases, arguing against hidden mosaicism. Only one 46,XX individual presented Yp sequences. The 4 cases with cytogenetic Y chromosome were positive for all the Y- sequences studied.

Molecular analysis of the *SRY* open-reading frame was undertaken in cases *SRY*-positive: 3 cases 45,X with Turner syndrome, 8 with 46,XY gonadal dysgenesis, 4 sporadic XX males, one 46,XX true hermaphrodite and 4 cases of true hermaphroditism with Y mosaicism. Results only revealed a nonsense mutation in the HMG box of one 46,XY female, while the rest of the patients showed a consensus sequence.

In accordance to previous reports, our data demonstrate that in humans most cases of XY sex reversal and all cases of XX maleness and XX true hermaphrodites in the absence of *SRY* remain unsolved.

We also showed that the phenotype does not always correlate with the presence or absence of Y sequences in the genome and confirm that sex reversal is a heterogeneous condition. Our results are consistent with the hypothesis that many genes involved in mammalian sex determination remain unknown.

Although the function of *SRY* is indisputable, we know little of its mode of action and, despite ten years of research, the biological target of *SRY* remains unknown.

Many genes involved in mammalian sex determination (*WT1*, *SRY*, *SOX9*, *DAX1*) have been isolated by studying sex-reversed individuals. Therefore, the study of patients with different sex differentiation anomalies seems a promising strategy to identify other genes. The characterization of these genes in the, hopefully near future, will be fundamental to the diagnosis, treatment and counselling of patients with a sexual determination disorder.

## 1.0 INTRODUCCION

La determinación sexual en las diferentes especies puede ocurrir por una gran variedad de mecanismos, entre ellos: ambientales (señales externas, temperatura, etc), cromosómicos (dependientes de dosis) o genéticos (presencia de un gen dominante). Los mamíferos euterios poseen el mecanismo genético de determinación sexual, ya que las hembras portan dos cromosomas X y los machos un único cromosoma X y un cromosoma Y, en el que se localiza un gen dominante que dispara la determinación sexual masculina (Capel,1998).

En los mamíferos euterios, la determinación sexual se define como el inicio del desarrollo del testículo a partir de la gónada bipotencial ya que toda la diferenciación sexual secundaria depende y es subsecuente de este evento inicial (Martineau et al, 1997).

### 1.2. DIFERENCIACION SEXUAL

La diferenciación sexual es un proceso dinámico sujeto a un programa secuencial, ordenado e interrelacionado que se lleva a cabo en etapas consecutivas: el establecimiento del sexo cromosómico durante la fertilización, el desarrollo de la gónada indiferenciada en testículo u ovario, sexo gonadal, y la diferenciación subsecuente de los genitales internos y externos, que constituyen el sexo fenotípico.

Los experimentos realizados por Alfred Jost en los años cuarenta definieron que la determinación sexual en los mamíferos depende de la presencia o ausencia de un testículo funcional (Jost, 1947). En el ser humano, el testículo fetal produce todas las hormonas necesarias para el desarrollo de un fenotipo masculino completo, las células de Sertoli secretan la hormona anti Mulleriana (AMH) que causa la regresión de los ductos Mullerianos y las células de Leydig producen testosterona que induce el desarrollo de los ductos Wolffianos resultando en la formación de epidídimo, *vas deferens* y vesícula seminal. La acción de la enzima extragonadal

5- $\alpha$ -reductasa convierte a la testosterona en 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona que es la hormona responsable de la diferenciación de los genitales externos masculinos (pene y escroto). En el embrión femenino, la ausencia de AMH da lugar al desarrollo de trompas de Falopio, útero y tercio superior de la vagina, mientras que los ductos Wolffianos sufren regresión por ausencia de testosterona.

Por analogía con *Drosophila melanogaster*, se asumió que la determinación sexual en los mamíferos estaba mediada por la proporción entre el número de cromosomas X y autosomas presentes (Hodgkin, 1992). Sin embargo, a finales de los años cincuenta y principios de los sesenta varios reportes en la literatura pusieron de manifiesto la función crucial del cromosoma Y en la determinación sexual de los mamíferos, al describir en el ratón y en el humano un fenotipo femenino en presencia de un cariotipo 45,X (Welshons and Russell, 1959; Ford et al, 1959) y un fenotipo masculino con cariotipo 47,XXY (Jacobs and Strong, 1959; Cattanaach, 1961). Estas observaciones demostraron que en presencia de un cromosoma Y, independientemente del número de cromosomas X, el embrión de mamíferos se desarrolla como macho, mientras que en ausencia del Y se desarrolla como hembra. Además, llevaron a suponer la existencia de un gen determinante de testículo en el cromosoma Y, cuya presencia o ausencia determina el destino de la gónada bipotencial en testículo u ovario. En el ser humano este gen hipotético fue denominado *TDF* (*testis determining factor*) y en el ratón *Tdy* (*testis determining gene on the Y*).

El gen *TDF* fue finalmente localizado en el cromosoma Y mediante el análisis molecular de pacientes con reversión sexual. El estudio de 4 varones XX con material derivado del Y translocado al cromosoma X fue crítico en la detección de la región determinante del sexo en el brazo corto del Y (Palmer et al, 1989). Posteriormente esta región fue definida a un segmento de 35 kb, adyacente al límite pseudoautosómico, y se identificó al gen *SRY* (*sex determining region, Y-chromosome*) (Sinclair et al, 1990). El homólogo murino fue subsecuentemente clonado y denominado *Sry* (Gubbay et al, 1990).

Varias evidencias indican que *SRY* equivale a *TDF* y que es el gen necesario y suficiente para la determinación sexual masculina, entre ellas están:

- (1) Se localiza en la región más pequeña del cromosoma Y capaz de inducir la diferenciación testicular en el hombre y en el ratón
- (2) Las mutaciones de *SRY* en el humano o su pérdida del cromosoma Y en el ratón, conducen a un desarrollo femenino (Lovell-Badge y Robertson, 1990)
- (3) La introducción de un fragmento genómico de 14kb, que incluye el gen *Sry*, en embriones murinos cromosómicamente femeninos fue suficiente para inducir la diferenciación testicular y el subsecuente desarrollo masculino (Koopman et al, 1991).

### 1.3 *SRY*, EL GEN DETERMINANTE TESTICULAR

El gen *SRY* tiene una estructura simple, conteniendo un solo exón y ningún intrón. El extremo 5' no posee cajas TATA o CCAT, es rico en dinucleótidos GC y contiene dos sitios en tándem de reconocimiento para Sp1 (factor de transcripción con dedos de zinc) cuya secuencia es promotora de transcripción (Vilain et al, 1992). La región transcrita de *SRY* consiste en 841 pb, que producen una proteína de 204 aminoácidos con un peso molecular de 23.9 kDa. La caja HMG (HMG, *High Mobility Group*) comprende 79 aminoácidos, se localiza en la porción central del gen *SRY* y corresponde a los aminoácidos 57-137 de la proteína (Su y Lau, 1993).

#### 1.3.1 Expresión de *SRY*

En el ratón, *Sry* se expresa por un período breve que comprende aproximadamente 10.5 a 12 días post coito (dpc) en la porción gonadal de la cresta urogenital (Hacker et al, 1995). Siguiendo la expresión de *Sry*, los eventos iniciales incluyen cambios en la organización topográfica de varios tipos celulares de la gónada XY en desarrollo. Este proceso resulta en una estructura característica de túbulos testiculares (visible al microscopio a los 12.5 dpc) compuesta por células germinales, rodeadas por células de Sertoli epiteliales, que a su vez están rodeadas por células mioides peritubulares. En el interior de los

túbulos se encuentran las células de Leydig. Se ha demostrado que la migración celular del mesonefros hacia la gónada es específica del sexo masculino y que depende de la presencia del cromosoma Y en la gónada (Martineau et al, 1997). En el ratón adulto, la expresión de *Sry* se detecta exclusivamente en el testículo (Koopman et al, 1991; Rossi et al, 1993). El transcrito de *Sry* predominante es un RNA circular de 1.2 kb, probablemente resultado del procesamiento de un transcrito primario mayor presente en un nivel muy bajo, y que aparentemente no es traducido (Capel et al, 1993). El gen *Sry* se localiza entre dos secuencias invertidas repetidas de 15 kb, que podrían contribuir a generar una estructura secundaria capaz de ser procesada a una molécula circular (Gubbay et al, 1992). Por lo tanto, este transcrito circular podría ser consecuencia de su estructura genómica o podría representar una forma de regulación en el testículo, sin embargo a la fecha no se le ha asignado una función (Capel, 1998; Schafer y Goodfellow, 1996)

El gen *SRY* humano no está flanqueado por secuencias invertidas repetidas y no se ha encontrado un transcrito circular en el testículo adulto humano (Schafer y Goodfellow, 1996).

El *locus SRY* humano comprende un gene con un exón y múltiples sitios de inicio de transcripción. Se han identificado transcritos en el testículo adulto y, en menor nivel, en muchos tejidos humanos fetales y adultos (Clepet et al, 1993). La expresión del RNA de *SRY* humano y de otros mamíferos abarca un periodo de tiempo mayor que las cerca de 40 h de expresión durante la gonadogénesis murina (Hacker et al, 1995).

### 1.3.2 Regulación del nivel de expresión de *SRY*

Actualmente no está caracterizada la regulación transcripcional de *Sry*, aunque se están realizando esfuerzos en animales transgénicos para definir los límites de la región reguladora 5'. Además, los estudios de ratones transgénicos en los que *Sry* se activa normalmente en hembras genéticas, sugieren que todos los genes *arriba* que se requieren para la activación están presentes en individuos XX.

Los estudios basados en la falta de desarrollo de gónadas de ratones mutantes, han identificado varios genes (*Sf1*, *Wt1*, *Lim1* y *Emx2*) que aparentemente son necesarios para el desarrollo de la cresta genital. Sin embargo, ninguno de estos genes ha sido directamente implicado en la activación de *Sry* (Capel, 1998).

Por otro lado, varios experimentos sugieren que el nivel de expresión de *Sry* sea un umbral crítico para la determinación sexual y, por lo tanto, altamente sensible a efectos de dosis. Por ejemplo, se han descrito familias en las que el padre normal es portador de la misma mutación que sus hijas XY, pudiendo ser resultado de un mosaicismo gonadal o de falta de penetrancia (Cameron y Sinclair, 1997; Neri y Opitz, 2000). Sin embargo, también es posible suponer que estos casos de reversión sexual se deban a fondos genéticos variables que afecten el nivel de expresión de *SRY* (Cameron y Sinclair, 1997; Capel, 1998).

### 1.3.3 Proteína SRY

La proteína SRY es miembro de una familia de proteínas de alta movilidad (HMG) con una caja HMG en la región central (aminoácidos 57-137) que corresponde al dominio de unión de la proteína SRY al DNA, por lo que se asume que es un factor de transcripción (Su y Lau, 1993).

El análisis espectroscópico multidimensional mediante resonancia magnética nuclear indica que la proteína SRY interacciona con el surco menor del DNA y le produce una curvatura de 60°. (Werner et al, 1995). De hecho, algunas mutaciones de SRY no impiden la unión al DNA sino que interfieren con el doblamiento del mismo (Pontiggia et al, 1994). Estas observaciones sugieren que SRY, al igual que otras proteínas con caja HMG, pueda regular la expresión génica a través de efectos *arquitectónicos* que convierten a las regiones promotoras en estructuras de orden superior y facilitan la acción de otros reguladores transcripcionales (Parker et al, 1999b).

Se ha demostrado la habilidad de la proteína SRY para unirse al DNA dependiendo de su secuencia, específicamente a AACAAAG y preferencialmente

a AACAAAT (Harley et al, 1994). Sin embargo, también se ha demostrado su gran afinidad de unión a estructuras cruciformes de DNA independientemente de su secuencia (Ferrari et al,1992).

Con la ayuda de anticuerpos específicos dirigidos a un péptido de SRY (aminoácidos 40-56), se logró localizar a la proteína SRY en el núcleo de dos tipos de células humanas. Más aun, se demostró que la localización nuclear de la proteína SRY depende de la región amino terminal del dominio HMG (Poulat et al, 1995).

La fosforilación es uno de los principales mecanismos por los que la célula puede modular la actividad de un factor de transcripción. Recientemente se encontró que la proteína ciclina cinasa dependiente de AMP (PKA) fosforila a la proteína SRY humana en los residuos de serina del extremo amino terminal. Además, se demostró que este evento de fosforilación regulaba positivamente la actividad de unión de SRY al DNA, aportando evidencia de una modulación postraducciona l de la actividad de SRY durante la determinación sexual (Desclozeaux et al, 1998).

Se ha sugerido que el gen *SRY* active genes  *río abajo*  de la cascada génica que conduce al fenotipo masculino y que convierten a la gónada bipotencial en testículo. Sin embargo, no se han identificado genes blanco de *SRY* y el mecanismo por el cual regula la transcripción sigue siendo especulativo. Por otro lado, se ha sugerido que *SRY* no active positivamente la cascada sino que reprima a un regulador negativo que normalmente inhibe el desarrollo testicular (McElreavy et al,1993).

#### 1.3.4 Evolución de SRY

El gen *SRY* sólo se encuentra en los mamíferos, y aunque se han identificado varios genes con dominios de unión a DNA semejantes a *SRY* estos no son sexo específicos. Los miembros de esta gran familia de genes se conocen como SOX (*SRY-box related*) y se definen como aquellos genes con una similitud en la secuencia de aminoácidos de la caja HMG de 60% o más (Koopman, 1999). Estos

genes tienen diversas funciones como reguladores del desarrollo, y en uno de ellos, *SOX9*, se ha demostrado una función importante en la determinación sexual (da Silva et al, 1996).

El dominio de unión de *SRY* al DNA está evolutivamente conservado entre diferentes especies, sin embargo la comparación de las secuencias codificantes (fuera de la caja HMG) del gen *SRY* humano con el de ratón, conejo y marsupiales demuestra escasa similitud (Foster et al, 1992).

Los resultados de la comparación entre la secuencia de bases de *SRY* y *SOX*, así como su localización en tres diferentes grupos de mamíferos sugieren que *SRY* se originó a partir de *SOX3* por mutación y pérdida de secuencias fuera de la caja HMG. Esto ha llevado a suponer que el gen *SRY* no actúe como activador de la transcripción, sino como inhibidor de su homólogo *SOX3*, que a su vez inhibe al gen autosómico ancestral de determinación sexual, *SOX9* (Graves, 1998).

### 1.3.5 Estructura y función de *SOX9*

La displasia campomélica es una enfermedad caracterizada por alteraciones esqueléticas y cartilaginosas asociadas a un amplio espectro de anomalías en el desarrollo gonadal. El fenotipo de estos pacientes incluye individuos masculinos normales, femeninos con testículos disgenéticos bilaterales y cariotipo 46,XY y mujeres 46,XX con ovarios bilaterales (Houston et al, 1983).

El gen *SOX9*, que participa en la determinación sexual, fue identificado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q24.3-q25.1) al clonar los puntos de ruptura cromosómicos de las translocaciones que presentaban los pacientes con displasia campomélica. (Foster et al, 1994). El gen *SOX9* codifica para un factor de transcripción de 509 aminoácidos, con dominios de unión a DNA y de transactivación transcripcional. Se ha demostrado que la caja HMG se une a las secuencias AACAAT y AACAAAG, al igual que *SRY* y otras proteínas *SOX* (Koopman, 1999).

El homólogo murino *Sox9*, se localizó en el cromosoma 11 y se expresa

predominantemente en las condensaciones mesenquimatosas del embrión, antes y después del depósito del cartilago; lo cual es consistente con una función esencial en el desarrollo esquelético (Wright et al, 1995).

La expresión del RNA de Sox9 está asociada con el desarrollo de los cordones testiculares y no es debida a las células germinales, implicando a las células de Sertoli como el sitio de expresión. Por lo tanto este gen juega un papel importante en la determinación sexual, posiblemente inmediatamente por debajo de Sry (Morais da Silva et al, 1996). Esta expresión de Sox9, específica del sexo masculino, también ha sido observada en las crestas genitales del pollo y de la tortuga, coincidiendo con la determinación testicular en esas especies (Koopman, 1999). En un estudio reciente, realizado en un embrión humano de 6 semanas, se describió que la localización subcelular de SOX9 se transloca del citoplasma al núcleo en las células de la cresta genital masculina en el momento de la diferenciación testicular y de la secreción de AMH. Por lo tanto, se concluyó que la expresión de SOX9 muestra dimorfismo sexual (de Santa Barbara et al, 2000).

Las mutaciones de SOX9 que resultan en reversión sexual se encuentran a lo largo del gen, y no existe una correlación entre el tipo de mutación y el fenotipo. Sólo 75% de los individuos XY heterocigotos para mutaciones en SOX9 presentan displasia campomélica con reversión sexual, indicando que la haploinsuficiencia de este gen es responsable de ambos efectos fenotípicos (Foster et al, 1994; Wagner et al, 1994). Otras mutaciones de SOX9 resultan en displasia campomélica sin reversión sexual XY, mientras que las mutaciones en pacientes XX no son informativas respecto a sus efectos en la determinación sexual masculina (Schaefer et al, 1995).

#### 1.4 GENES QUE PARTICIPAN EN EL DESARROLLO GONADAL

Durante las primeras etapas del desarrollo de los mamíferos, las futuras gónadas (ovario y testículo) son histológicamente indistinguibles y, por lo tanto, se denominan gónadas bipotenciales o indiferenciadas. Estas gónadas bipotenciales

se originan de la cresta urogenital, una región adyacente al mesonefros que contribuye con líneas celulares a la corteza adrenal, a las gónadas y al riñón (Capel, 2000).

Estudios recientes han identificado dos factores de transcripción que participan de manera clave en el desarrollo de la gónada, *WT1* y *SF1*, que se describen a continuación.

#### 1.4.1 El gen *WT1*

El gene *WT1* fue originalmente identificado como un oncogene localizado en el cromosoma 11, implicado en la etiología del cáncer renal infantil o tumor de Wilms (Call et al, 1990). La clonación de *WT1* se guió en gran parte por las deleciones cromosómicas heterocigotas en el cromosoma 11p13, asociadas al síndrome de WAGR que es un padecimiento que incluye tumor de Wilms, aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental (Miller et al, 1964). El fenotipo WAGR refleja la deleción de varios genes contiguos, que incluyen *WT1* y el factor de transcripción *PAX6*, asociado a aniridia en pacientes sin WAGR (Parker et al, 1999b).

Mediante procesamiento alternativo (Haber et al, 1991) y varias señales de inicio de traducción (Bruening y Pelletier, 1996), el gen *WT1* genera al menos ocho isoformas diferentes de una proteína de unión a DNA con dedos de zinc, se ha sugerido que regula la transcripción génica por la interacción con secuencias de DNA específicas  *río arriba*  de genes blanco. Las diferentes isoformas de *WT1* difieren en sus afinidades de unión al DNA, pero además se localizan diferencialmente dentro del núcleo dependiendo de la presencia o ausencia de un procesamiento alternativo que introduce tres aminoácidos (lisina-treonina-serina, KTS) entre los dedos de zinc 3 y 4 (Bickmore, et al 1992).

Además de ser un mediador en la supresión de tumores, *WT1* tiene una función esencial en la diferenciación del tracto urogenital. Este gen se expresa muy tempranamente en el desarrollo de la cresta urogenital y ocasiona un patrón de

expresión específico en los riñones y gónadas en desarrollo (Pritchard-Jones et al,1990). En el testículo y en el ovario, la expresión se restringe a las células de Sertoli y de la granulosa, respectivamente (Armstrong et al,1992). En el ratón, el gen *Wt1* se expresa a los 9 dpc en la cresta genital indiferenciada de machos y hembras, mientras que la expresión en las gónadas maduras ocurre en las células somáticas de ambos sexos (Pelletier et al, 1991a). Los estudios realizados en ratones transgénicos provocando experimentalmente la disrupción de las dos copias de *Wt1* han demostrado la incapacidad para la formación de riñones y gónadas, evidenciando su papel esencial en el desarrollo de estos órganos (Kreidberg et al,1993). Estos resultados, aunados a los patrones de expresión y a los fenotipos observados por mutaciones en *Wt1*, sugieren que este gen se exprese antes que *Sry* y que regule genes blanco esenciales para la gonadogénesis en ambos sexos (Schafer,1995; Parker et al,1999a).

Además del tumor de Wilms clásico y del síndrome de WAGR, las mutaciones de *WT1* están asociadas con otros dos desórdenes humanos: el síndrome de Denys-Drash y el síndrome de Frasier. El síndrome de Denys-Drash (DDS) es un padecimiento autosómico dominante que se caracteriza por nefropatía de inicio temprano, anomalías gonadales y urogenitales, y tumor de Wilms (Drash et al,1970). En estos pacientes las anomalías gonadales son muy variables, desde estrías gonadales y reversión sexual de genitales externos e internos, hasta pseudohermafroditismos en individuos XY. De hecho, los estudios citogenéticos revelan que la mitad de las mujeres afectadas con DDS presenta cariotipo 46,XY asociado a gónadas disgenéticas (Miller et al, 1964). El DDS es casi siempre resultado de mutaciones puntuales en la región de dedos de zinc del producto de *WT1*, que impiden su unión al DNA. Por lo tanto, estas proteínas mutantes probablemente actúan de manera dominante negativa, inhibiendo la función de la proteína codificada por el alelo normal (Pelletier et al, 1991b; Hastie, 1993).

En el síndrome de Frasier, los pacientes no desarrollan tumor de Wilms pero presentan disgenesia gonadal, pseudohermafroditismo masculino y glomerulopatía, aunque menos severa que en DSS. Las mutaciones de *WT1* que se han identificado en el síndrome de Frasier se concentran en el intrón 9 del gen

*WT1* y aparentemente interfieren con el procesamiento alternativo del mismo evitando la síntesis de las isoformas +KTS (Barboux et al, 1997). Esta evidencia sugiere que la isoforma +KTS es fundamental para el desarrollo gonadal pero no juega un papel esencial para suprimir la aparición del tumor de Wilms (Parker et al, 1999a).

#### 1.4.2 Factor esteroideogénico 1 (*SF-1*)

El factor esteroideogénico 1, *SF-1*, fue inicialmente identificado como un factor de transcripción que regula la expresión tejido específica de las enzimas esteroideogénicas en las células adrenocorticales (Lala et al, 1992). Subsecuentemente, el aislamiento de un cDNA para *SF-1* mostró que éste pertenece a la familia de receptores de hormonas nucleares de los factores de transcripción que regulan las acciones de las hormonas esteroides, de la hormona tiroidea, de la vitamina D y de los retinoides (Evans, 1988).

En el ratón, tanto en el embrión masculino como femenino, se ha demostrado que *Sf-1* se expresa en la cresta urogenital entre 9 y 9.5 dpc; lo cual lo sitúa en una etapa temprana de la organogénesis de las gónadas en desarrollo y antes de la expresión de *Sry*. Es interesante señalar que la expresión de *Sf-1* después de 12.5 dpc revela un patrón de expresión sexualmente dimórfico: los niveles de los transcritos de *Sf-1* aumentan con el inicio de la diferenciación testicular, pero disminuyen durante la formación de los ovarios y sólo reaparecen a medida que maduran más folículos (Ikeda et al, 1994; Root, 1999). Esto sugiere que la expresión persistente de *Sf-1* pueda interferir con la diferenciación ovárica (Ingraham et al, 1994).

El análisis de ratones, de ambos sexos, *knockout* para *SF-1* mostró agenesia de glándulas adrenales y de gónadas, resultando en una deficiencia en corticosterona que posiblemente fue la causa de muerte a los 8 días de nacidos (Luo et al, 1994). Como se esperaba, la degeneración de los testículos antes de la producción de andrógenos y AMH provoca que los ratones XY *knockout* también presenten reversión sexual, masculina a femenina, de los tractos urogenitales externos e

internos (Parker et al, 1999b). El análisis de genes reporteros con la región promotora del gen *AMH* en células de Sertoli transfectadas y en ratones transgénicos sugirió que *SF-1* también regule la expresión de *AMH* (Shen et al, 1994).

Además de los órganos esteroideogénicos, los transcritos de *SF-1* también han sido detectados en la hipófisis anterior y en el hipotálamo. Estos sitios múltiples de expresión de *SF-1* son responsables del fenotipo clínico del ratón *knockout* y sugieren que sin la expresión de *SF-1* la cresta gonadal sufre una apoptosis prematura (Root, 1999).

En conjunto, las evidencias sugieren que *SF-1* regula la expresión de ambas hormonas críticas para el desarrollo masculino (andrógenos y *AMH*), además de participar en otros niveles del eje endócrino (Parker et al, 1999b).

Resumiendo, *SF-1* parece ser necesario para el mantenimiento de la cresta urogenital bipotencial y subsecuentemente juega un papel importante en el testículo activando *AMH* en las células de Sertoli y controlando las vías de síntesis de andrógenos en las células de Leydig. Además, tendría una acción importante, hasta ahora desconocida, en el ovario en desarrollo (Sinclair, 1998; Capel, 1998).

En el humano, el gen *SF-1* se localiza en 9q33 (Taketo et al, 1995), una región cromosómica que no ha sido asociada con problemas de diferenciación sexual. Tampoco se han descrito pacientes con desórdenes asociados a mutaciones en *SF-1*, pero se podría predecir que el fenotipo sería predominantemente femenino con problemas neonatales severos debidos a la falta de hormonas esteroides (Parker et al, 1999a)

#### 1.4.3 El gen *DAX-1*

La existencia de un gen ligado al X relacionado con la determinación sexual humana fue postulado por German et al. (1978) en una familia con disgenesia gonadal 46,XY y un aparente patrón de herencia ligado al X. Posteriormente se informaron otras familias con este padecimiento por transmisión recesiva ligada al X o autosómica dominante limitada al sexo (Fechner et al, 1993).

La descripción de 12 individuos con duplicaciones parciales de Xp y un gen *SRY* intacto llevó a Bardoni et al. (1994) a analizar si la reversión sexual se debía a un efecto de dosis génica o a que las duplicaciones tuvieran puntos de ruptura similares, interrumpiendo un gen que participe en la determinación sexual. De esta manera, se identificó un *locus* de 160 kb en el cromosoma X (*DSS, Dosage Sensitive Sex reversal*) que cuando está duplicado resulta en reversión sexual masculina a femenina. En esta región Zanaria et al (1994) clonaron el gen *DAX-1 (Dosage sensitive sex reversal-AHC critical region on the X chromosome, gene 1)* cuyas mutaciones causan hipoplasia adrenal congénita (AHC). Los datos obtenidos de la expresión de *Dax1* en el ratón lo han equiparado con *DSS* (Swain et al, 1996; Swain et al, 1998).

Los pacientes con AHC presentan insuficiencia adrenal en la infancia y, si sobreviven mediante corticoesteroides, muestran características de hipogonadismo hipogonadotrófico en la pubertad (Parker et al, 1999b). La combinación de un desarrollo adrenal anormal aunado al hipogonadismo hipogonadotrófico es similar al fenotipo observado en los ratones *knockout* para *SF1*, lo que sugiere que *DAX1* y *SF1* participen en la misma vía de desarrollo endócrino (Parker et al, 1999a). Además, se ha demostrado que ambos genes se expresan en cuatro órganos en desarrollo: las gónadas, la corteza adrenal, la hipófisis y el hipotálamo (Goodfellow y Camerino, 1999).

El gen *DAX-1* codifica para un miembro huérfano (se desconoce su ligando) y atípico (carece del motivo de unión de dedos de zinc) de la superfamilia de receptores hormonales nucleares; esto último sugiere que *DAX1* regule la expresión génica mediante interacciones proteína-proteína (Parker et al, 1999a). La secuencia de *DAX-1* contiene un marco de lectura abierto único, interrumpido por un intrón de 3 kb, con un producto proteico que varía entre 470 y 474 aminoácidos en las diferentes especies analizadas a la fecha (Goodfellow y Camerino, 1999).

En el ratón, la expresión de *Dax-1* en la gónada coincide con la de *Sry* en el 11.5 dpc, continúa en el ovario pero se apaga en el testículo después del inicio del desarrollo de los cordones, aproximadamente en el 12.0 dpc (Swain et al, 1996).

La expresión de *DAX-1* es reprimida por la acción de *SRY* durante la diferenciación testicular, por lo tanto, la duplicación de *DAX-1* en individuos 46,XY conduce a reversión sexual masculina a femenina. En los varones 46,XY normales el efecto de *SRY* es dominante mientras que en las mujeres 46,XX normales *DAX-1* parece antagonizar determinantes genéticas testiculares secundarias, como *SOX9*, favoreciendo la diferenciación ovárica (Root 1999; Hiort y Holterhus, 2000). Además, la identificación de que los individuos XY con pérdida de DSS se desarrollen como varones, sugirió que este *locus* no se requiere en la diferenciación testicular normal, pero que cuando está presente en doble dosis impide la formación del testículo (Goodfellow y Camerino, 1999).

Inicialmente se había propuesto que *DAX1* fuera un gen determinante de ovario (Bardoni et al, 1994). Sin embargo, se observó que la inactivación dirigida de *Dax1* en el ratón no afecta el desarrollo ovárico, pero bloquea la espermatogénesis en los machos. Por lo tanto, se concluyó que *Dax1* es un gen *antitestículo* y no un gen determinante de ovario, pero que además participa en la espermatogénesis (Swain et al, 1998; Yu et al, 1998a).

Se han descrito un gran número de mutaciones puntuales y deleciones en el gen *DAX1* de pacientes con AHC (Goodfellow y Camerino, 1999). La identificación de mutaciones en *DAX-1* en 17 familias con hipoplasia suprarrenal congénita reveló que 23 individuos corresponden a corrimiento del marco de lectura, 12 a mutaciones sin sentido, 6 a mutaciones de sentido equivocado y 1 a la deleción de un codón. Cuando estos últimos 7 cambios de aminoácidos fueron analizados en un modelo homólogo, construido mediante estructuras cristalinas tridimensionales del receptor de la hormona tiroidea y del receptor alfa del retinoide X, se observó que todos se localizaban en el extremo carboxilo de la proteína *DAX-1*, en particular en el dominio hidrofóbico conservado de unión a ligando (LBD, *ligand-binding domain*) (Zhang et al, 1998).

Como se esperaría para una enfermedad recesiva ligada al X, las portadoras heterocigotas de mutaciones para AHC son normales. La existencia de mujeres homocigotas deficientes en *DAX1* sería muy rara, ya que los varones necesarios para transmitir el alelo no funcional son estériles (Goodfellow y Camerino, 1999).

Es interesante señalar que en marsupiales y monotremas la región sinténica de Xp21, incluyendo *DAX1*, se localiza en un autosoma y que probablemente no sea parte de un cromosoma X primitivo (Graves, 1996).

## 1.5 INTERACCIONES GENÉTICAS EN EL DESARROLLO GONADAL

Tanto la determinación como la diferenciación sexual requieren de una serie de eventos complejos en los tejidos y en los tiempos apropiados durante el desarrollo. Los defectos en cualquiera de estos pasos conlleva a una diferenciación sexual anormal. Aun cuando se sabe que *SRY* es el principal mediador de la determinación sexual masculina, se desconoce como este gen es capaz de desencadenar los eventos críticos del desarrollo. Como se expuso anteriormente, existen genes autosómicos (*WT1* y *SF-1*) y ligados al X (*DAX1*) que también juegan papeles críticos en la determinación y en la diferenciación sexual. Por ello, las investigaciones actuales están dirigidas a definir las interacciones potenciales entre estos genes para explicar su cooperación en la gonadogénesis (Parker et al, 1999b).

### 1.5.1 *SF-1* y *WT1*

El análisis *in vitro* con proteínas recombinantes o en ensayos híbridos de mamíferos ha mostrado que las proteínas *WT1* y *SF-1* forman heterodímeros. Más aun, la cotransfección con *Wt1* aumenta la activación transcripcional del promotor de *AMH* dependiente de *SF-1*. Este efecto fue más pronunciado con la isoforma -KTS de *WT1*, lo cual resulta raro tomando en cuenta que los pacientes con síndrome de Frasier sugieren una aparente relación entre la isoforma +KTS y la gonadogénesis (Nachtigal et al, 1998). Sin embargo, parecería que *WT1* no es absolutamente esencial para la expresión de *SF1* ya que los ratones *knockout* para *Wt1* todavía muestran niveles detectables de transcritos de *Sf-1* en las gónadas en proceso de degeneración (Parker et al, 1999b).

Por otro lado también se ha demostrado que además de *WT1*, al menos *in vitro*, la

proteína SOX9 también es capaz de estimular al promotor de AMH en presencia de SF-1. Esto llevó a proponer que ambos factores de transcripción, SOX9 y SF-1, pudieran participar en la expresión de AMH, ya sea como resultado de su respectiva unión al promotor de AMH como por su habilidad para interactuar entre sí (de Santa Barbara et al, 1998).

Por lo tanto, se desconoce qué factores son necesarios para la activación *in vivo* de AMH o si se requiere que todos participen en una manera sinérgica (Parker et al, 1999b).

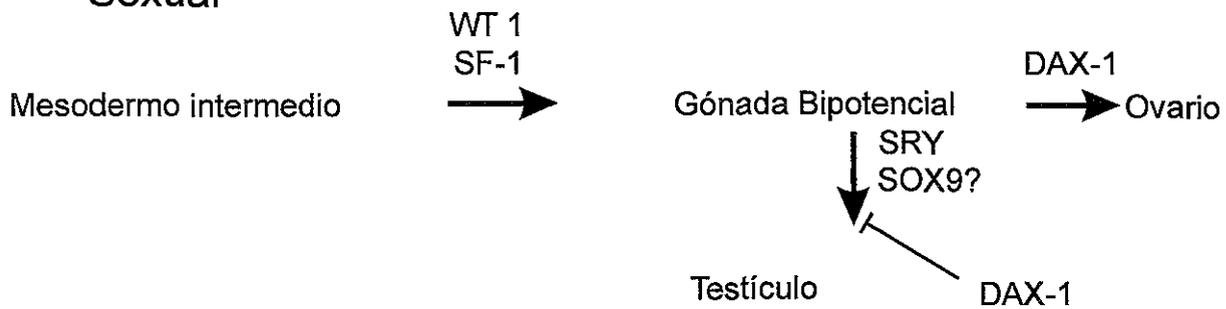
### 1.5.2 SF-1 y DAX-1

La naturaleza de la interacción entre SF-1 y DAX-1 difiere considerablemente en los estudios realizados, proponiéndose varios modelos. Uno de ellos postula que DAX-1 puede formar heterodímeros con SF1, lo cual resultaría en una inhibición de la activación de transcripción mediada por SF-1 (Ito et al, 1997). Alternativamente, se ha propuesto que DAX-1 interfiere con la acción de SF-1 al unirse a estructuras tallo-asa en la región 5' de los genes que responden a SF-1, lo que presumiblemente bloquearía el acceso de SF-1 a estos promotores (Zazapoulos et al, 1997). Finalmente, existen informes de que SF-1 puede interactuar con elementos promotores  *río arriba*  de DAX-1 para inducir su expresión (Burris et al, 1995; Yu et al, 1998b). Aparentemente, las consecuencias funcionales de las interacciones propuestas entre DAX-1 y SF-1 varían dependiendo del tejido. En la corteza adrenal, SF-1 y DAX-1 podrían cooperar para la activación de los genes blanco requeridos en las funciones tejido específico; en contraste, en las células gonadales las acciones de SF-1 y DAX-1 parecen ser antagónicas (Parker et al, 1999b).

En la Fig. 1.1 se resumen los principales eventos moleculares que ocurren durante los procesos de determinación y diferenciación sexual. La Fig. 1.2 muestra las interacciones celulares y moleculares durante la inducción gonadal.

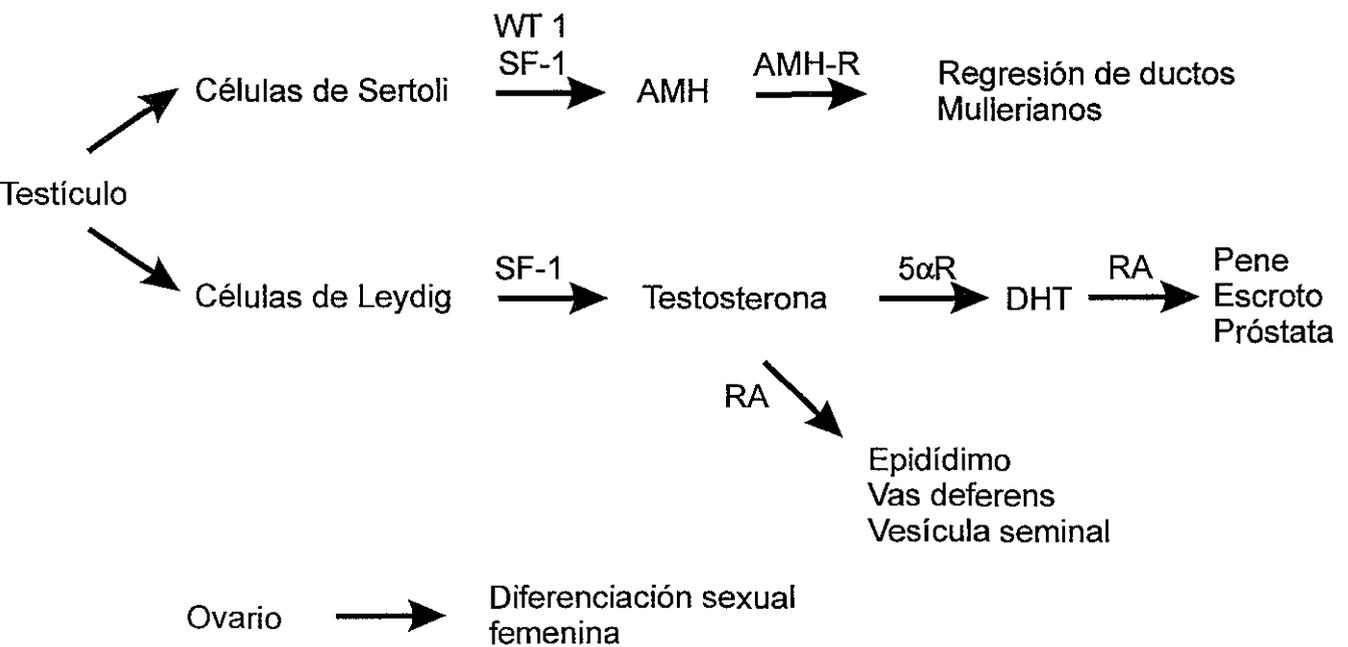
1)

### Determinación Sexual



2)

### Diferenciación Sexual



1.1 Resumen de los principales eventos moleculares que ocurren en los mamíferos durante la :  
 Determinación sexual y (B) Diferenciación sexual.

indican las posiciones de los genes ( WT1 , SF-1, DAX-1, SRY, SOX9 y AMH) que intervienen  
 estos procesos. AMH-R : receptor de la hormona anti-Mulleriana; 5 $\alpha$ R: 5 $\alpha$ -reductasa; DHT dihidrotestosterona;  
 receptor de andrógenos. Modificado de Parker et al, 1999b

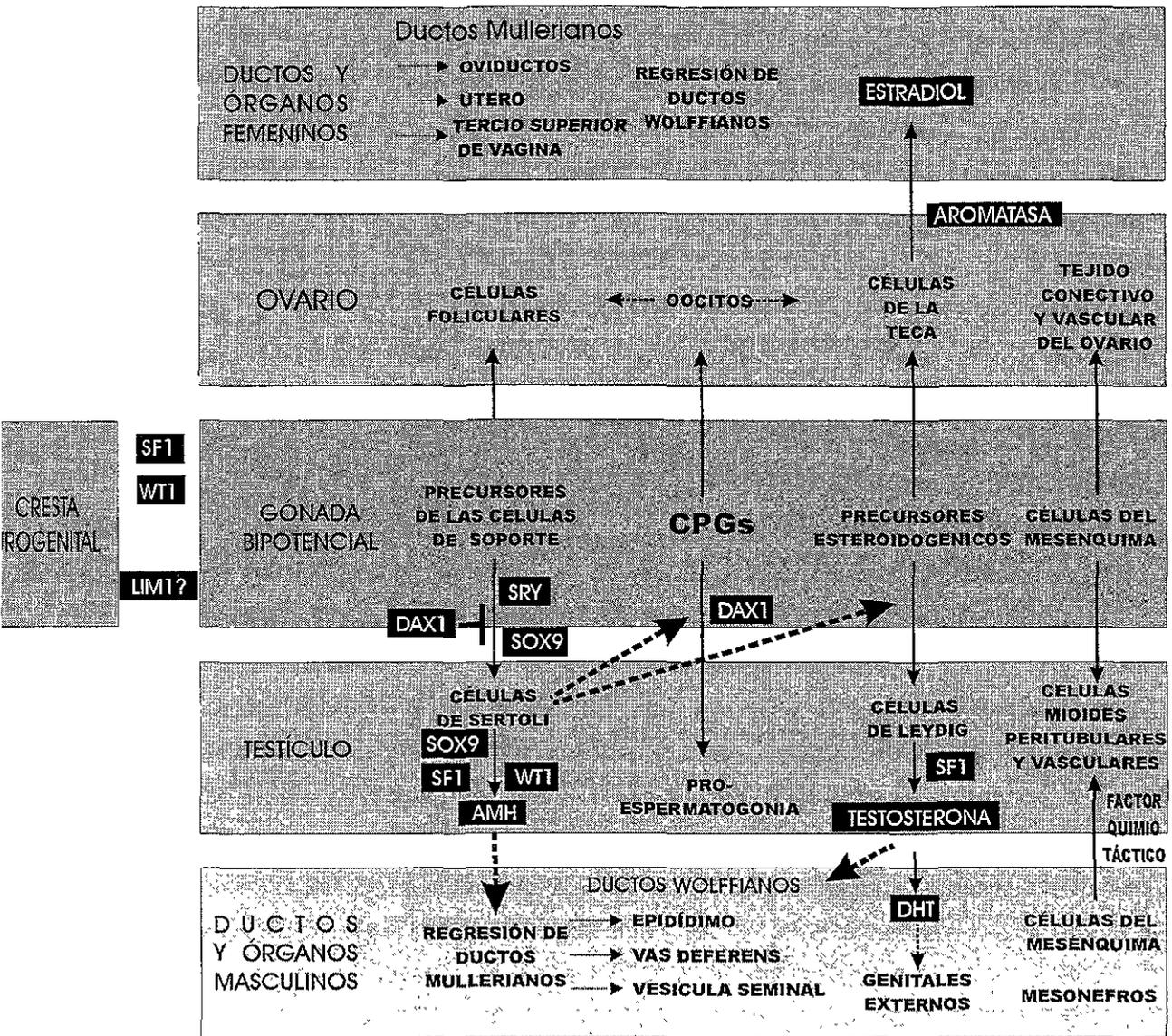


Fig.1.2 Interacciones celulares y moleculares durante la inducción gonadal. ( modificado de Koopman, 1999 )

## 1.6 ANOMALIAS DE LA DIFERENCIACION SEXUAL

Actualmente se conocen varios genes que tienen funciones críticas en el desarrollo de la gónada y en los procesos de determinación y diferenciación sexual. Sin embargo, seguramente existen genes adicionales aun no identificados que participan en estas complejas vías del desarrollo. Por ejemplo, el gen *DMT1* posee una región homóloga a un gen en *Drosophila* implicado en la determinación sexual, además de que se expresa selectivamente en testículo y se localiza en la región distal del brazo corto del cromosoma 9 relacionado con la reversión sexual XY (Raymond et al, 1998). Recientemente, se han descrito varios genes esenciales para los eventos tempranos del desarrollo gonadal que incluyen *Lim1* (Shawlot y Behringer, 1995), *Emx* (Miyamoto et al, 1997) y *Wnt-4* (Vainio et al, 1999).

De lo anterior se deduce que en el ser humano las anomalías genéticas en los procesos complejos de determinación y diferenciación sexual, resulten en diferentes desórdenes o padecimientos. Sin embargo, debido a que las mutaciones que afectan estos procesos complejos no son letales, sino que resultan en reversión sexual completa o parcial, han sido muy importantes en la disección de la cascada génica que conduce a un fenotipo masculino o femenino normal.

A continuación se discutirán las principales características clínicas, citogenéticas y moleculares de los padecimientos estudiados en este trabajo: síndrome de Turner, disgenesia gonadal pura XY, síndrome de varón XX y hermafroditismo verdadero.

### 1.6.1 Síndrome de Turner

El fenotipo asociado al cariotipo 45,X se conoce como síndrome de Turner por la descripción clínica que realizó Turner en 7 pacientes con talla baja, infantilismo sexual, cuello alado, baja implantación de cabello y *cubitus valgus* (Turner, 1938). Sin embargo, en 1930 Ullrich había informado de un caso con un marcado

linfedema congénito, además de otras características clínicas, por lo que este síndrome es denominado Ullrich-Turner (Ullrich 1949).

La primera evidencia del fundamento cromosómico del síndrome de Turner fue el hallazgo de Polani y cols. (1954) de que estas pacientes no presentaban cromatina X. Cuando las técnicas de cultivo permitieron asignar el número correcto de cromosomas en el humano, Ford y cols (1959) informaron que la constitución cromosómica en una paciente de 14 años con síndrome de Turner era 45,X.

El síndrome de Turner constituye una de las anomalías cromosómicas más comunes con un frecuencia de 1 en 2500 niñas recién nacidas. Clínicamente se caracteriza por fenotipo femenino, talla baja, amenorrea primaria, estrías fibrosas bilaterales y diversas anomalías somáticas asociadas como linfedema congénito en manos y pies, implantación baja del cabello, cuello alado, anomalías cardíacas y renales, y la presencia de múltiples nevos, entre otras (Grumbach y Conte, 1998).

El resultado de varios estudios en sangre periférica ha demostrado que 40-60% de las pacientes con síndrome de Turner son monosómicas para el cromosoma X, el resto presenta un cromosoma X o Y estructuralmente anormal o son mosaicos 45,X con una segunda línea celular con un cromosoma sexual normal o anormal (Hall y Gilchrist, 1990). No obstante, el estudio citogenético y molecular en linfocitos y fibroblastos de 87 casos reveló que 66.7% eran mosaicos (particularmente debido a la presencia de cromosomas marcadores, 18.4%), y que sólo 20.7% eran 45,X. Estos resultados llevaron a sugerir que el mosaicismo ejerce un efecto fetoprotector y que los casos 45,X que sobreviven a la etapa embrionaria y fetal, corresponden a mosaicos crípticos con pérdida gradual, o incapacidad de la detección citogenética, de la segunda línea cromosómica (Held et al, 1992). Se ha estimado que 99% de los fetos 45,X se abortan espontáneamente por lo que se estima que 5-10% de los abortos espontáneos y 1-2% de las concepciones corresponden a monosomías del X (Hook y Warburton, 1983).

Los estudios moleculares en diferentes poblaciones han demostrado que las

pacientes con síndrome de Turner pueden presentar secuencias del cromosoma Y con una frecuencia que varía de 0-61% (Binder et al, 1995; Coto et al, 1995; Fernández et al, 1996; López et al, 1998; Patsalis et al, 1998; Quilter et al, 1998). Este dato es muy importante ya que la presencia de material genético derivado del cromosoma Y en pacientes con disgenesia gonadal se ha correlacionado con un riesgo elevado (10-20%) de desarrollar neoplasias gonadales (Verp y Simpson, 1987). Page (1987) propuso la existencia del gen *GBY*, (*Gonadoblastoma gene, Y-chromosome*) cerca del centrómero o en el brazo largo del cromosoma Y, con una función fisiológica no definida en varones normales, pero con la habilidad de predisponer la malignización de las gónadas disgenéticas. Posteriormente, Tsuchiya y cols. (1995) analizando pacientes con reversión sexual XY y gonadoblastomas estimaron que el gen *GBY* se localiza en una región de 1-2Mb cercana al centrómero. Más aun, sus resultados indicaron la presencia de copias de 2 familias génicas del cromosoma Y, *TPSY* (*testis-specific protein, Y-encoded*) y *YRRM* (*Y-chromosome RNA recognition motif*), en todos los casos estudiados aun cuando sólo las copias de *TSPY* se localizan en la región crítica de *GBY*. También se observó la expresión de ambos genes en dos muestras de gonadoblastoma. Estos datos no implican directamente a *TSPY* o a *YRRM* en la etiología de este tumor, pero si sugieren la posibilidad de que existan múltiples *loci* de *GBY* dispersos en el cromosoma Y.

Actualmente se considera que el fenotipo Turner se debe a una haploinsuficiencia de uno o más genes en el cromosoma X y no a la monosomía de este cromosoma *per se* (Zinn y Ross, 1998). De acuerdo a este modelo, el *locus* responsable debe tener un homólogo en el cromosoma Y, debe escapar el mecanismo de inactivación del cromosoma X y transcribirse activamente durante el desarrollo. Entre los genes que han sido propuestos como candidatos están *ZFX/ZFY* (Page et al, 1987) y *RPS4X/RPS4Y* (Fisher et al, 1990); sin embargo, evidencias posteriores no los apoyan como responsables del fenotipo Turner (Page et al, 1990; Just et al, 1992). Por otro lado, se propuso que la haploinsuficiencia del gen homeótico *SHOX*, localizado en la región pseudoautosómica, fuera responsable de la talla baja observada en el síndrome de Turner (Rao et al, 1997).

Recientemente, Clement-Jones y cols (2000) describieron la expresión de *SHOX* en la formación de las extremidades y en el primero y segundo arco faríngeo, durante el desarrollo embrionario humano. Además, observaron mutaciones sin sentido de *SHOX* en individuos con talla baja y características esqueléticas dismórficas asociadas al fenotipo Turner. Estos datos aportan la primera evidencia de que este gen esté implicado tanto en estatura baja como en algunas anomalías esqueléticas observadas en el síndrome de Turner (*cubitus valgus*, metacarpianos cortos, paladar alto y arqueado, entre otras).

La identificación de los genes anti-Turner ha sido complicada por la variabilidad fenotípica entre individuos con un mismo cariotipo, aun cuando se ha intentado localizar estos genes correlacionando características fenotípicas con deleciones parciales del cromosoma X (Ogata y Matsuo, 1995).

En un principio se consideró que el ratón XO constituía un modelo para el estudio del síndrome de Turner (Cattanach, 1962). Sin embargo, el efecto del cariotipo XO en el ratón es menos severo que en el humano, estos ratones son fértiles y su viabilidad *in utero* es mayor comparada con la del humano. Además, no existen evidencias obvias de anomalías físicas, ni crecimiento alterado (Lyon y Hawker, 1973; Ashworth et al, 1991).

Recientemente se han informado mutaciones en el gene *SRY* en pacientes femeninas con mosaicismo con cromosoma Y. En una paciente con cariotipo 45,X/47,XYY se identificó una mutación de corrimiento de fase en la posición 422 del gen *SRY*, concluyéndose que era la responsable de las estrías bilaterales y el fenotipo femenino (Takagi et al, 1999). Por otra parte nuestro grupo describió una mutación de sentido equivocado, en el extremo 5' fuera de la caja HMG, en dos casos 45,X/46,XY con fenotipo Turner y estrías bilaterales (Canto et al, 2000). Esta mutación había sido previamente descrita en una paciente 46,XY con disgenesia gonadal parcial que presentaba un testículo anormal (Domenice et al, 1998). Estos datos sugieren la existencia de un *hotspot* en esta región del gen *SRY* e indican que una misma mutación puede expresarse en fenotipos diferentes (Canto et al, 2000).

## 1.6.2 REVERSION SEXUAL

La discordancia entre el sexo cromosómico y el gonadal-fenotípico se conoce como reversión sexual. En el humano se reconocen dos tipos de reversión sexual completa: los varones XX que carecen de un cromosoma Y pero desarrollan testículos bilaterales y tienen fenotipo masculino y su contraparte, las mujeres 46,XY que en presencia de un cromosoma Y no presentan desarrollo testicular y, en consecuencia, el fenotipo es femenino.

La reversión sexual incompleta o parcial incluye varones XX con ambigüedad genital y el hermafroditismo verdadero 46,XX ó 46,XY.

### 1.6.2.1 Disgenesia Gonadal Pura 46,XY

El término disgenesia gonadal pura 46,XY fue utilizado originalmente en pacientes que presentan estrías fibrosas bilaterales sin estigmas somáticos de síndrome de Turner (Swyer, 1955). El padecimiento se puede presentar en la forma completa o parcial: en la primera, los individuos afectados se caracterizan por presentar fenotipo femenino, amenorrea primaria, estrías fibrosas bilaterales, ausencia de desarrollo de caracteres sexuales secundarios y talla normal (Vilain et al, 1993). En las variantes conocidas como disgenesias parciales, el fenotipo depende tanto del momento específico de la gestación en el cual se produce el daño gonadal, como del grado de afección existente en cada uno de los compartimentos testiculares (Kofman-Alfaro et al, 1989).

En la mayoría de los casos, el motivo de consulta es ausencia de características sexuales secundarias o amenorrea primaria, aunque algunas pacientes pueden presentar manifestaciones leves de ambigüedad genital como clitoromegalia (Schmitt-Ney et al, 1995).

En los individuos con la forma completa se observa hipogonadismo hipergonadotrópico, mientras que en la forma parcial existe variabilidad en la secreción hormonal, de acuerdo con el grado de afección testicular. En la forma clásica existe la presencia de trompas de Falopio y útero pequeño, hallazgos que son variables en las formas parciales (Kofman-Alfaro et al, 1989). En ambos tipos se observa un riesgo elevado (20-30%) de tumores gonadales, por lo que está indicada la remoción quirúrgica de las gónadas disgenéticas (Scully, 1970).

La mayoría de las mutaciones de *SRY* identificadas en mujeres XY se localizan en la caja HMG, pero también se han descrito mutaciones fuera de la caja HMG, que presumiblemente actúen alterando la expresión de *SRY*. En la tabla 1.1 se resumen las principales mutaciones descritas.

Tabla 1.1 Resumen de las principales mutaciones en SRY en pacientes con disgenesia gonadal 46,XY

Mutación	Codón	Nucleótido	Aminoácido	Referencia
<b>1.-En la caja HGM</b>				
<b>a.- Sin sentido</b>				
	70	TGG-TAG	Trp-ALTO	Hawkins et al, 1992a
	74	tCAG-TAG	Gln-ALTO	Affara et al, 1993
	86	gCGA-TGA	Arg-ALTO	Cameron et al, 1997
	92	cAAG-TAG	Lys-ALTO	Müller et al, 1992
	93	gCAG-TAG	Gln-ALTO	McElreavy et al, 1992a
	97	cCAG-TAG	Gln-ALTO	Bilbao et al, 1996
	107	TGG-TAG	Trp-ALTO	Iida et al, 1997
	127	TAT-TGT	Tyr-ALTO	McElreavy et al, 1992b
<b>b.-Sentido equivocado</b>				
	18	AGT-AAT	Ser-Asn	Domenice et al 1998
	60	aGTG-CTG	Val-Leu	Hawkins, 1993
	62	gCGA-GGA	Arg-Gly	Affara et al, 1993
	64	ATG-AGG	Met-Arg	Scherer et al, 1998
	64	ATGa-ATA	Met-Ile	Hawkins et al, 1993
	67	aTTC-GTC	Phe-Val	Scherer et al, 1998
	68	ATC-ACC	Ile-Thr	McElreavy et al, 1992b
	78	ATG-ACG	Ser-Gly	Affara et al, 1993
	87	AAC-ATC	Asn-Tyr	Okuhara et al, 2000
	90	ATCa-ATG	Gly-Arg	Hawkins et al, 1992a
	91	cAGC-GGC	Lys-Ile	Schmitt et al, 1995
	95	gGGA-CGA	Phe-Ser	Hawkins, 1993
	106	AAA-ATA	Ala-Thr	Hawkins et al, 1992b
	109	TTC-TCC	Pro-Leu	Jäger et al, 1992
	113	gGCA-ACA	Tyr-Cys	Zeng et al, 1993
	125	CCG-CTG	Arg-Trp	Schmitt-Ney et al, 1995
	127	TAT-TGT	Tyr-Cys	Poulat et al, 1994
	133	tCGG-TGG	Arg-Trp	Veitia et al, 1997
<b>c.- corrimiento de fase</b>				
	107	Delección 1pb		Hawkins et al, 1992b
	120	Delección 4pb		Jäger et al, 1990
<b>2.- Otra región codificante</b>				
<b>a.- sin sentido</b>				
	2	gCAA-TAA	Gln-ALTO	Brown et al, 1998
	4	TATg-TAA	Tyr-ALTO	Veitia et al, 1997
	163	TTG-TAG	Leu-ALTO	Tajima et al, 1994

Es interesante señalar que en dos mujeres XY, que habían desarrollado gonadoblastoma y disgerminoma asociado, se describieron mutaciones en *SRY*, sugiriendo que este gen juegue un papel en la formación de tumores gonadales (Uehara et al, 1999).

Sólo 10-15% de los casos con disgenesia gonadal pura 46,XY presentan mutaciones en el gen *SRY*, sugiriendo que mutaciones en genes blanco o activados por *SRY* puedan causar reversión sexual. Los genes que determinan la expresión correcta de *SRY* deben proveer el ambiente gonadal adecuado para que en presencia de *SRY* se active en el momento apropiado. De manera similar, los genes por debajo de *SRY* deben actuar correctamente para dar lugar a las estructuras testiculares apropiadas. Debido a la falta de especificidad de unión de la proteína *SRY*, no se ha podido esclarecer qué genes son activados por ella. Por lo tanto, la identificación de genes responsables de diversos padecimientos que cursan con reversión sexual parcial o completa ha permitido reconocer la participación y la jerarquía de cada uno de estos en la cascada de la diferenciación sexual (López et al, 1998; Roberts et al, 1999; Capel et al, 2000).

Otra de las causas de reversión sexual en mujeres XY con una copia intacta de *SRY* es la presencia de microduplicaciones de Xp21 (Bernstein et al 1980; Bardoni et al, 1994). Posteriormente se identificó en esta región al gen *DAX-1*, cuyas mutaciones causan hipoplasia adrenal congénita (Muscatelli et al, 1994). Su función en el desarrollo de la gónada (discutido anteriormente) lo convierten en un candidato muy interesante para explicar el mecanismo por el cual las duplicaciones de Xp21 suprimen la formación del testículo. A la fecha, las evidencias moleculares apoyan la hipótesis de que *DAX-1* es responsable de la reversión sexual XY sensible a dosis génica, pero no son compatibles con los datos obtenidos de estudios transgénicos (Roberts et al, 1999). Los ratones XY transgénicos con copias extras de *Dax-1* muestran retraso en el desarrollo testicular pero no sufren reversión sexual. Sólo cuando este transgén es analizado contra alelos *débiles* de *Sry* se presenta reversión sexual completa, sugiriendo que

*Dax-1* puede antagonizar este efecto de *Sry* (Swain et al, 1998). Estos resultados indican que los mecanismos de reversión sexual XY con duplicación de Xp21 son más complejos que los efectos simples de dosis génica (Roberts et al, 1999). La observación de que duplicaciones aparentemente similares no siempre conducen a reversión sexual (Arn et al, 1994; Baumstark et al, 1996) sugieren efectos de posición o genes modificantes pueden influir en el fenotipo.

Por otro lado, ocasionalmente se han observado deleciones de 9p y de 10q en individuos con reversión sexual XY, sugiriendo que en estos segmentos cromosómicos existan genes requeridos en dos copias para un desarrollo testicular normal. En dos estudios realizados mediante el análisis de los puntos de ruptura, han localizado la deleción responsable de la disgenesia gonadal a la región 9p23.3-p24.1 y también han demostrado que tenía un origen paterno (Ogata et al, 1997; Veitia et al, 1997). En esta región se ha localizado al gen *DMRT1*, que en el humano se expresa únicamente en el testículo adulto (Raymond et al, 1999a) y en la cresta genital del embrión masculino, pero no del femenino, de manera similar a *SRY* (Moniot et al, 2000). Estudios recientes han delimitado la región a la porción distal de 9p24.3 y han identificado también al gen *DMRT2* en ella. Adicionalmente, se demostró por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) que tanto *DMRT1* como *DMRT2* estaban ausentes en un caso de reversión sexual XY con la deleción más pequeña de 9p descrita, sugiriendo que la disgenesia gonadal en los individuos con deleción de 9p sea debida a la homocigosidad combinada de *DMRT1* y *DMRT2* (Raymond et al, 1999b).

Por otro lado, las deleciones distales del brazo largo del cromosoma 10 (q25.3-q26.2) están asociadas con ambigüedad genital y reversión sexual en individuos 46,XY (Wulfsberg et al, 1989) Esta anomalía se acompaña de retraso mental severo, alteraciones craneofaciales y digitales y malformaciones cardíacas diversas. La histología de la gónada en estos pacientes es variable, desde gónadas disgenéticas hasta tejido testicular de apariencia normal (Wilkie et al, 1993). El fenotipo está en relación con la funcionalidad residual del tejido testicular. En la región 10q24-q25 se localizan algunos genes candidatos cuya alteración podría originar la disgenesia gonadal: el gen *p450c17* que interviene en

la síntesis de testosterona (Sparkes et al, 1991) y el gen *PAX2* que se expresa en el mesonefros (Sanyanusin et al, 1995).

#### 1.6.2.2 Varones XX

El síndrome de varón XX se caracteriza por fenotipo masculino, testículos bilaterales e infertilidad y se presenta con una frecuencia aproximada de 1:10,000-20,000 recién nacidos vivos. (de la Chapelle et al, 1964). Diversos estudios han demostrado que en la mayoría de los casos el fenotipo masculino es normal y que el resto, 10-15%, presenta ambigüedad genital (de la Chapelle et al, 1981; Grumbach y Conte, 1998). Therkelsen (1964) y Ferguson-Smith (1966) propusieron que los varones XX eran resultado de un intercambio desigual entre los cromosomas X y Y durante la meiosis paterna. El mejoramiento de las técnicas citogenéticas permitió observar cariotipos de varones XX con alteraciones en el tamaño del brazo corto de uno de los cromosomas X (Evans et al, 1979; Magenis et al, 1982). Posteriormente, la habilidad para clonar segmentos del cromosoma Y confirmaron la presencia de material genético derivado de este cromosoma en el genoma de varones XX ( Guellaen et al, 1984; Müller et al, 1985; Page et al, 1985; Affara et al, 1986).

En los últimos años, la aplicación de técnicas moleculares en el estudio de pacientes con anomalías de la diferenciación sexual ha permitido demostrar que 90% de los varones XX porta el gen *SRY* translocado a uno de sus cromosomas X, lo que explica su desarrollo testicular (Abbas et al, 1990; Ferguson-Smith et al, 1990; Donlon y Muller, 1991). El 10% restante es negativo para secuencias derivadas del cromosoma Y, postulándose que la reversión sexual en estos casos sea debida a mutaciones en genes, autosómicos o ligados al X, que también participan en la cascada génica que conduce a la determinación testicular. (Palmer et al, 1989; Abbas et al, 1990; López et al, 1995a).

El patrón de secuencias del cromosoma Y presentes en la mayoría de los varones XX muestra gran variabilidad en el tamaño del segmento translocado, pero siempre incluye a *SRY* por lo que resulta en reversión sexual (López et al, 1995b).

Inicialmente se considero que los pacientes positivos para material genético derivado del cromosoma Y mostraban virilización normal, en contraste con los varones XX negativos para *SRY* que presentan ambigüedad genital; sin embargo, reportes posteriores no apoyan esta hipótesis (Ferguson-Smith et al, 1990; Numabe et al, 1992; López et al, 1995a).

Aunque en general este padecimiento se presenta en forma aislada, existen 4 reportes en la literatura de casos familiares de varones XX (Nicolis et al, 1972; de la Chapelle et al, 1977; Minowada et al, 1979; Abbas et al, 1990). Además se han informado 9 casos de varones XX y de hermafroditas verdaderos coexistiendo en una misma familia, sugiriendo un origen genético común para ambos desórdenes (Berger et al, 1970; Kasdan et al, 1973; Vergnaud et al, 1986; Skordis et al, 1987; Palmer et al, 1989; Pereira et al, 1991; Kuhnle et al, 1993; McElreavy et al, 1993; Ramos et al, 1996). Es interesante señalar que en las 7 últimas familias los estudios moleculares revelaron que todas, a excepción de la informada por Palmer et al (1989), fueron negativas para secuencias del cromosoma Y; la mayoría de los varones XX en todas estas familias presentan genitales ambigüos.

### 1.6.2.3 Hermafrodistimo Verdadero

Los hermafroditas verdaderos son individuos en los que se encuentra tanto tejido testicular como ovárico, en forma separada o constituyendo un ovotestes, y un grado variable de ambigüedad genital. La gónada más comunmente encontrada es el ovotestes (60%), seguida de ovario y menos frecuentemente de testículo. El desarrollo de los ductos Wolffianos y Müllerianos depende del tipo de gónada presente y del grado de desarrollo testicular. En general, presentan útero pero éste es hipoplásico. En 60% de los casos el cariotipo es 46,XX, 20% presenta quimeras 46,XX/46,XY y otros mosaicos, y el resto son 46,XY (Grumbach y Conte, 1998).

La histología del testículo y de la porción testicular es idéntica en varones XX y hermafroditas verdaderos XX, mostrando espermatogonias normales en los pacientes jóvenes y tejido disgenético desprovisto de espermatogonias después

de los 5-8 años de edad (Toublanc et al, 1993). A diferencia de las disgenesias gonadales discutidas previamente (síndrome de Turner y disgenesia gonadal pura XY) el riesgo de malignización de las gónadas de los hermafroditas verdaderos es bajo (Warne y Zajac, 1998).

Contrariamente a lo que sucede con los varones XX, sólo una minoría de hermafroditas verdaderos 46,XX son *SRY* positivos y se ha sugerido que en el resto el desarrollo testicular sea resultado de (1) mutaciones en otros genes, autosómicos o ligados al X, implicados en la diferenciación gonadal, de manera análoga a lo que ocurre en los varones XX que son *SRY* negativos; (2) mosaicismo o quimerismo críptico o circunscrito a la gónada, con una línea celular con cromosoma Y (Pereira et al, 1991; McElreavy et al, 1993; Spurdle et al, 1995; Ramos et al, 1996; Torres et al, 1996).

Por otro lado, se han descrito algunas mutaciones de *SRY* en hermafroditas verdaderos. Braun et al (1993) informaron de un hermafrodita verdadero 46,XY con una mutación de sentido equivocado en la caja HMG de *SRY*, que estaba presente en el DNA extraído de gónada y no en el obtenido de leucocitos. Posteriormente en otro caso de hermafroditismo verdadero 46,XY se identificó una mutación puntual en el codón 60 que conduce al cambio de valina por alanina (Hiort et al, 1995).

La mayoría de los hermafroditas verdaderos 46,XX ocurren en forma esporádica, aun cuando existen formas familiares (Fraccaro et al, 1979). Los casos familiares muestran una frecuencia mayor en subgrupos étnicos particulares, especialmente en los negros de Sudáfrica que hablan bantú, sugiriendo que este padecimiento posea una causa y una patogénesis común en los habitantes de esta región (Ramsay et al, 1988). El análisis de secuencias específicas del cromosoma Y, incluyendo *SRY*, en 16 hermafroditas verdaderos 46,XX de esta población mostró que eran Y-negativos excluyendo que la presencia de material derivado del Y estuviera implicado en la etiología de la enfermedad (Spurdle et al, 1995).

El manejo clínico del hermafroditismo verdadero depende de la edad del diagnóstico y del resultado del análisis de la capacidad funcional de las gónadas, los ductos genitales y los genitales externos presentes. En general, el sexo de

## 2.0 OBJETIVOS

Detectar la presencia de secuencias del cromosoma Y en diferentes patologías de la diferenciación sexual: 75 pacientes con síndrome de Turner, 8 con disgenesia gonadal pura XY, 10 varones XX esporádicos, 2 hermanos varones XX y 10 hermafroditas verdaderos.

En los casos positivos, analizar la secuencia del gen *SRY* para determinar si la presencia de mutaciones está relacionada con la etiología del padecimiento y con el fenotipo.

Correlacionar los datos moleculares obtenidos con la etiología del padecimiento y las características fenotípicas de estos pacientes

## 3.0 MATERIALES Y METODOS

### 3.1 PACIENTES

Para reconocer la presencia de secuencias del cromosoma Y en diferentes anomalías de la diferenciación sexual se estudiaron 75 pacientes con síndrome de Turner, 8 sujetos con disgenesia gonadal pura 46,XY, 10 casos esporádicos de varones XX, 2 hermanos varones XX y 10 casos de hermafroditas verdaderos. En todos los individuos *SRY* positivos se analizó la secuencia de este gen.

### 3.2 ESTUDIOS CITOGENETICOS

Se realizó cariotipo en linfocitos de sangre periférica en todos los pacientes estudiados. Se analizaron 100 metafases con técnica habitual y 20 con bandas GTG y CBG en cada caso.

### 3.3 ESTUDIOS MOLECULARES

#### 3.3.1 Aislamiento de DNA genómico de sangre periférica

Se llevó a cabo mediante una técnica modificada de dos métodos previamente descritos (Buffone y Darlington, 1995; Kempter y Grossbadern, 1992). Se extrajeron asépticamente 3 ml de sangre periférica en un tubo Vacutainer con EDTA como anticoagulante. Se colocó la sangre en un tubo cónico de 15 ml, se agregó un volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10mM pH 7.6, Tritón 1% v/v, Sacarosa 300 mM) y se invirtió el tubo varias veces. Se centrifugó a 3000 rpm durante 6 min y se decantó el sobrenadante. Se agregó al botón 1ml de amortiguador TTS, se agitó y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml. Se agitó hasta homogenizar y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2min. Se decantó el sobrenadante, se agregó al botón 1ml de amortiguador TTS, se agitó y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min. Se repitió el paso anterior 2-3 veces. Se

agregó al botón limpio 570  $\mu$ l de NaCl 5mM, se agitó durante 2 min, se agregó 30  $\mu$ l de SDS 10% y se agitó durante 5 min. Se adicionó 200  $\mu$ l de NaCl saturado y se agitó durante 10 min. Se centrifugó a 11,500 rpm durante 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante a un tubo de ensaye de 13x100 mm estéril. Se añadió 2 ml de etanol absoluto a -20°C para precipitar el DNA. Se tomó el DNA mediante una varilla de vidrio, se enjuagó con etanol al 70% y se dejó secar al aire. El DNA se resuspendió en 350  $\mu$ l de agua estéril en un microtubo a baño María a 60°C durante 2 h. Se conservó a -20°C, manteniendo una alícuota de 100  $\mu$ l a 4°C.

### 3.3.2 Extracción de DNA genómico de tejido embebido en parafina

Se realizó mediante una técnica previamente descrita (Banerjee et al, 1995). Se cortaron 2 tiras de 15 mm de espesor del tejido embebido en parafina y se colocaron en un microtubo de 1.5 ml estéril. Se agregó 200  $\mu$ l de amortiguador de digestión (Tris 50 mM pH 8.5, EDTA 1mM, Tween 5% v/v, H<sub>2</sub>O cbp) y se homogenizó mediante la acción de una micropipeta. El tubo cerrado se introdujo en horno de microondas y se irradió a máxima potencia 3-5 pulsos de 15 seg. Se centrifugó a 12,000 rpm/10min a temperatura ambiente. Se retiró el anillo de parafina formado con la ayuda de una punta estéril de micropipeta. El botón de tejido libre de parafina se homogenizó mediante inversión suave en el amortiguador de digestión restante. Se añadió proteinasa K a una concentración final de 20 mg/ml y se dejó actuar 3 h a 55°C, o bien toda la noche a 42°C. Después de la digestión, el tubo se centrifugó a 6,000 rpm/5min a temperatura ambiente. El sobrenadante conteniendo el lisado de DNA se transfirió a otro tubo estéril y se hirvió durante 10 min para desnaturalizar la proteasa residual y las proteínas contaminantes. Se enfrió a temperatura ambiente o en hielo.

### 3.3.3 Procesamiento de las muestras de DNA genómico

Todas las muestras de DNA obtenidas se procesaron de la siguiente manera:

(1) Se asignó una clave de identificación por padecimiento (T: síndrome de Turner; D: disgenesia gonadal pura XY; V: varón XX; H: hermafrodita verdadero) seguida por un número progresivo y del año en curso. En cuanto a los controles, los masculinos tuvieron la clave CM y los femeninos la CF.

(2) La calidad y concentración del DNA extraído en cada muestra se determinó mediante análisis espectrofotométrico y electroforesis en gel de agarosa:

(a) El análisis espectrofotométrico se realizó mediante lecturas a 260 y 280 nm. Se calculó la concentración de la muestra de DNA mediante la fórmula  $1 \text{ D.O.}_{260} = 50 \text{ mg/ml}$  de DNA. Una relación 260/280 cercana a 1.8 se consideró óptima.

(b) Se analizaron alícuotas de 1-2  $\mu\text{g}$  de DNA genómico mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M) teñido con bromuro de etidio 0.0002% (Sambrook et al, 1989).

### 3.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Reacción de PCR:

dNTPs (1mM cada uno)	4 $\mu\text{l}$ (20 mM cada uno)
oligonucleótidos (10 mM)	1 $\mu\text{l}$ de cada uno (0.2 ml cada uno)
Amortiguador 10X ( $\text{MgCl}_2$ 1.5mM)	5 $\mu\text{l}$ (1X)
Taq polimerasa (5U/ml)	0.2 $\mu\text{l}$ (1U/ml)
DNA (50-100 ng/ml)	1-2 $\mu\text{l}$ (100 ng)
H <sub>2</sub> O cbp	50 $\mu\text{l}$

Los oligonucleótidos empleados fueron los siguientes:

(a) El par Y1 y Y2 flanquea un fragmento de 170 pb de secuencias alfoides repetidas de la región centromérica del cromosoma Y humano (Witt y Erickson, 1989; 1991).

Y1: 5'- ATG ATA GAA ACG GAA ATA TG -3'  $T_m = 52^\circ\text{C}$

Y2: 5'- AGT AGA ATG CAA AGG GCT CC -3  $T_m = 60^\circ\text{C}$

Desnaturalización 95°C/3min; 30 ciclos de 95°C/1min, 58°C/2min y 72°C/3 min; extensión 72°C/10 min.

(b) El par X1 y X2 define un fragmento de 130 pb de secuencias alfoides repetidas de la región centromérica del cromosoma X humano (Witt y Erickson, 1989)

X1: 5'- AAT CAT CAA ATG GAG ATT TG -3' T<sub>m</sub> = 52°C

X2: 5'- GTT CAG CTC TGT GAG TGA AA -3' T<sub>m</sub> = 58°C

Desnaturalización 95°C/3min; 30 ciclos de 94°C/1min, 63°C/2min y 72°C/3 min; extensión 72°C/10 min.

(c) Para el gen ZFY se utilizó el par ZFY-1 y ZFY-2 que flanquea una región de 400pb (Schneider-Gädicke et al, 1989)

ZFY-1: 5'-GAA TTC ATG AGG AGA CCA GAA G -3' T<sub>m</sub> = 64°C

ZFY-2: 5'- CAC AAA ACT TAC ACT TAT GCA T -3' T<sub>m</sub> = 58°C

Desnaturalización 94°C/3min; 35 ciclos de 94°C/1'30min, 60°C/1'30min y 72°C/1'30 min; extensión 72°C/7min.

(d) El par Y1.1 y Y1.2 define un fragmento de 154 pb de una secuencia repetida de 3.4kb de la región heterocromática del brazo largo del cromosoma Y humano (Kogan y Gitschier, 1990)

Y1.1: 5'-ATG ATA GAA CGC AAA TAT G -3' T<sub>m</sub> = 50°C

Y1.2: 5'-AGT AGA ATG CAA AGG GCT CC -3' T<sub>m</sub> = 60°C

Desnaturalización 95°C/5min; 35 ciclos de 94°C/1min, 57°C/1'30min y 72°C/2'30 min; extensión 72°C/7min.

(e) El par PABY-1 y PABY-2 flanquea una región de 250 pb del límite pseudoautosómico del cromosoma Y (Jäger et al, 1990)

PABY-1: 5'- TGG GCA CTT ACA CAT AGA CGT-3' T<sub>m</sub> = 62°C

PABY-2: 5'- CTT CTC TTT GAA GTG TAA GGA G-3' T<sub>m</sub> = 58°C

Desnaturalización 95°C/3min; 30 ciclos de 94°C/1min, 56°C/2min y 72°C/3 min; extensión 72°C/2 min.

(f) La amplificación del gen SRY se realizó utilizando varios pares de oligonucleótidos (Fig 3.1).

- El par SRY1 y SRY2 amplifica una región de 609 pb ( Bailey et al,1992)

SRY1: 5'- CGA CAA TGC AAT CAT ATG C-3' Tm = 64°C

SRY2: 5'- TAG CGG TCC CGT TGC TGC -3' Tm = 60°C

Desnaturalización 95°C/3min; 33 ciclos de 95°C/1min, 56°C/2min y 72°C/3 min; extensión 72°C/2 min.

-El par AP-1 y AP-2 amplifica una región de 421 pb

AP-1: 5'-GAA TAT TCC CGC TCT CCG G-3' Tm= 62°C

AP-2: 5'- ACA ACC TGT TGT CCA GTT GC-3' Tm= 60°C

Desnaturalización 95°C/3min; 33 ciclos de 94°C/1min, 58°C/1'30min y 72°C/1'30 min; extensión 72°C/5 min.

-El par XES7 y SRY3 amplifica un fragmento de 407pb, el par XES10 y SRY3 amplifica un fragmento de 529 pb,el par SRY6 y XES11 amplifica un fragmento de 432 pb,el par XES7 y XES2 amplifica un fragmento de 609pb y el par SRY6 y SRY3 amplifica un fragmento de 200pb.

(Affara et al, 1993)

XES2: 5'-CTG TAG CGG TCC CGT TGC TGC GGT G-3' Tm= 73°C

XES7: 5'-CCC GAA TTC GAC AAT GCA ATC ATA TGC TTC TGC -3' Tm= 68°C

XES10: 5'-GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG C -3' Tm = 70°C

XES11: 5'-GTA GCC AAT GTT ACC CGA TTG TC-3' Tm = 68°C

SRY3: 5'-CTT CCG ACG AGG TCG ATA C-3' Tm = 60°C

SRY6: 5'-GTG GTC TCG CGA TCA GA-3' Tm = 54°C

Desnaturalización 94°C/5min; 30 ciclos de 94°C/1min, 68°C/1min y 72°C/2 min; extensión 72°C/7 min.



### 3.3.5 Análisis electroforético de los productos de PCR

Los productos de cada reacción de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M pH 8.0), teñido con bromuro de etidio 0.0002%, incluyéndose un carril con un marcador de peso molecular (escalera de 100pb, GIBCO BRL)

### 3.3.6 Elución de productos de PCR a partir de geles de agarosa

Este método se realizó utilizando un estuche comercial (QUIAEX II, QUIAGEN) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El protocolo está diseñado para la extracción de fragmentos de DNA de 40 pb a 50 kb a partir de geles de agarosa de 0.3-2.0% (agarosa estándar o de bajo punto de fusión) en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M pH 8.0) o TBE (Tris-borato 0.045M, EDTA 0.001M pH 8.0).

El fragmento de DNA se cortó del gel de agarosa con un bisturí limpio, eliminando lo más posible de agarosa, y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml estéril. Se pesó y se le adicionó 3 volúmenes de amortiguador QX1 (ej. 300  $\mu$ l de amortiguador para 100 mg de agarosa). Enseguida se agregó 3-5  $\mu$ l de la solución QIAEXII (suspensión recién preparada) por cada microgramo de DNA. La reacción se incubó a 50°C durante 10 min para solubilizar la agarosa y permitir el enlace del DNA a las perlas de sílica de la solución QXII. Se mezcló mediante vórtex para mantener el QUIAEX II en solución. Se centrifugó a 13,000 rpm/1 min y se desechó el sobrenadante mediante una micropipeta. Se lavó el precipitado con 500  $\mu$ l de amortiguador QXI, se resuspendió en vórtex y se centrifugó nuevamente. Se eliminó todo el sobrenadante con una micropipeta (en este paso se retiran los residuos de agarosa contaminante). Posteriormente, se lavó el precipitado con amortiguador PE 2 veces (estos lavados eliminan residuos de sales). El botón se secó al aire durante 10-15 min o hasta que el precipitado se vió blanco. Finalmente, para eluir el DNA se adicionó 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril y se incubó

a temperatura ambiente por 5 min. Pasado este tiempo, se centrifugó durante 1min y se colectó el sobrenadante (que ahora contiene al DNA) a un microtubo estéril. El DNA purificado se almacenó a -20°C.

### 3.3.7 Cuantificación de DNA mediante fluorometría

La cantidad de templado de DNA utilizada en la reacción de secuenciación puede afectar la calidad de los resultados, por ello para la secuenciación de DNA los productos de PCR purificados del gel de agarosa se cuantificaron mediante fluorometría. Se usó el fluorómetro DyNA Quant 200, (Hoefer) que tiene una longitud de onda fija de 365 nm de excitación y 460 nm de emisión. Estas características de espectro están diseñadas para la detección de DNA de doble cadena mediante su enlace al colorante fluorescente Hoechst 33258. Este ensayo es un método preciso para determinar la concentración de DNA en presencia de proteína, RNA y nucleótidos que son contaminantes que interfieren con la determinación convencional por absorbancia en luz ultravioleta. Para ello, se preparó un estándar de DNA de concentración conocida (100 ng/ml) en amortiguador TEN (Tris 10 mM pH8.0, EDTA 1mM pH 7.4, NaCl 0.1 M) y se le agregó del colorante fluorescente Hoechst 33258 (1mg/ml). El equipo se calibró introduciendo una celda con el estándar de DNA. Se tomaron 2 $\mu$ l de cada muestra de DNA de concentración desconocida y se mezclaron con 2 $\mu$ l del colorante en TEN. Se realizaron 3 lecturas por cada muestra, las cuales se promediaron para calcular la concentración de DNA en cada muestra.

### 3.3.8 Purificación de productos de PCR por columnas de filtración en gel (*Spin Columns*)

La columna (Centrisep) se colocó sobre su base y se le retiró la tapa. Se reconstituyó el gel (sefaroza G-50 de grano medio) en 800  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril, se tapó la columna y se invirtió varias veces, evitando la formación de burbujas. Se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente antes de usarse. Una vez que el gel

ha sedimentado, se destapó la columna, se retiró de su base y se colocó sobre un microtubo para drenar el exceso de líquido. La columna se centrifugó a 3000 rpm durante 3-4min para eliminar el fluido intersticial. Se colocó en un microtubo colector estéril y etiquetado. Se aplicó 20  $\mu$ l del producto de PCR sobre la sefarosa de la columna, sin tocar las paredes o dañar el gel. Finalmente se centrifugó la columna con el tubo colector a 3000 rpm durante 6min. Se guardó la muestra purificada en el tubo colector y se desechó la columna utilizada.

### 3.3.9 Secuenciación de DNA

La reacción de secuenciación se llevó a cabo empleando un paquete comercial (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer) y siguiendo las instrucciones del proveedor para el analizador genético ABI PRISM 377.

En un microtubo de 200  $\mu$ l estéril se mezclaron los siguientes reactivos:

Amortiguador (Tris-HCl pH 9.0, MgCl <sub>2</sub> y pirofosfatasa termoestable)	4.0 $\mu$ l
Mezcla de DNTP's (incluye DITP en lugar de DGTP)	0.9 $\mu$ l
Terminadores de reacción marcados con colorantes diferentes (A, G, C, T)	0.4 $\mu$ l c/u
DNA polimerasa	0.8 $\mu$ l
Templado de DNA (producto de PCR, 30 ng/ml)	3-6 $\mu$ l
Oligonucleótido	3.2 pmolas
H <sub>2</sub> O estéril cbp	20 $\mu$ l

La mezcla de reacción se colocó en el termociclador y se procedió a la amplificación de la secuencia como sigue: 25 ciclos a 96°C/10 seg, 50°C/ 5 seg y

60°C/4 min. Al final se enfrió a 4°C. Se procedió a la purificación del producto amplificado mediante columnas de filtración en gel (*Spin Columns*). La muestra purificada se secó al vacío, sin aplicar calor. Se resuspendió en 1.5 µl de amortiguador de carga (formamida desionizada en una proporción 5:1 con EDTA 10mM pH 8.0/azul de dextrán 5 mg/ml). Se mezcló en vórtex y se centrifugó brevemente. La muestra se desnaturalizó mediante calentamiento a 95°C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo hasta el momento de aplicarla en el gel de secuenciación.

## 4.0 RESULTADOS

En este trabajo se realizó un análisis molecular en el DNA genómico de 105 pacientes con diferentes anomalías de la diferenciación sexual (síndrome de Turner, disgenesia gonadal pura 46,XY, síndrome de varón XX y hermafroditismo verdadero) para reconocer cuáles regiones del cromosoma Y estaban presentes, para detectar la presencia de mutaciones en el gen *SRY* y para correlacionar estos datos con la etiología del padecimiento y el fenotipo de estos individuos.

A continuación se expondrán los datos clínicos y citogenéticos y la detección de secuencias del cromosoma Y en los pacientes estudiados. Posteriormente se mostrarán los resultados del análisis de la secuencia del gen *SRY* en los casos positivos.

### (a) Pacientes con síndrome de Turner

Se estudiaron 75 pacientes con síndrome de Turner de población mestiza mexicana. El motivo de la consulta fue linfedema en manos y pies en las recién nacidas, talla baja en las niñas y amenorrea primaria en las adolescentes y adultas. Los resultados citogenéticos mostraron que 61 pacientes tenían un cariotipo 45,X y que 14 pacientes eran mosaicos: 4 casos 45,X/46,XX; 4 casos 45,X/46,X,+mar; 4 casos 45,X/46,X,i (Xq); un caso 45,X/46,X,del(Xp) y un caso 45,X/46,XY.

El análisis molecular mediante PCR del DNA genómico aislado de sangre periférica en estas pacientes demostró la presencia de diferentes secuencias de material derivado del cromosoma Y sólo en 6 pacientes : 4 casos 45,X, 1 caso 45,X/46,X,+mar y el caso 45,X/46,XY. Estos datos resultan en una frecuencia de 8% de pacientes con fenotipo Turner positivas para material genético del cromosoma Y.

La paciente 45,X/46,X,+mar sólo fue positiva para la región centromérica y para la región heterocromática del brazo largo del cromosoma Y. La paciente 45,X/46,XY y tres casos 45,X fueron positivas para todas las secuencias del cromosoma Y analizadas (Ycen, ZFY, *SRY*, PABY y Yqh), mientras que la paciente 45,X restante

sólo fue positiva para la región centromérica del cromosoma Y.

Las características clínicas de las 3 pacientes con fenotipo Turner y cariotipo 45,X positivas para *SRY* (T1, T2 y T3) se muestran en la tabla 4.1. La fig 4.1 muestra las bandas específicas de las secuencias del cromosoma Y amplificadas en el DNA genómico de estas pacientes. Estos hallazgos moleculares se resumen en la tabla 4.2.

#### (b) Pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY

Las características clínicas y citogenéticas de las 8 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY estudiadas se muestran en la tabla 4.3. En tres casos (D2, D4 y D8) se presentó la forma completa del padecimiento (estrías fibrosas y derivados Mullerianos) y en cinco casos (D1, D3, D5, D6, D7) la forma parcial con testículos disgenéticos y diferentes grados de virilización. Todas las pacientes presentaron hipogonadismo hipergonadotrófico.

La fig. 4.2 muestra la amplificación de las secuencias del cromosoma Y presentes en las 8 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY estudiadas y en la tabla 4.4 se resumen estos hallazgos moleculares. Todas fueron positivas para las secuencias del cromosoma Y analizadas.

#### (c) Varones XX

La tabla 4.5 muestra las características clínicas y citogenéticas de 10 casos esporádicos de varones XX. La edad varió entre 3 meses y 35 años, el motivo de la consulta fue ambigüedad genital en 7 casos y ausencia de desarrollo sexual secundario en los 3 restantes. La fig 4.3 muestra el análisis electroforético de los productos de PCR para diferentes secuencias del cromosoma Y. En la tabla 4.6 se resumen estos datos. Todos los sujetos (V1-V10) fueron negativos para la región centromérica del cromosoma Y, por lo que se puede descartar mosaicismo críptico con una línea celular con este cromosoma. Sólo 4 casos (V2, V3, V4 y V7) fueron positivos para *PABY*, *ZFY* y *SRY*, mientras que el resto fue negativo para estas secuencias.

Se estudiaron dos hermanos varones XX en una familia mexicana no consanguínea. El árbol genealógico correspondiente se muestra en la fig. 4.4 (a). Los padres, dos hermanos y una hermana fueron clínicamente normales.

En la tabla 4.7 se presentan las características clínicas de los dos hermanos varones XX, ambos presentaron un fenotipo masculino normal y uno de ellos ginecomastia leve, lo que fue la causa de consulta. Los cromosomas sexuales fueron XX en ambos, sin embargo el propósito presentó un cromosoma marcador(46,XX/47,XX+mar) en menos de 1% de las metafases (fig 4.4 b).

El análisis por PCR mostró que ambos pacientes eran negativos para Ycen, SRY, ZFY y Yqh (fig 4.4 c) descartando un mosaico críptico y que el cromosoma marcador observado en el caso índice fuera derivado del cromosoma Y. En la tabla 4.8 se resumen los hallazgos moleculares de los dos hermanos varones XX.

#### (d) Hermafroditas verdaderos

Las características clínicas de los 10 hermafroditas estudiados se resumen en la tabla 4.9 Todos mostraron un grado variable de ambigüedad genital y presentaron tanto tejido ovárico como testicular. El cariotipo fue 46,XX en 6 casos, 46,XX/XY en 3 casos y 46,XX/47,XXY en un caso. En la fig 4.5 se observan los productos de PCR amplificados mediante secuencias específicas del cromosoma Y. La tabla 4.10 resume los hallazgos moleculares en los 10 hermafroditas verdaderos estudiados. Los 6 casos con cariotipo 46,XX (H1-H6) fueron negativos para la región centromérica del cromosoma Y, lo que descarta un mosaicismo críptico. Sólo el paciente H1 fue positivo para ZFY y SRY, sugiriendo que este material cromosómico esté translocado en el cromosoma X paterno. Todos los casos con constitución cromosómica que incluye al cromosoma Y (H7-H10) fueron positivos para todas las secuencias del cromosoma Y analizadas.

#### (e) Secuenciación del gen *SRY*

En los casos positivos de las patologías estudiadas, se analizó la secuencia del gen *SRY* en DNA genómico extraído de sangre periférica para determinar la presencia de mutaciones. Cuando fue posible, también se analizó en el DNA

genómico obtenido de gónadas incluídas en parafina. Todas las muestras se secuenciaron en dos ocasiones, en ambas direcciones (5' y 3') y en productos de PCR independientes. La secuencia del gen *SRY* analizada siempre incluyó la caja HMG.

En los tres casos con síndrome de Turner y cariotipo 45,X (T1, T2 y T3) la secuencia del gen *SRY* fue normal (tabla 4. 11).

El análisis de la secuencia del gen *SRY* en las 8 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY fue normal en todas, a excepción del caso D8 (tabla 4.11) Esta paciente mostró una mutación puntual en el codón 70, desde el inicio del exón, que corresponde a una transición de G→A y que resulta en el cambio de un codón de triptofano (TGG) por uno de terminación (TGA). La mutación fue encontrada en DNA genómico aislado de sangre periférica y confirmada en el obtenido de ambas estrías fibrosas. Estos resultados se muestran en la fig 4.6 (dirección 5') y en la fig 4.7 (dirección 3').

En los 4 casos esporádicos de varones XX positivos para *SRY* (V2, V3, V4 y V7), el análisis molecular de este gene mostró una secuencia de DNA normal (tabla 4.11).

En el hermafrodita verdadero con cariotipo 46,XX (H1) y en los 4 casos de hermafroditas verdaderos con una segunda línea celular con cromosoma Y, positivos para *SRY*, (H7, H8, H9 y H10), el análisis molecular mostró una secuencia normal (tabla 4.11).

En todos los pacientes se amplificó en forma paralela y como control positivo la región centromérica del cromosoma X mediante PCR. La presencia de una banda de 130 pb demostró que la ausencia de secuencias específicas del cromosoma Y no es debida a problemas metodológicos (resultados sólo mostrados en la fig 4.4c para el caso familiar de varones XX).

Tabla 4.1. Características clínicas en 3 pacientes con síndrome de Turner

PACIENTE	EDAD (años)	ESTATURA (m)	CARIOTIPO	Anomalías somáticas
T1	16	1.37	45,X	Cuello corto y ancho, tórax ancho, teletelia, pezones invertidos, ausencia de desarrollo mamario, <i>cubitus valgus</i> , 4º metacarpiano corto, hipertrofia de clítoris, múltiples nevos.
T2	18	1.43	45,X	Implantación baja de cabello, <i>cubitus valgus</i> , desarrollo mamario Tanner III.
T3	13	1.29	45,X	Cuello corto, tórax ancho, desarrollo mamario Tanner III, 4º metacarpiano corto, hipertrofia de clítoris, múltiples nevos.

Tabla 4.2. Hallazgos moleculares en 3 pacientes con síndrome de Turner

PACIENTE	Ycen	ZFY	SRY	PABY	Yqh
T1	+	+	+	+	+
T2	+	+	+	+	+
T3	+	+	+	+	+

**Tabla 4.3 Características clínicas de 8 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY**

PACIENTE	EDAD (años)	Genitales int.	Genitales ext.	Gónada der.	Gónada izq.
D1	18	No derivados mullerianos	Femeninos	Testículo prepuberal	Testículo prepuberal
D2	20	Utero hipoplásico	Femeninos	Estría	Estría
D3	24	Utero con trompas hipoplásicas y epidídimos bilaterales	Clitoromegalia (3 cm)	Testículo atrófico	Testículo atrófico con gonadoblastoma
D4	35	Utero hipoplásico con trompas bilaterales	Femeninos	Estría	Estría
D5	19	Epidídimo y conducto deferente izq.	Falo = 3.5 cm Hipospadia perineal con pseudovagina	Testículo prepuberal	Testículo prepuberal
D6	13	Trompas y epidídimos bilaterales	Clitoromegalia (4.5cm) Hipospadia perineal con pseudovagina	Gonadoblastoma con seminoma	Gonadoblastoma con seminoma
D7	17	No derivados mullerianos y epidídimos bilaterales	Femeninos	Testículo prepuberal	Testículo prepuberal
D8	32	Utero hipoplásico	Femeninos	Estría	Estría

**Tabla 4.4 Hallazgos moleculares en 8 pacientes con disgenesia gonadal pura 46, XY**

PACIENTE	Ycen	PABY	ZFY	SRY
D1	(+)	(+)	(+)	(+)
D2	(+)	(+)	(+)	(+)
D3	(+)	(+)	(+)	(+)
D4	(+)	(+)	(+)	(+)
D5	(+)	(+)	(+)	(+)
D6	(+)	(+)	(+)	(+)
D7	(+)	(+)	(+)	(+)
DP-8	(+)	(+)	(+)	(+)

**Tabla 4.5 Características clínicas en 10 varones XX (esporádicos)**

PACIENTE	EDAD (años)	Sexo de Asignación	GENITALES EXTERNOS	Testículo derecho (vol. cc)	Testículo izquierdo (vol. cc)	Ginecomastia
V1	3/12	M	Falo 3.2 cm Hipospadias peneana	1.8	2.1	ND
V2	16	M	Falo 7.5 cm	3.3	4.1	SI
V3	35	M	Falo 9.2 cm	3.3	2.7	NO
V4	6/12	M	Falo 1.5 cm Hipospadias perineo-escrotal	1.1	1.1	ND
V5	9/12	M	Falo 3.2 cm Hipospadias penoescrotal	2.7	2.7	ND
V6	9/12	M	Falo 3.5 cm Hipospadias subcoronal	1.0	1.3	ND
V7	25	M	Falo 6.5 cm	9.0	9.0	NO
V8	6	M	Falo 4.5 cm Hipospadias penoescrotal	1.5	1.0	ND
V9	2	M	Falo 2.0 cm Hipospadias penoescrotal	2.6	2.6	ND
V10	1 4/12	M	Falo 1.6 cm Hipospadias penoescrotal	2.1	2.3	ND

ND: NO DETERMINADO

Tabla 4.6 Hallazgos moleculares en 10 varones XX (casos esporádicos)

PACIENTE	PCR			
	Ycen	ZFY	SRY	PABY
V1	(-)	(-)	(-)	(-)
V2	(-)	(+)	(+)	(+)
V3	(-)	(-)	(+)	(+)
V4	(-)	(+)	(+)	(+)
V5	(-)	(-)	(-)	(-)
V6	(-)	(-)	(-)	(-)
V7	(-)	(+)	(+)	(+)
V8	(-)	(-)	(-)	(-)
V9	(-)	(-)	(-)	(-)
V10	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabla 4.7 Características clínicas de dos varones XX (caso familiar)**

<b>PACIENTE</b>	<b>EDAD (años)</b>	<b>SEXO DE ASIGNACION</b>	<b>GENITALES EXTERNOS</b>	<b>TESTÍCULO DERECHO (vol.cc)</b>	<b>TESTICULO IZQUIERDO (vol. cc)</b>	<b>GINECOMASTIA</b>
II-2	28	M	Falo 6.0 cm	3.78	4.13	SI
II-4	26	M	Falo 7.0cm	3.30	4.12	NO

**Tabla 4.8 Hallazgos moleculares en dos varones XX (caso familiar)**

<b>PACIENTE</b>	<b>PCR</b>				
	<b>PABY</b>	<b>ZFY</b>	<b>SRY</b>	<b>Ycen</b>	<b>Yqh</b>
II-2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
II-4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Tabla 4.9 Características clínicas de 10 hermafroditas verdaderos**

Paciente	Sexo de Asignación	Edad (años)	Cariotipo (porcentaje)	Genitales externos	Gónada derecha	Gónada izquierda	Genitales internos derechos	Genitales internos izquierdos
H1	M	27	46,XX (100)	Falo= 5.8cm Labios escrotalizados	ovario	ovotestes	trompa, ducto wolffiano	trompa, ducto wolffiano
H2	M	10	46,XX (100)	Falo=3.1 cm Escroto bífido	testículo	ovotestes	epidídimo	trompa, epidídimo deferente
H3	F	10/12	46,XX (100)	Falo= 3.5 cm Labios escrotalizados	ovotestes	ovotestes	trompa, epidídimo	trompa epidídimo
H4	F	11/12	46,XX (100)	Se practicó cirugía genital antes del ingreso	ovotestes	ovotestes	trompa	trompa
H5	F	17	46,XX (100)	Falo= 3.0 cm Labios escrotalizados	ovario	testículo	trompa	epidídimo
H6	M	4	46,XX (100)	Falo=2.8 cm Escroto bífido	ovario	testículo	trompa	trompa
H7	M	2	46,XX/46,XY (70/25)	Falo= 2.8 cm Labios escrotalizados	ovario	ovotestes	trompa	trompa
H8	M	2	46,XX/46,XY (68/32)	Falo= 2.0 cm Labios escrotalizados	ovotestes	ovotestes	trompa, epidídimo	trompa, epidídimo
H9	F	1	46,XX/46,XY (23/77)	Falo= 3.0 cm Labios escrotalizados	ovotestes	ovotestes	trompa, epidídimo	trompa, epidídimo
H10	M	16	46,XX/47,XXY (72/28)	Falo=3.5 cm Escroto bífido	ovotestes	ovario	trompa	trompa

**Tabla 4.10 Hallazgos moleculares en 10 hermafroditas verdaderos**

PACIENTE	PCR			
	Ycen	ZFY	SRY	PABY
H1	(-)	(+)	(+)	(-)
H2	(-)	(-)	(-)	(-)
H3	(-)	(-)	(-)	(-)
H4	(-)	(-)	(-)	(-)
H5	(-)	(-)	(-)	(-)
H6	(-)	(-)	(-)	(-)
H7	(+)	(+)	(+)	(+)
H8	(+)	(+)	(+)	(+)
H9	(+)	(+)	(+)	(+)
H10	(+)	(+)	(+)	(+)

Tabla 4.11 Análisis de la secuencia del gen SRY

PACIENTE	MUESTRA	Extremo 5'	Caja HMG	Extremo 3'	Total pb analizadas	Resultado secuencia
T1	Sangre	1960-2246	2246-2486	2487-2684	724	normal
T2	Sangre	1975-2246	2246-2486	2487-2706	731	normal
T3	Sangre	2008-2246	2246-2486	2487-2634	626	normal
D1	Sangre	1973-2246	2246-2486	2487-2703	730	normal
D1	Gónada derecha	1980-2246	2246-2486	2487-2685	705	normal
D2	Sangre	1966-2245	2246-2486	2487-2715	749	normal
D3	Sangre	2015-2245	2246-2486	2487-2584	569	normal
D4	Sangre	1970-2245	2246-2486	2487-2690	720	normal
D5	Sangre	1992-2245	2246-2486	2487-2694	702	normal
D6	Sangre	1972-2245	2246-2486	2487-2705	733	normal
D6	Gónada izquierda	1981-2245	2246-2486	2487-2702	721	normal
D7	Sangre	2006-2245	2246-2486	2487-2700	694	normal
D8	Sangre	2142-2245	2246-2486	2487-2712	570	2285 G→A trp→ALTO
D8	Gónada izquierda	2150-2245	2246-2486	2487-2715	565	2285 G→A trp→ALTO
D8	Gónada izquierda	2132-2245	2246-2486	2487-2698	566	2285 G→A trp→ALTO
V2	Sangre	2062-2245	2246-2486	2487-2635	573	normal
V3	Sangre	2046-2245	2246-2486	2487-2702	656	normal
V4	Sangre	1975-2245	2246-2486	2487-2660	685	normal
V7	Sangre	1965-2245	2246-2486	2487-2576	611	normal
H1	Sangre	2042-2245	2246-2486	2487-2714	672	normal
H7	Sangre	1959-2245	2246-2486	2487-2640	681	normal
H8	Sangre	2055-2245	2246-2486	2487-2786	731	normal
H9	Sangre	1959-2245	2246-2486	2487-2706	747	normal
H9	Gónada izquierda	1981-2245	2246-2486	2487-2620	639	normal
H10	Sangre	1984-2245	2246-2486	2487-2637	653	normal

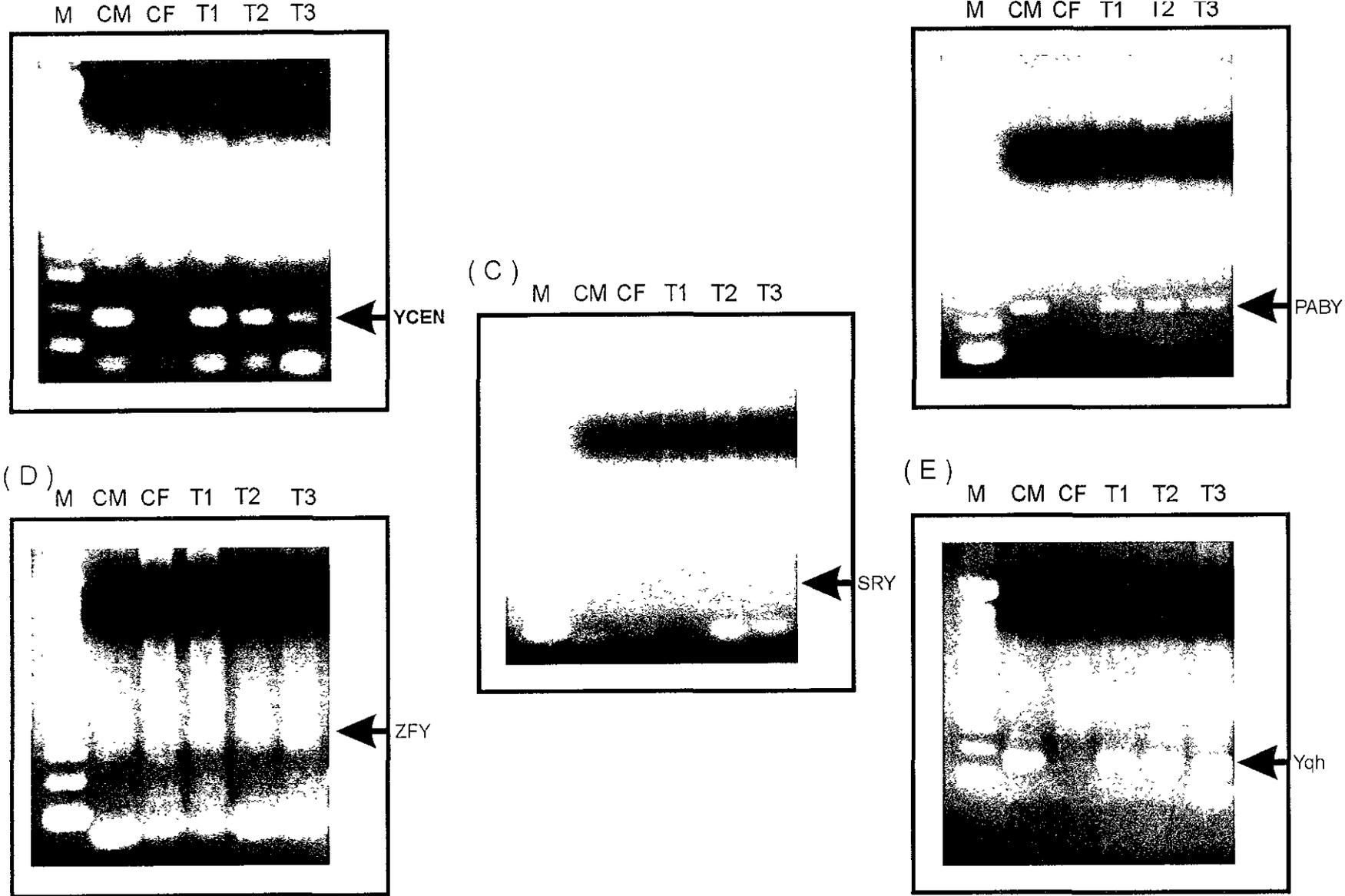
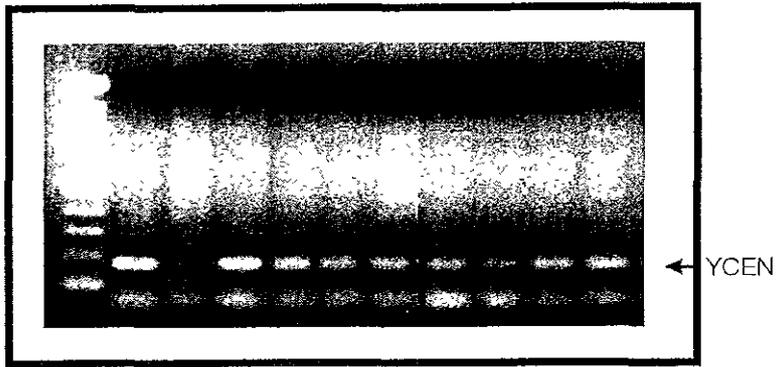
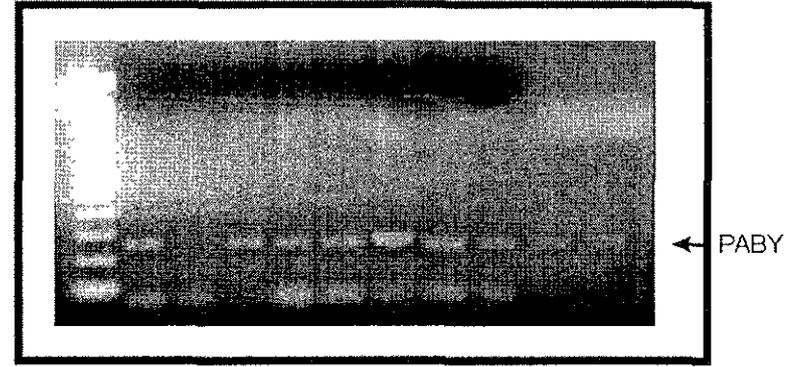


Fig.4.1 Análisis electroforético de los productos de PCR para (A) YCEN, (B) PABY, (C) SRY, (D) ZFY y (E) Yqh .M: marcador de peso molecular ( escalera 100 pb )  
 65 CM : control masculino ; CF : control femenino ; T1-T3 : pacientes con síndrome de Turner.  
 La flecha señala la banda específica en cada caso.

M CM CF D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8

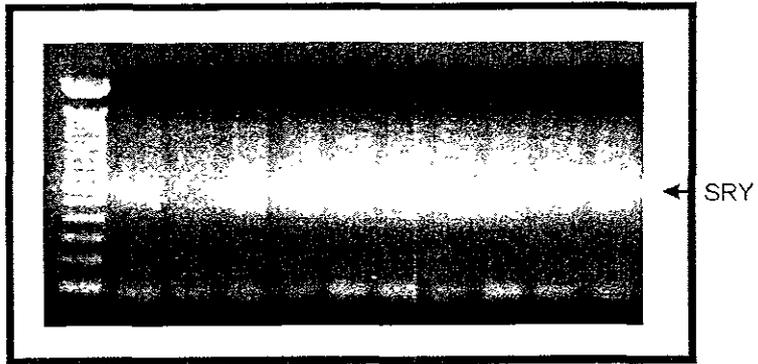


M CM CF D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8



(C)

M CM CF D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8



(D)

M CM CF D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8

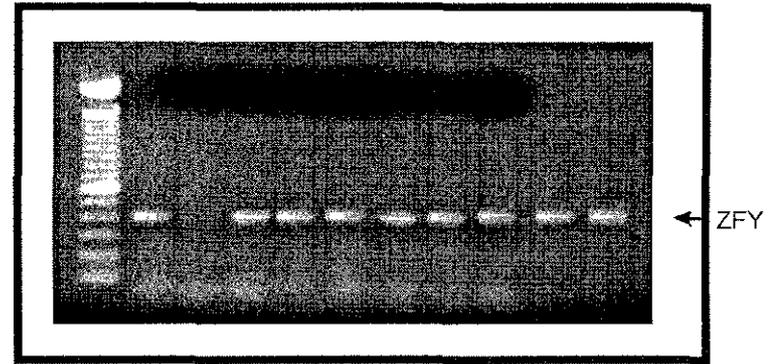
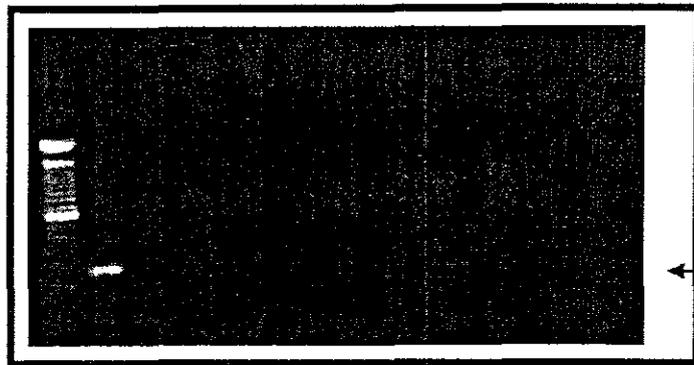


Fig.4.2 Análisis electroforético de los productos de PCR para (A) YCEN, (B) PABY; (C) SRY; y (D) ZFY  
M: marcador de peso molecular (escala 100 pb); CM: control masculino; CF: control femenino;  
D1 - D8: pacientes con disgenesia gonadal pura XY. La flecha señala la banda específica en cada caso.

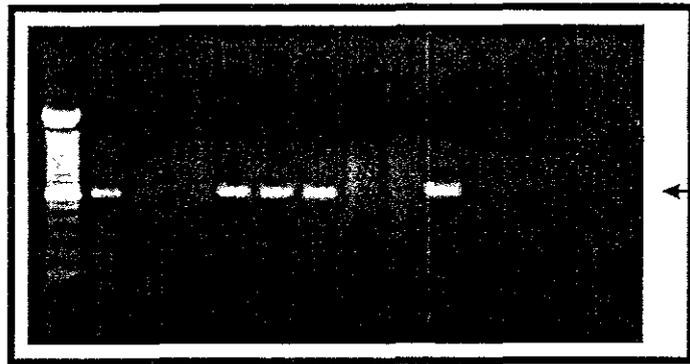
M CM CF V1 V2 V3 V4 V5 V6 V7 V8 V9 V10



← YCEN

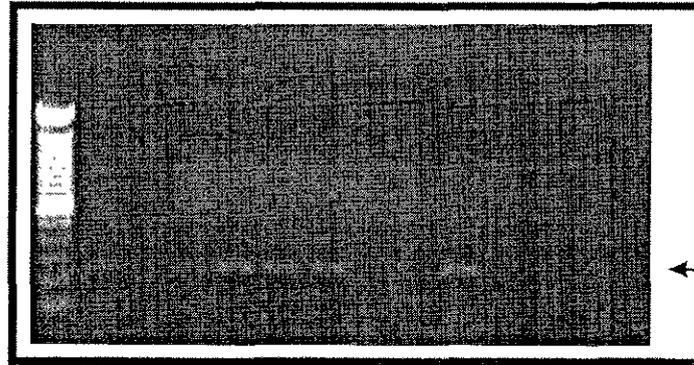
( C )

M CM CF V1 V2 V3 V4 V5 V6 V7 V8 V9 V10



← SRY

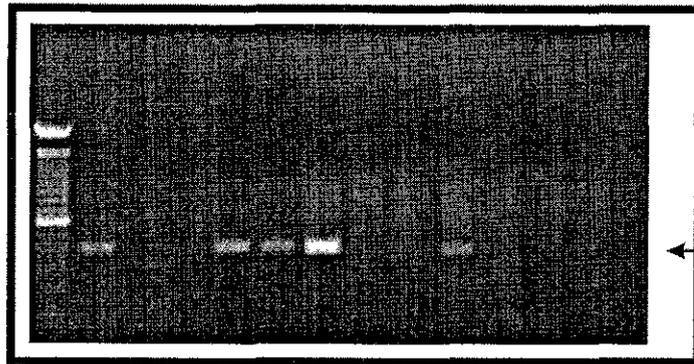
M CM CF V1 V2 V3 V4 V5 V6 V7 V8 V9 V10



← PABY

( D )

M CM CF V1 V2 V3 V4 V5 V6 V7 V8 V9 V10



← ZFY

Fig.4.3 Análisis electroforético de los productos de PCR para ( A ) YCEN, ( B ) PABY; ( C ) SRY; y ( D ) ZFY  
M: marcador de peso molecular ( escalera 100 pb ) ; CM : control masculino ; CF : control femenino ;  
V1 - V10 : varones XX. La flecha señala la banda específica en cada caso.

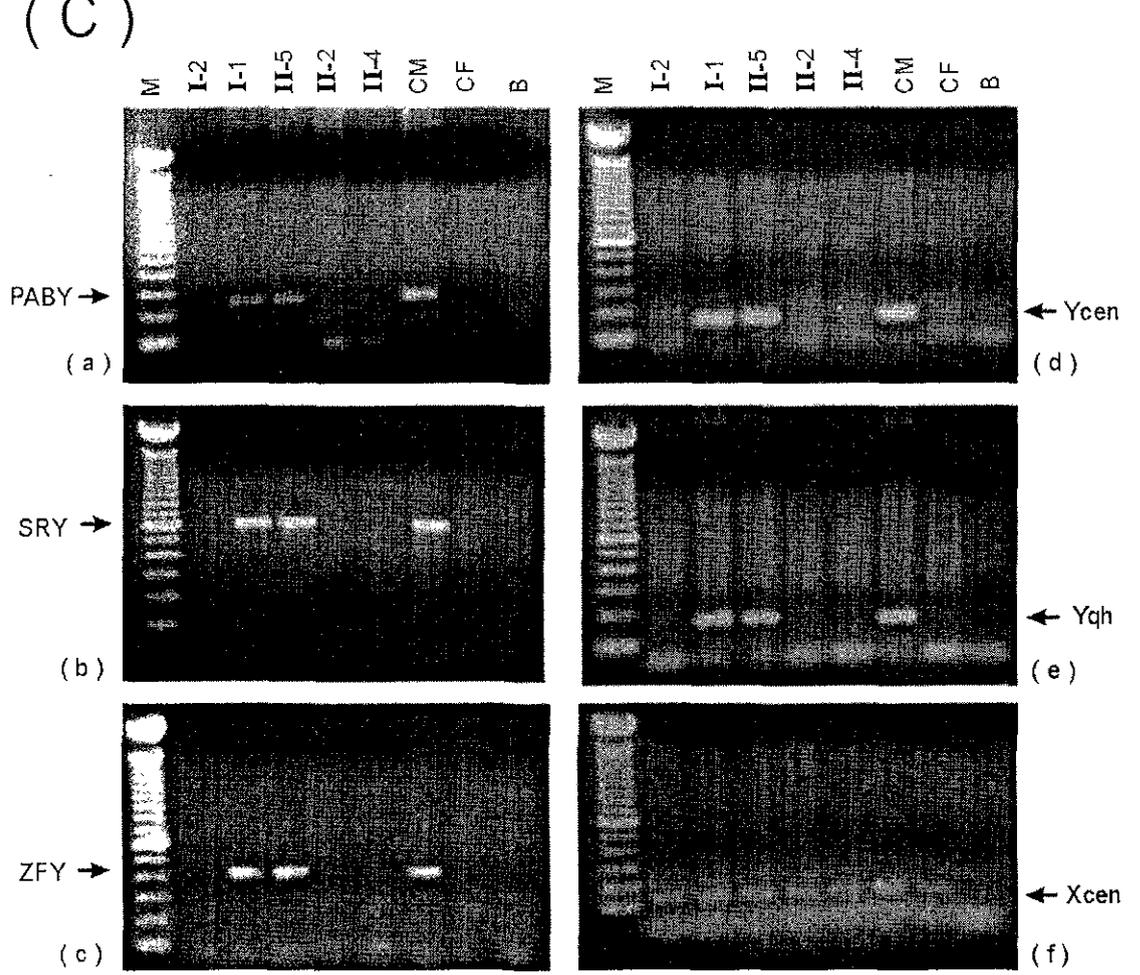
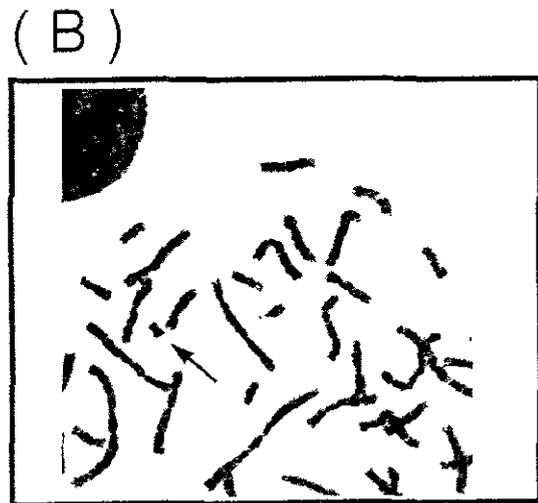
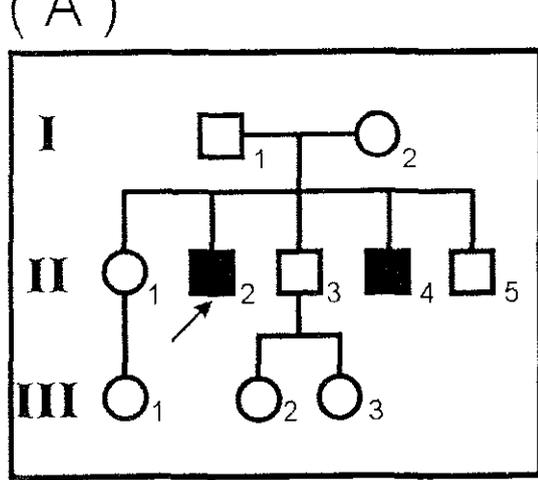
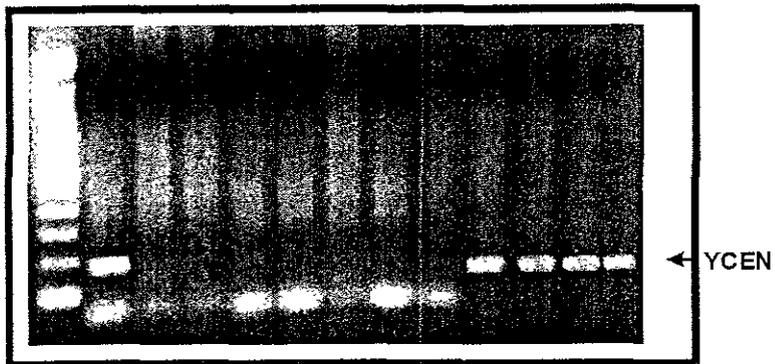


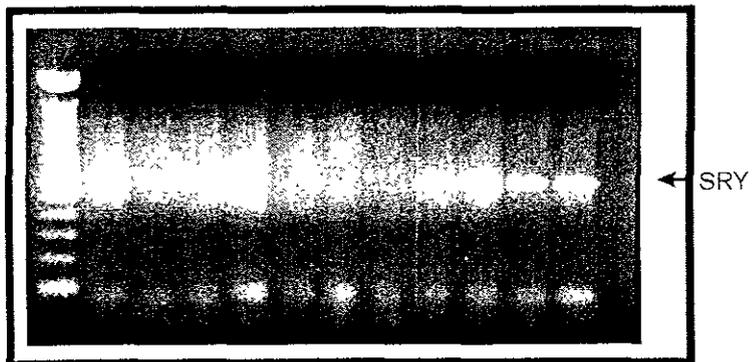
Fig 4.4 Caso familiar de varones XX. (A) Árbol genealógico. (B) Cromosoma marcador observado en el propósito (flecha) (C) Análisis electroforético de los productos de PCR para (a) PABY, (b) SRY, (c) ZFY, (d) Ycen, (e) Yqh y (f) Xcen. M: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb); CM: control masculino; CF: control femenino B: blanco. Los miembros de la familia se indican de acuerdo al árbol genealógico

M CM CF H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10

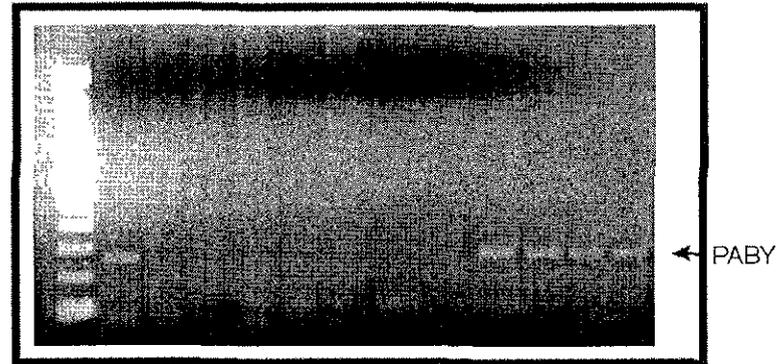


(C)

M CM CF H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10



M CM CF H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10



(D)

M CM CF H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10

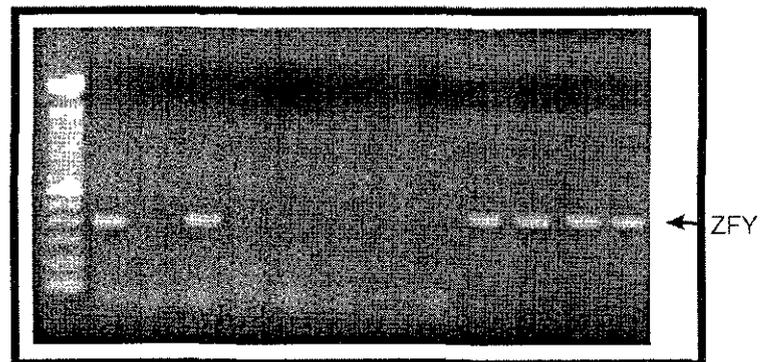
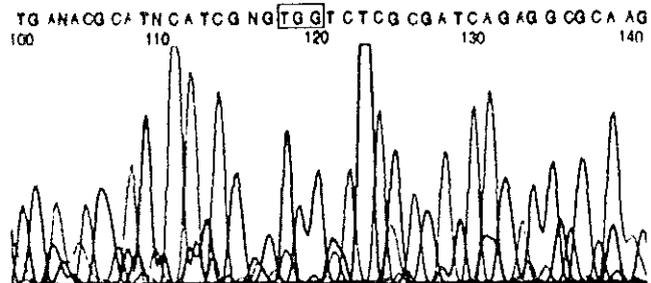
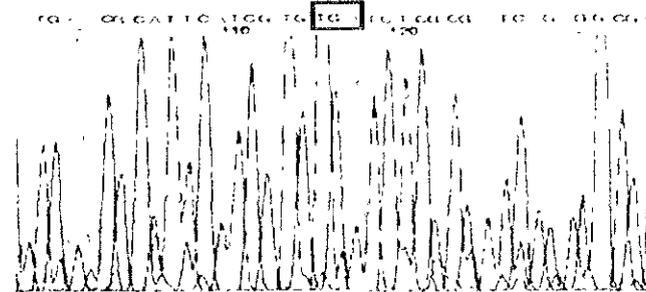


Fig.4.5 Análisis electroforético de los productos de PCR para (A) YCEN, (B) PABY; (C) SRY; y (D) ZFY  
M: marcador de peso molecular (escala 100 pb); CM: control masculino; CF: control femenino;  
H1 - H10: hermafroditas verdaderos. La flecha señala la banda específica en cada caso.

(A)

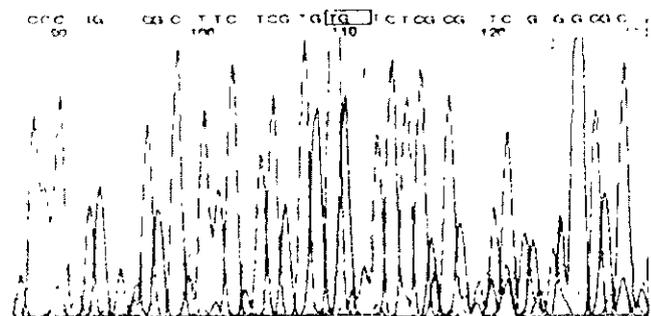


(C)



(B)

ALTO



(D)

ALTO

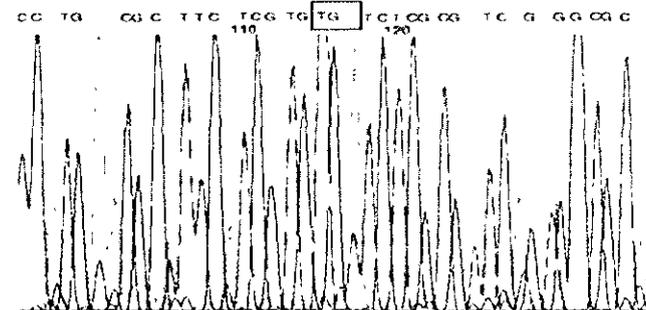
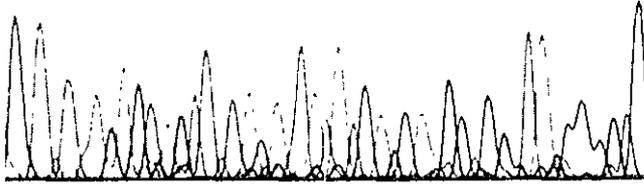
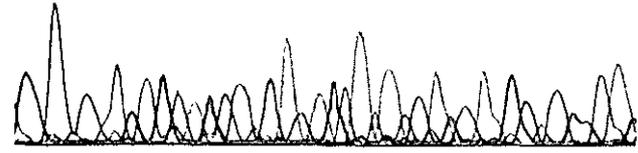


Fig.4.6. Secuencia automática parcial del gen SRY( dirección 5' ) en la paciente D8. ( A ) control masculino ( B ) DNA de sangre periférica; ( C ) DNA de gónada derecha; ( D ) DNA de gónada izquierda. Se indica la localización de la mutación puntual en el codón 70, que corresponde a una transición  $G \rightarrow A$  y que resulta en el cambio de un codón de triptofano (TGG) por uno de terminación (TGA). La mutación fue encontrada tanto en el DNA extraído de sangre periférica como en el obtenido de ambas estrias fibrosas.

TTGGCCTCTGATCGCGAGACCAAGATGANTGGCTHATGGGTTCG  
240 250 260 270 280



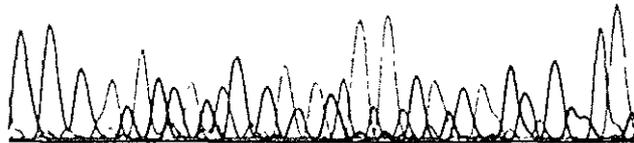
TTGGCCTCTGATCGCGAGATCAACAAGATGATGCGTTCAAT  
250 260 270 280



( B )

ALTO

TTGGCCTCTGATCGCGAGATCAACAAGATGATGCGTTCAAT  
240 250 260 270 280



( D )

ALTO

TTGGCCTCTGATCGCGAGATCAACAAGATGATGCGTTCAAT  
250 260 270 280



Fig.4.7 Secuencia automática parcial del gen SRY( dirección 3' ) en la paciente D8. ( A ) control masculino ( B ) DNA de sangre periférica; ( C ) DNA de gónada derecha; ( D ) DNA de gónada izquierda. Se indica la localización de la mutación puntual en el codón 70, que corresponde a una transición C → T y que resulta en el cambio de un codón de triptofano (CCA) por uno de terminación (TCA). La mutación fue encontrada tanto en el DNA extraído de sangre periférica como en el obtenido de ambas estrias fibrosas.

## 5.0 DISCUSION

En el ser humano, la determinación y la diferenciación sexual son procesos secuenciales que resultan de mecanismos complejos en los que intervienen un número aun no determinado de genes, localizados tanto en cromosomas sexuales como en autosomas (Schafer, 1995).

La *determinación sexual* se refiere a los eventos genéticos que resultan en el desarrollo gonadal masculino o femenino, mientras que la *diferenciación sexual* se aplica a todos los eventos morfogénéticos y fisiológicos subsecuentes que establecen la sexualidad funcional, el dimorfismo sexual y las características sexuales secundarias. Los pasos de estos procesos están bajo control genético, por lo que mutaciones en estos genes resultan en fallas que se traducen en diferentes anomalías fenotípicas (Neri y Opitz, 1999).

El estudio molecular de individuos con anomalías del desarrollo sexual y el análisis de la secuencia del gen *SRY* permite conocer, en algunos casos, la etiopatogenia de diversos síndromes de reversión sexual en el humano. Los límites entre la determinación gonadal y la diferenciación sexual son cada vez menos aparentes, particularmente con el descubrimiento de otros genes que participan en diferentes niveles del desarrollo sexual. Estos datos revelan la complejidad de la diferenciación gonadal y la necesidad del estudio multidisciplinario de pacientes con anomalías en este proceso.

El síndrome de Turner se caracteriza por talla baja, infantilismo sexual y diversas anomalías somáticas (Grumbach y Conte, 1998). Este padecimiento se asocia con un cariotipo 45,X en 40-60% de los casos, el resto presenta un cromosoma X o Y estructuralmente anormal o son mosaicos con una línea 45,X y una segunda línea con un cromosoma sexual normal o anormal (Hall y Gilchrist, 1990). Sin embargo, los estudios moleculares han mostrado una mayor proporción de individuos mosaicos (Held et al, 1992).

En las pacientes con síndrome de Turner la presencia de cromosoma Y se correlaciona con 20-40% de riesgo de desarrollar gonadoblastoma o disgerminoma, requiriendo la remoción preventiva de las gónadas (Verp y

Simpson, 1987). Esta importancia clínica ha llevado a la realización de estudios en diferentes países para determinar la incidencia de material derivado del cromosoma Y en estas pacientes. Sin embargo, la metodología molecular utilizada, las secuencias del cromosoma Y analizadas, el número de pacientes incluidas y la constitución cromosómica de las mismas, varía considerablemente entre un estudio y otro. Los resultados informados muestran una frecuencia muy variable, que va de 0-61% (Held et al, 1992; Medlej et al, 1992; Nagafuchi et al, 1992; Binder et al, 1995; Coto et al, 1995; Larsen et al, 1995; Fernández et al, 1996).

En este trabajo se investigó la presencia de material genético derivado del cromosoma Y en 75 pacientes con fenotipo Turner y diferentes constituciones cromosómicas. Sólo 6 pacientes fueron positivas para material derivado del cromosoma Y : 4 casos 45,X, 1 caso 45,X/46,X,+mar y el caso 45,X/46,XY. Estos datos resultan en una frecuencia de 8% de pacientes con fenotipo Turner positivas para material genético del cromosoma Y.

Los hallazgos moleculares indicaron el origen del cromosoma marcador en una paciente 45,X/46,X,+mar y detectaron la presencia de secuencias específicas del cromosoma Y en 4 pacientes 45,X. Es importante señalar que aun cuando las 6 pacientes positivas muestran diferentes secuencias del cromosoma Y, en todos los casos se detectó la presencia de la región centromérica, sugiriendo la existencia de una segunda línea celular con un cromosoma Y normal o anormal.

La localización del gen *GBY*, responsable de la predisposición a la malignización de las gónadas disgenéticas, no ha sido aun elucidada. Varios autores han propuesto que este gen se localice en la región centromérica o en el brazo largo del cromosoma Y (Magenis et al, 1984; Distèche et al, 1986; Page 1987b; Petrovic et al, 1992). Sin embargo, Tsuchiya y cols (1995) sugieren que se encuentre en una región de Yp cercana al centrómero. Por lo tanto, como resultado de este trabajo, se sugirió la extirpación preventiva de las gónadas en todas las pacientes positivas para cualquier secuencia del cromosoma Y.

En un estudio previo, nuestro grupo identificó la presencia de una mutación de sentido equivocado (S18N) en la región 5' fuera de la caja HMG del gen *SRY* en

dos pacientes con fenotipo Turner y estrías bilaterales (Canto et al, 2000). Esta mutación había sido previamente detectada en un caso de disgenesia gonadal parcial 46,XY que presentaba un testículo anormal (Domenice et al, 1998). Estos datos sugieren que una misma mutación puede resultar en fenotipos diferentes. Recientemente, se describió la delección de un nucleótido de timina en la posición 422 del gen *SRY*, que resulta en corrimiento de la fase de lectura, en una mujer 45,X/47,XXY; concluyéndose que esta mutación era responsable del fenotipo femenino y las estrías bilaterales observadas en esta paciente (Takagi et al, 2000). En las tres pacientes con fenotipo Turner 45,X positivas para el gen *SRY* (T1, T2 y T3) el análisis de la secuencia de este gen fue normal en todos los casos. La ausencia de mutaciones en *SRY* permiten sugerir que en nuestras pacientes el fenotipo Turner se debe a la presencia mayoritaria de la línea 45,X y es secundario a la haploinsuficiencia de genes anti-Turner localizados en los cromosomas sexuales.

La disgenesia gonadal pura 46,XY se caracteriza por fenotipo femenino, amenorrea primaria y ausencia de caracteres sexuales secundarios (Grumbach y Conte, 1998). Una hipótesis para explicar este padecimiento es la presencia de mutaciones en el gen *SRY* que impidan el desarrollo testicular. Sin embargo, sólo 10-15% de las pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY presentan este tipo de alteraciones, particularmente en la caja HMG del gen *SRY* (En la tabla 1.1 se resumen las principales mutaciones descritas). Se ha demostrado que las mutaciones en la caja HMG muestran una menor capacidad o ausencia de unión a DNA (Harley et al, 1994).

En las pacientes con reversión sexual XY con presencia de *SRY* de secuencia normal, se ha propuesto que se deban a mutaciones en regiones no caracterizadas de *SRY* o en genes que participen en la vía que conduce al fenotipo masculino (Scherer et al, 1998).

Los datos obtenidos en las 8 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY estudiadas revelaron que tres presentaban la forma completa y cinco la forma parcial del padecimiento. A partir de DNA genómico y utilizando la técnica de PCR

se analizó la secuencia del gen *SRY*, incluyendo la caja HMG. Sólo una paciente (D8), con la forma completa, mostró una mutación puntual tanto en DNA de sangre periférica como en el obtenido de ambas gónadas, que conduce al cambio de un codón de triptofano (TGG) por un codón de terminación prematuro (TGA) en la posición 13 de la caja HMG. Aunque la mayoría de las mutaciones en *SRY* informadas en pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY son diferentes, esta mutación es similar a una previamente informada en un caso de forma completa (Hawkins et al, 1992a). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la prevalencia de las mutaciones en *SRY* es mayor en las formas completas de disgenesia gonadal que en las formas parciales (McElreavy et al, 1995). En estas últimas se observa tejido testicular remanente, por lo que probablemente se deban a defectos que ocurren más tardíamente en la cascada de la diferenciación testicular (Neri y Opitz, 1999).

Como se ha sugerido en la literatura, las pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY en las que no se detectó alteración en la secuencia del gene *SRY*, probablemente sean resultado de mutaciones en regiones no analizadas de este gen o en otros genes implicados en la vía de diferenciación masculina (Scherer et al, 1998).

El gen *DAX-1* está implicado en la reversión sexual XY sensible a dosis génica como resultado de microduplicaciones en Xp21 (Zanaria et al, 1994). Se ha demostrado que *DAX1* antagoniza la interacción de *SF1* y *WT1* y los efectos de diferenciación testicular de *SRY* (Swain et al, 1998). En las 7 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY con un gen *SRY* normal no se analizó la presencia de microduplicaciones en Xp21, pudiendo ser la causa de la reversión sexual en alguna de ellas.

En la reversión sexual 46,XX se pueden identificar tres categorías clínicas: fenotipo masculino, masculino con ambigüedad genital y hermafroditas verdaderos (de la Chapelle, 1987).

El estudio mediante técnicas moleculares ha permitido reconocer que 90% de los varones XX son *SRY*-positivos, mientras que en el resto no es posible identificar

secuencias derivadas del Y (Ferguson-Smith et al, 1990; Mc Elreavy et al, 1993). En los sujetos Y-negativos, la reversión sexual puede ser secundaria a mutaciones en genes, autosómicos o ligados al X, que intervienen en la determinación testicular en ausencia de *SRY* (Boucekkine et al, 1994; Garry y Zajak, 1998).

En este trabajo, el estudio molecular reveló que ninguno de los 10 casos esporádicos de varones XX mostraba secuencias centroméricas del cromosoma Y, descartando un mosaicismo oculto con una segunda línea celular con este cromosoma. Seis pacientes de estos pacientes (60%) fueron negativos para todas las secuencias del cromosoma Y (*PABY*, *ZFY* y *SRY*), mientras que los 4 sujetos restantes (40%) resultaron *SRY*-positivos. Estos resultados moleculares demuestran que el desarrollo testicular en los varones XX positivos para *SRY* se debe a la presencia de este gen en su genoma. Más aun, la ausencia de mutaciones en la secuencia del gen *SRY* apoya esta hipótesis.

Por otro lado, se observó que de los 4 varones XX que resultaron *SRY*-positivos, 3 casos presentaron fenotipo masculino normal y sólo uno presentó ambigüedad genital, sugiriendo que no existe correlación entre la presencia de este gen y el fenotipo de estos sujetos.

Con respecto a los pacientes en los que no se detectó *SRY*, la diferenciación testicular es seguramente secundaria a mutaciones en otros genes (autosómicos o ligados al X) que participan en la cascada que conduce al fenotipo masculino.

Por otro lado, los datos clínicos obtenidos parecerían ir en contra de lo informado en la literatura al indicar que en nuestra población existe una proporción elevada de varones XX Y-negativos y con ambigüedad de genitales. Sin embargo, es posible que esto sea secundario al gran número de pacientes atendidos en la consulta pediátrica por ambigüedad genital y a la escasa cantidad de individuos masculinos que acuden por infertilidad en la edad adulta.

La mayoría de los varones XX ocurren de forma esporádica, pero se han informado varios casos en los que existen dos o más individuos afectados (Nicolis et al, 1972; de la Chapelle et al, 1977; Minowada et al, 1979; Abbas et al, 1990). Tres de estos casos familiares fueron analizados a nivel molecular, revelando que los miembros de dos familias eran Y-negativos (Abbas et al, 1990; Numabe et al,

1992; previamente reportada por Minowada et al, 1979) y de la restante Y-positivos (Page et al, 1985, previamente reportada por de la Chapelle et al, 1977). Además se han descrito 9 casos de varones XX y de hermafroditas verdaderos coexistiendo en una misma familia, lo que sugiere un origen genético común para ambos padecimientos (Berger et al, 1970; Kasdan et al 1973; Vergnaud et al, 1986; Skordis et al, 1987; Palmer et al, 1989; Pereira et al, 1991; Kuhnle et al, 1993; McElreavy et al, 1993; Ramos et al, 1996). En las últimas siete familias se realizó un análisis molecular, mostrando que a excepción de una (Palmer et al, 1989) todos los individuos afectados eran Y negativos. Es importante señalar que la mayoría de los varones XX en estas familias presentaban genitales ambigüos.

En este trabajo se analizó a una familia mexicana con dos hermanos varones XX sin ambigüedad genital. Los estudios moleculares revelaron que ambos pacientes eran negativos para todas las secuencias del cromosoma Y estudiadas, incluyendo el gen *SRY*; mientras que éstas estuvieron presentes en el padre y un hermano normal. Estos resultados están de acuerdo con la mayoría de las familias de varones XX y con los casos familiares en los que coexisten con hermafroditas verdaderos XX.

Además, estos datos excluyeron que el cromosoma marcador encontrado en uno de los hermanos varones XX fuera derivado del cromosoma Y. No se identificó el origen de este marcador, pero la baja proporción en la que se encontró y su ausencia en el hermano afectado hacen suponer que no está relacionado con la reversión sexual.

Por todo lo anterior, se concluye que la reversión sexual XX en esta familia es secundaria a una mutación en un gen, autosómico o ligado al X, que participa en la cascada de la diferenciación testicular y que es tan importante como *SRY* (McElreavy et al, 1993; Jiménez et al, 1996). Probablemente la falta de ambigüedad genital observada en estos hermanos varones XX (*SRY* negativos) sea resultado de una mutación homocigota con pérdida de función de un gen recesivo, dominante o ligado al X que conlleva a la activación de la vía de determinación masculina (Zenteno et al, 1997).

Esta familia constituye un modelo genético muy importante para la realización de

un análisis molecular mediante el uso de marcadores microsatélites específicos, lo que permitiría determinar el patrón de herencia y la región cromosómica ligada a la reversión sexual XX en esta familia. Actualmente está en proceso el análisis molecular de esta familia mediante el uso de microsatélites específicos del cromosoma X.

Los hermafroditas verdaderos son individuos con presencia de tejido ovárico y testicular y grados variables de ambigüedad genital. En aproximadamente 60% de los casos el cariotipo es 46,XX, el resto son quimeras 46,XX/46,XY, 46,XY o mosaicos con cromosomas Y normales o anormales (Van Niekerk, 1974). En contraste a lo informado en la literatura para los varones XX, la gran mayoría de los hermafroditas verdaderos 46,XX carecen de secuencias del cromosoma Y (McElreavy et al, 1992; Boucekkine et al, 1994), por lo que se ha sugerido que el desarrollo testicular sea resultado de mutaciones en otros genes, autosómicos o ligados al X, implicados en la diferenciación gonadal, de manera análoga a los varones XX *SRY*-negativos.

En los últimos años se han informado alteraciones genéticas del gen *SRY* en hermafroditas verdaderos, que sugieren nuevos mecanismos para el desarrollo gonadal anormal observado en estos sujetos. Braun y cols (1993) describieron una mutación poscitgótica en *SRY* que originó gónadas con una mezcla de células con y sin esta mutación, lo que seguramente resultó en pérdida de la función determinante de testículo en las células afectadas. Recientemente, se identificó una deleción parcial en el extremo 5' del gen *SRY* en el DNA extraído de la porción testicular del ovotestes de un hermafrodita 46,XX. El gen *SRY* estaba ausente en el DNA de leucocitos y de células de la mucosa bucal (Jiménez et al, 2000).

En este proyecto se estudiaron 10 hermafroditas verdaderos de los cuales 6 presentaron cariotipo 46,XX, y sólo uno de ellos fue positivo para material genético del cromosoma Y (*ZFY* y *SRY*). En el resto de los individuos se observó una segunda línea celular con cromosoma Y, y el análisis molecular reveló que eran positivos para todas las secuencias de este cromosoma analizadas. Por lo

tanto, los resultados obtenidos en los 10 sujetos analizados están de acuerdo con lo informado previamente en la literatura.

En todos los casos de hermafroditas verdaderos en los que se detectó la presencia del gen *SRY* el análisis de la secuencia de la caja HMG fue normal, descartando mutaciones en esta región que pudieran explicar el defecto en el desarrollo gonadal anormal de estos pacientes.

Los datos obtenidos concuerdan con la literatura y sugieren que la mayoría de los hermafroditas verdaderos 46,XX sean resultado de mutaciones en otros genes que participan en la cascada de la diferenciación sexual.

Ha transcurrido una década desde que se localizó al gen *SRY* y se le identificó como *TDF* (Sinclair et al, 1990), sin embargo no se ha elucidado completamente su mecanismo de acción ni su blanco biológico (Vaiman y Pailhoux, 2000). En los años subsecuentes al descubrimiento de *SRY* se describieron varios genes, autosómicos o ligados al X, que participan en los procesos de determinación y diferenciación sexual en el ser humano, permitiendo relacionar un gen maestro en el desarrollo con los mecanismos morfogenéticos que operan en el patrón de un órgano y en la diferenciación de sus células (Capel, 1998).

En el futuro la identificación de otros genes implicados en la cascada de diferenciación sexual, así como de la regulación genética de la misma, permitirá ampliar el conocimiento actual de la fisiología y de la patofisiología de este evento. La caracterización de estos genes será fundamental para el diagnóstico, tratamiento y asesoría de los pacientes con algún padecimiento de diferenciación sexual.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

## 6.0 CONCLUSIONES

- (1) Se analizó la presencia de secuencias específicas del cromosoma Y en 105 pacientes con diferentes patologías de la diferenciación sexual.
- (2) El análisis molecular en 75 sujetos con síndrome de Turner y diferentes cariotipos permitió detectar material derivado del cromosoma Y en 6 casos. Esto resulta en una frecuencia de 8% de mosaicismo con cromosoma Y en el genoma de pacientes con fenotipo Turner en nuestra población.
- (3) Se demostró que la translocación de *SRY* al cromosoma X paterno explica la mayoría de los casos esporádicos de varones XX.
- (4) Se observó que de los 4 varones XX que resultaron *SRY*-positivos, 3 casos presentaron fenotipo masculino normal y sólo uno presentó ambigüedad genital, sugiriendo que no existe correlación entre la presencia de este gen y el fenotipo de estos sujetos.
- (5) El análisis molecular de dos hermanos varones XX sin ambigüedad genital reveló que eran Y-negativos, sugiriendo que sean resultado de una mutación en un gen autosómico o ligado al cromosoma X.
- (6) La presencia de *SRY* es un hallazgo frecuente en los hermafroditas verdaderos mosaicos con cromosoma Y, pero raro en los hermafroditas verdaderos XX.
- (7) En los 20 casos positivos para *SRY*, el análisis del marco abierto de lectura de este gen sólo mostró la existencia de una mutación puntual en la caja HMG en una paciente con la forma completa de disgenesia gonadal pura 46,XY.
- (8) Estos datos, aunados a los de la literatura, nos llevan a sugerir que las mutaciones en *SRY* son poco frecuentes y que sólo explican una muy pequeña proporción de la etiología de estos padecimientos y del fenotipo de estos pacientes.

## 7.0 REFERENCIAS

- Abbas EN, Toublanc JE, Boucekkinne C, Toublac M, Affara NA, Jacob JC, Fellous M (1990). A possible common origin of "Y-negative" human XX males and XX true hermaphrodites. *Hum Genet* 84: 356-360.
- Affara NA, Ferguson-Smith MA, Tolmie J, Kwok K, Mitchell M, Jamieson D, Cooke A, Florentin A (1986). Variable transfer of y-specific sequences in XX males. *Nucleic Acids Res* 14: 5375-5387.
- Affara NA, Chalmers IJ, Ferguson-Smith MA (1993). Analysis of the SRY gene in 22 sex-reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. *Hum Mol Genet* 2: 785-789.
- Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JBL (1992). The expression of the Wilms' tumor gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 40: 85-97.
- Arn P, Chen H, Tuck-Muller CM, Mankinen C, Wachtel G, Li S, Shen CC, Wachtel SS (1994). SRX, a sex reversing locus in Xp21.2-p22.11. *Hum Genet* 93: 389-393.
- Ashworth A, Rastan S, Lovell-Badge R, Kay G (1991). X-chromosome inactivation may explain the difference in viability of XO humans and mice. *Nature* 351: 406-408.
- Bailey WA, Zwingman TA, Reznik VA, Griswold WR, Mendoza SA, Jones KL, Freidenberg GR (1992). End-stage renal disease and primary hypogonadism associated with a 46,XX karyotype. *AJDC* 146: 1218-1223.
- Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR (1995). Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *BioTechniques* 18: 768-770, 772-773.
- Barboux S, Niaudet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttan F, Fékéte CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavy K (1997). Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nature Genet* 17: 467-470.
- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genet* 7: 497-501.

- Baumstark A, Barbi G, Djalali M, Geerkens C, Mitulla B, Mattfelt T, de Almeida JC, Vargas FR, Lerena Junior JC, Vogel W, Just W (1996). Xp-duplications with and without sex reversal. *Hum Genet* 97: 79-86.
- Berger R, Abonyi D, Nodot A, Vialatte J, Lenjeune J (1970). Hermaphrodisme vrai et "garçon XX" dans une fratrie. *Rev Eur Etudes Clin Biol* 15: 330-333.
- Bernstein R, Jenkins T, Dawson B, Wagner J, Dewald G, Koo GC et al (1980). Female phenotype and multiple abnormalities in sibs with a Y chromosome and partial X chromosome duplication: H-Y antigen and Xg blood group findings. *J Med Genet* 17: 291-300.
- Bickmore WA, Oghene K, Little MH, Seawright A, van Heyningen V, Hastie ND (1992). Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms' tumour wt1 gene transcript. *Science* 257: 235-237.
- Bilbao JR, Loridan L, Castano I (1996). A novel postzygotic nonsense mutation in SRY in familial XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet* 97: 537-539.
- Binder G, Koch A, Wajs E, Ranke MB (1995). Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common? *J Clin Endocrinol Metab* 80: 3532-3536.
- Boucekkine C, Toubanc JE, Abbas N, Chaabouni S, Ouahid S, Semrouni M, Jaubert F, Toubanc M, McElreavy K, Vilain E, Fellous M (1994). Clinical and anatomical spectrum in XX sex reversed patients. Relationship to the presence of Y-specific DNA-sequences. *Clin Endocrinol* 40: 733-742.
- Braun A, Kammerer S, Cleve H, Lohrs U, Schwarz HP, Kuhnle U (1993). True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male gonadal sex-determining locus (SRY): molecular genetics and histological findings in a sporadic case. *Am J Hum Genet* 52: 578-585.
- Brown S, Yu CC, Lanzano P, Heller D, Thomas L, Warburton D, Kitajewski J, Stadtmauer L (1998). A de novo mutation (gln2stop) at the 5-prime end of the SRY gene leads to sex reversal with partial ovarian function. *Am J Hum Genet* 62: 189-193.
- Bruening W, Pelletier J (1996). A non-AUG translation initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem* 271: 8646-8654.
- Buffone GJ, Darlington GJ (1995). Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 31: 164-165.
- Burris TP, Guo W, Le T, McCabe ER (1995). Identification of a putative steroidogenic factor-1 response element in the DAX-1 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 576-581.

- Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler A, Pelletier J, Harber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, Jones C, Housman DE (1990). Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60: 509-520.
- Cameron FJ, Sinclair AH (1997). Mutation in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum Mutat* 9: 388-395.
- Canto P, de la Chesnaye E, López M, Cervantes A, Chávez B, Vilchis F, Reyes E, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro G, Méndez JP (2000). A mutation in the 5' non high mobility group box region of the SRY gene in patients with Turner syndrome and Y mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1908-1911.
- Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1993). Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* 73:1019-1030.
- Capel B (1998). Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Ann Rev Physiol* 60: 497-523.
- Capel B (2000). The battle of sexes. *Mech Dev* 92: 89-103.
- Cattanach B (1961). XO mice. *Genet Res* 3: 487-490.
- Clement-Jones M, Schiller S, Rao E, Blaschke R J, Zuniga A, Zeller R, Robson SC, Binder G, Glass Y, Strachan T, Lindsay S, Rappold G (2000). The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 695-702.
- Clepet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1993). The human SRY transcript. *Hum Mol Genet* 2: 2007-2012.
- Coto E, Toral J, Méndez M, Hernando I, Plascencia A, Benavides A, López-Larrea C (1995). PCR-based study of the presence of Y-chromosome sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Hum Genet* 57: 393-396.
- da Silva Morais S, Hacker A, Harley V, Goodfellow PN, Swain A, Lovell-Badge R (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genet* 14: 62-68.
- de la Chapelle A, Hortling H, Niemi M, Wennstrom J (1964). XX sex chromosomes in a human male: first case. *Acta Med Scan (Suppl)* 412: 25-28.

- de la Chapelle A, Schröder J, Murros J, Tallqvist (1977). Two XX males in one family and additional observations bearing on the etiology of XX males. *Clin Genet* 11: 91-106.
- de la Chapelle A (1981). The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* 58: 105-116.
- de la Chapelle A (1987). The Y-chromosomal and autosomal testis-determining genes. *Dev Suppl* 101: 33-38.
- de Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Bio* 18: 6653-6665.
- de Santa Barbara P, Moniot B, Poulat B, Berta P (2000). Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn* 217: 293-298.
- Desclozeaux M, Poulat F, Barbara PD, Capony JP, Turowski P, Jay P et al (1998). Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem* 273: 7988-7995.
- Disteché CM, Casanova M, Saal H, Friedman C, Sybert V, Graham J, Thuline H, Page DC, Fellous M (1986). Small deletions of the short arm of the Y chromosome in 46,XY females. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7841-7844.
- Domenice S, Nishi MY, Billerbeck AEC, Latronico AC, Medeiros MA, Russell AJ, Vass K, Carvalho FM, Frade EMC, Arnhold IJP, Mendonca BB (1998). A novel missense mutation (S18N) in the 5-prime non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial gonadal dysgenesis and his normal male relatives. *Hum Genet* 102: 213-215.
- Donlon TA, Muller U (1991). Deletion mapping of DNA segments from the Y chromosome long arm and their analysis in an XX male. *Genomics* 10: 51-55.
- Drash A, Sherman F, Hartmann WH, Blizzard RM (1970). A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr* 76: 585-593.
- Evans HJ, Buckton KE, Spowart G, Carothers AD (1979). Heteromorphic X chromosomes in 46,XX males: evidence for the involvement of X-Y interchange. *Hum Genet* 49: 11-31.
- Evans RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.

- Fechner PY, Marcantonio SM, Ogata T, Rosales TO, Smith KD, Goodfellow PN, Migeon CJ, Berkovitz GD (1993). Report of a kindred with X-linked (or autosomal dominant sex-limited) 46,XY partial gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1248-1253.
- Ferguson-Smith MA (1966). X-Y chromosomal interchange in the aetiology of true hermaphroditism and of XX Klinefelter's syndrome. *Lancet* II: 475-476.
- Ferguson-Smith MA, Cooke A, Affara NA, Boyd E, Tolmie JL, (1990). Genotype-phenotype correlations in XX males and their bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet* 84: 198-202.
- Fernández R, Méndez J, Pasaro E.(1996). Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. *Hum Genet* 98: 29-35.
- Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. (1992). SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J* 11: 4497-4506.
- Fisher EMC, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Bentley L, Willard HF, Bieber FR, Page DC (1990). Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* 63: 1205-1218.
- Ford CE, Jones KW, Miller OJ, Mittwoch U, Penrose LS, Ridler M, Shapiro A (1959). A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1: 711-713.
- Foster JW, Brennan FE, Hampikian GB, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves JAM (1992). Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature* 359 : 531-533.
- Foster JW, Domínguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Schafer AJ (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372: 525-530.
- Fraccaro M, Tiepolo L, Zuffardi O, Chiumello G, di Natale B, Gargantini L, Wolf U (1979). Familial XX true hermaphroditism and the H-Y antigen. *Hum Genet* 48:45-52.
- Garry LW, Zajac JD (1998). Disorders of sexual differentiation. *Endocrinol Metab Clin NA* 27: 945-967.
- German J, Simpson JL, Chaganti RSK (1978). Genetically determined sex-reversal in 46,XY humans. *Science* 202: 53-56.

- Goodfellow PN, Camerino G (1999). DAX-1, an "antitestis" gene. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 55: 857-863.
- Graves JA (1996). Mammals that break the rules: genetics of marsupials and monotremes. *Ann Rev Genet* 30: 233-260.
- Graves JA (1998). Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J Exp Zool* 281: 472-481.
- Grumbach MM, Conte FA (1998) Disorders of sex differentiation. En: "Williams Textbook of Endocrinology". 9th ed. W.B. Saunders Company. 1303-1325pp.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberger A. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.
- Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1992). Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7953-7957.
- Guellaen G, Casanova M, Bishop C, Geldwerth D, Andre G, Fellous M, Weissenbach J (1984) Human XX males with single copy DNA fragments. *Nature* 307: 172-173.
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE (1991): Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9618-9622.
- Hacker A, Capel B, Goodfellow PN, Lovell-Badge R (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121: 1603-1614.
- Hall J, Gilchrist D (1990). Turner syndrome and its variants. *Pediatr Clin North Am* 37: 1421-1440.
- Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 22: 1500-1501.
- Hastie ND (1993) Dominant negative mutations in the Wilms' tumor (WT1) gene cause Denys Drash syndrome- proof that a tumour suppressor gene plays a crucial role in normal genitourinary development. *Hum Mol Genet* 1:293-295.
- Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Leveilliers J, van der Auwera B, Goodfellow PN (1992a) Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet* 88: 471-475.

- Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD (1992b). Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet* 51: 979-984.
- Hawkins JR (1993). Mutational analysis of SRY in XY females. *Hum Mutat* 2: 347-350.
- Held KR, Kerber S, Kaminsky E, Singh S, Goetz P, Seemanova E, Goedde A (1992). Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet* 88: 288-294.
- Hiort O, Gramss B, Klauber GT (1995). True hermaphroditism with 46,XY karyotype and point mutation in the SRY gene. *J Pediatr* 125: 738-744.
- Hiort O, Holterhus PM (2000). The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* 142: 101-110.
- Hodgkin J (1992). Genetic sex determination, mechanisms and evolution. *BioEssays* 14: 253-261.
- Hook EB, Warburton D (1983). The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: live birth prevalence and evidence of diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet* 64: 24-27.
- Houston CS, Opitz JM, Spranger JW, MacPherson RI, Reed MH, Gilbert EF, Hermann J, Schnizel A. (1983). The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17 year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. *Am J Hum Genet* 15: 3-28.
- Iida T, Nakahori Y, Komaki R, Mori E, Hayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, Nakagome Y (1994). A novel missense mutation in the HMG box of the SRY gene in a patient with XY sex reversal. *Hum Molec Genet* 3: 1437-1438.
- Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 8: 654-662.
- Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen W-H et al (1994). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8: 2302-2312.
- Ito M, Yu R, Jameson RL (1997). DAX-1 inhibits SF-1 mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol* 17: 1476-1483.

- Jacobs PA, Strong A (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183: 302-303.
- Jäger RJ, Ebensperger C, Fraccaro M, Scherer G (1990). A ZFY-negative 46,XX true hermaphrodite is positive for the pseudoautosomal boundary. *Hum Genet* 85: 666-668.
- Jäger RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G (1992). A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Hum Genet* 90: 350-355.
- Jiménez R, Sánchez A, Burgos M, Díaz de la Guardia R (1996). Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet* 12: 164-166.
- Jiménez AL, Kofman-Alfaro S, Berumen J, Hernández E, Canto P, Méndez JP, Zenteno JC (2000). Partially deleted SRY gene confined to testicular tissue in a 46,XX true hermaphrodite without SRY in leucocytic DNA. *Am J Hum Genet* 93: 417-420.
- Jost A (1947). Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 59: 37-50.
- Just W, Geerkens C, Held K, Vogel W (1992). Expression of RPS4X in fibroblasts from patients with structural aberrations of the X-chromosome. *Hum Genet* 89: 240-242.
- Kasdan R, Nankin HR, Troen P, Wald N, Pan S, Yanaihara T (1973). Paternal transmission of maleness in XX human beings. *N Engl J Med* 288: 539-545.
- Kempter B, Grossbadern (1992). Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *Trends Genet* 8:2.
- Kofman-Alfaro S, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Angeles A, Schiavon R, Pérez-Palacios G (1989). Studies on gonadal dysgenesis: variable expressivity of the XY testicular dysgenesis syndrome; two case reports. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 32: 625-674.
- Kogan SC, Gitschier J (1990). Genetic predisposition of hemophilia A. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). PCR Protocols: A Guide to methods and Applications. San Diego. Academic Press. pp288-299.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow O, Lovell-Badge R (1991). Male development of chromosomally female transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.
- Koopman P (1999). Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 55: 839-856.

- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R (1993). WT1 is required for early kidney development. *Cell* 74: 679-681.
- Kuhnle U, Schwartz HP, Lohrs U, Stengel-Ruthkowsky S, Cleve H, Braun A (1993). Familial true hermaphroditism: paternal and maternal transmission of true hermaphroditism (46,XX) and XX males in the absence of Y-chromosomal sequences. *Hum Genet* 92: 571-576.
- Lala DS, Rice DA, Parker K (1992). Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu factor 1. *Mol Endocrinol* 6: 1249-1258.
- Larsen T, Gravholt CH, Tillebeck A, Larsen H, Jensen MB, Nielsen J, Friedrich U (1995). Parental origin of the X chromosome, X chromosome mosaicism and screening for the "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. *Clin Genet* 48: 6-11.
- López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson RP, Kofman-Alfaro S (1995a). SRY alone can induce normal sexual differentiation. *Am J Med Genet* 55: 356-358.
- López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Pérez-Palacios G, Erickson RP, Alfaro G, Kofman-Alfaro S (1995b). Clinical traits and molecular findings in 46,XX males. *Clin Genet* 48: 29-34.
- López M, Zenteno JC, Méndez JP, Kofman-Alfaro S (1998). Heterogeneidad genética y variabilidad fenotípica en la reversión sexual 46,XY. *Rev Invest Clin* 50: 171-176.
- Lovell-Badge R, Robertson E (1990). XY female mice resulting from a heritable mutation in the murine primary testis determining gene, Tdy. *Development* 109: 635-646.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and for male sexual differentiation. *Cell* 77: 481-490.
- Lyon MF, Hawker SG (1973). Reproductive lifespan in irradiated and unirradiated chromosomally XO mice. *Genet Res* 21: 185-194.
- Magenis RE, Webb MJ, McKean RS, Tomar D, Allen LJ, Kammer H, VanDike DL, Lovrien E (1982). Translocation (X:Y) (p22.33; p11.2) in XX males: etiology of male phenotype. *Hum Genet* 62: 271-276.
- Magenis RE, Tochen ML, Holahan KP, Carey T, Allen L, Brown MG (1984). Turner syndrome resulting from partial deletion of Y chromosome short arm: localization of male determinants. *J Pediatr* 105: 916-919.

- Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol* 7: 958-968.
- Medlej R, Lobaccaro JM, Berta P, Belon C, Leheup B, Toublanc JE, Weill J, Chevalier C, Dumas R, Sultan C (1992). Screening for Y-derived sex determining gene SRY in 40 patients with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1289-1292.
- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Costas J-M, Souleyreau N, Kucheria K, Boucekkine C, Thibaud E, Brauner R, Flamant F, Fellous M (1992a). XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11016-11020.
- McElreavy KD, Vilain E, Boucekkine C, Vidaud M, Jaubert F, Richaud F, Fellous M (1992b). Short communication: XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. *Genomics* 13: 838-840.
- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz Y, Fellous M (1993). A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Nat Acad Sci USA* 90: 3368-3372.
- McElreavey K, Krausz C, Bishop CE (2000). The human Y chromosome and male infertility. *Res Probl Cell Diff* 28: 211-232.
- Miller RW, Fraumeni JF, Manning MD (1964). Association of Wilms' tumor with aniridia, hemihypertrophy and other congenital anomalies. *N Engl J Med* 270: 922-927.
- Müller U, Lalande M, Donlon T, Latt SA (1985). Moderately repeated DNA sequences specific for the short arm of the human Y chromosome are present in XX males and reduced in copy number in an XY female. *Nucleic Acids Res* 14: 1325-1340.
- Minowada S, Kabayashi K, Isurugi K, Fukutani K, Ikeuchi H, Hasegawa T, Yamada K (1979). Two XX male brothers. *Clin Genet* 15: 399-405.
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo Y, Aizawa S (1997). Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 124: 1653-1664.
- Moniot B, Berta P, Scherer G, Sudbeck P, Poulat F (2000). Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mech Dev* 91: 323-325.
- Müller U, Donlon T, Schmid M, Fitch N, Richer CL, Lalande M, Latt SA (1986). Deletion mapping of the testis-determining locus with DNA probes in 46,XX males and in 46,XY and 46,X,dic(Y) females. *Nucleic Acids Res* 14: 6489-6505.

- Müller J, Schwartz M, Skakkebaek N (1992). Analysis of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in sex reversed patients: point-mutation in SRY causing sex-reversion in a 46,XY female. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 331-333.
- Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Récan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zeheter G, Rabl W, Swarz HP, Kaplan JC, Camerino G, Meitinger T, Monaco AP (1994). Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372: 672-676.
- Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enjeart -VanHouten DL, Fanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA (1998). Wilm's tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in a sex specific gene expression. *Cell* 93: 445-454.
- Nagafuchi S, Tamura T, Nakahori Y, Takano K, Nishi Y, Iwatani N, Kitao M, Hori Y, Konda S, Hasegawa T, Numabe H, Fujieda K, Tanaka T, Hibi Y, Nakagome Y (1992). The majority of the marker chromosomes in Japanese patients with sitgmata of Turner syndrome are derived from Y chromosomes. *Hum Genet* 89: 590-592.
- Neri G, Opitz J (1999). Syndromal (and nonsyndromal) forms of male pseudohermaphroditism. *Am J Med Genet* 89: 201-209.
- Nicolis GL, Hsu LY, Sabetghadam R, Kardon NB, Chernay PR, Mathur DP, Rose HG, Hirschhorn K, Gabilove JL (1972). Klinefelter's syndrome in identical twins with the 46,XX chromosome constitution. *Am J Med* 52: 482-491.
- Numabe H, Nagafuchi S, Nakahori Y, Tamura Y, Liuchi H, Namiki M, Kohda M, Kohda N, Fukushima Y, Kudano M, Arai T, Matsuzaki Y, Fukutani K, Isurugi K, Kuroki Y, Ikeuchi T, Yoshida M, Minowada S, Nakagone Y (1992) DNA analysis of XX and XX-hypospadiac males. *Hum Genet* 90: 211-214.
- Ogata T, Matsuo N (1995). Turner syndrome and female sex chromosomes aberrations: deductions of the principal factors involved in the development of clinical features. *Hum Genet* 95: 607-629.
- Okuhara K, Tajima T, Nakae J, Fujieda K (2000). A novel missense mutation in the HMG box region of the SRY gene in a Japanese patient with an XY sex reversal. *J Hum Genet* 45: 112-114.
- Page DC, Chapelle A de la, Weisenbach J, (1985). Chromosome Y-specific DNA in related human XX males. *Nature* 315: 224-226.
- Page DC, Mosher E, Simpson E, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown LG (1987). The sex determining region of the Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091-1104.

- Page DC (1987). Hypothesis: A Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development Suppl* 101: 151-155.
- Page DC, Fisher EMC, McGillivray B, Brown LG (1990). Additional deletion in sex determining region of human Y chromosome resolves paradox of X,t(Y;22) female. *Nature* 346: 279-281.
- Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas EN, Fellous M (1989). Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 34: 937-939.
- Parker KL, Schedl A, Schimmer BP (1999a). Gene interactions in gonadal development. *Ann Rev Physiol* 61: 417-433.
- Parker KL, Schimmer BP, Schedl A (1999b). Genes essential for early events in gonadal development. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 55: 831-838.
- Patsalis PC; Sismani C, Hadjimarcou MI, Kitsiou-Tzeli S, Tzezou A, Hadjiathanasiou CG, Velissariou V, Lymberatou E, Moschonas NK, Skordis N (1998). Detection and incidence of cryptic Y chromosome sequences in Turner syndrome patients. *Clin Genet* 53: 249-257.
- Pelletier J, Schalling M, Buckler A, Rogers A, Haber DA, Housman D (1991a) Expression of the Wilms' tumor gene WT-1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* 5: 1345-1356.
- Pelletier J, Bruening W, Kasthan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib F, Fouser L, Fine RN, Silverman BL, Haber DA, Housman D (1991b) Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys Drash syndrome. *Cell* 67: 437-447.
- Petrovic V, Nasioulas S, Chow CW, Voullaire L, Schmidt M, Dahl H (1992). Minute Y chromosome derived marker in a child with gonadoblastoma: cytogenetic and DNA studies. *J Med Genet* 29: 542-546.
- Pereira ET, Cabral de Almeida JC, Guhna ACYRG, Patton M, Taylor R, Jeffery S (1991). Use of probes for ZFY, SRY and the Y pseudoautosomal boundary in XX males, XX true hermaphrodites and an XY female. *J Med Genet* 28: 591-595.
- Polani PE, Hunter WF, Lennox B (1954). Chromosomal sex in Turner's syndrome with coarctation of the aorta. *Lancet* 2:120.
- Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Scherer G (1994). Sex reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 13: 6115-6124.

- Poulat F, Soullier S, Gozé C, Heitz F, Calas B, Berta P (1994). Description and functional implications of a novel mutation in the sex-determining gene SRY. *Hum Mutat* 3: 200-204.
- Poulat F, Girard F, Chevron M-P, Gozé C, Rebillard X, Calas B, Lamb N, Berta P (1995). Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J Cell Biol* 128: 737-748.
- Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, van Heyningen V, Hastie N (1990). The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346: 194-196.
- Quilter CR, Taylor K, Conway GS, Nathwani N, Delhanty JDA (1998). Cytogenetic and molecular investigations of Y chromosome sequences in Turner syndrome. *Ann Hum Genet* 62: 99-106.
- Ramos ES, Moreira-Filho CA, Vicente YAMVA, Llorach-Velludo MAS, Tucci S Jr, Duarte MHO, Araujo AG, Martelli L (1996). SRY-negative true hermaphrodites and an XX male in two generations of the same family. *Hum Genet*; 97: 596-598.
- Ramsay M, Berstein R, Zwane E, Page DC (1988). XX true hermaphroditism in Southern African blacks: an enigma of primary sex differentiation. *Am J Hum Genet* 42: 4-13.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesle B, Martz A, Muroyra K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA (1997). Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genet* 16: 54-62.
- Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D (1998). Evidence for the evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391: 691-695.
- Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D (1999a). Expression of Dmtr1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol* 215: 208-220.
- Raymond CS, Parker DE, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Bardwell VJ, Zarkower D (1999b). A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet* 8: 989-996.
- Roberts LM, Shen J, Ingraham H (1999). New solutions to an ancient riddle: defining the differences between Adam and Eve. *Am J Hum Genet*; 65: 933-942.

- Root AW (1999). Genetic errors of sexual differentiation. *Adv Pediatr* 46: 67-99.
- Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Geremia R (1993). Direct evidence that the mouse sex-determining gene Sry is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ-cell line in the adult testis. *Mol Reprod Dev* 34: 369-373.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd de. Cold Spring Harbor laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont MEM, Sullivan MJ, Dobys WB, Eccles MR (1995). Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureterla reflux. *Nature Genet* 9: 358-363.
- Schafer AJ (1995). Sex determination and its pathology in man. *Adv Genet* 33: 275-329.
- Schafer AJ, Domínguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, et al (1995). The role of SOX9 in autosomal sex reverasal and campomelic dysplasia. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 350: 271-278.
- Schafer AJ, Goodfellow PN (1996). Sex determination in humans. *BioEssays* 18: 955-963.
- Scherer G, Held M, Erdel M, Meschede D, Horst J, Lesniewicz R, Midro AT (1998). Three novel SRY mutation in XY gonadal dysgenesis and the enigma of XY gonadal dysgenesis cases without SRY mutations. *Cytogenet Cell Genet* 80:188-192.
- Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwaber P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G (1995). Two novel missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet* 56: 862-869.
- Schneider-Gädicke A, Beer-Romero P, Brown LG, Nussbaum R, Page DC (1989). ZFX has a gene structure similar to ZFY: the putative sex determinant and escapes X-inactivation. *Cell* 57: 1247-1258.
- Scully RE (1970). Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 25: 1340-1356.
- Shawlot W, Behringer R (1995). Requirement for Lim1 in head-organiser function. *Nature* 374: 425-430.
- Shen W\_H, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA (1994). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates MIS gene expression: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77: 651-66.

- Sinclair AH (1998). Human sex determination. *J Exp Zool* 281: 501-505.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- Skordis NA, Stetka DG, MacGillivray MH, Greenfield SP (1987). Familial 46,XX males coexisting with familial 46,XX true hermaphrodites in the same pedigree. *J Pediatr* 110: 244-248.
- Sparkes RS, Klisak Y, Miller WL (1991). Regional mapping of genes encoding human steroidogenic enzymes: P450scc to 15q23-q24, adrenodoxin to 11q22; adrenodoxin reductase to 17q24-q25; and P450c17 to 10q24-25. *DNA Cell Biol* 10: 359-365.
- Spurdle A, Shankman S, Ramsay M (1995). XX True hermaphroditism in Southern African blacks: Exclusion of SRY sequences and uniparental disomy of the X chromosome. *Am J Hum Genet* 55: 53-56.
- Su H, LauYFC (1993). Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet* 52: 24-38.
- Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G (1996). Mouse DAX1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nature Genet* 12: 404-409.
- Swain A, Narvaez V, Burgoyne PS, Camerino G, Lovell-Badge R (1998). Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391: 761-767.
- Swyer GIM (1955). Male pseudohermaphroditism: a hitherto undescribed form. *Br Med J* 2: 709-712.
- Tajima T, Nakae J, Shinohara N, Fujieda K (1994). A novel mutation localized in the 3' non-HMG box region of the SRY gene in 46,XY gonadal dysgenesis. *Hum Mol Genet* 3: 1187-1189.
- Takagi A, Imai A, Tamaya T (1999). A novel sex-determining region on Y (SRY) nonsense mutation identified in a 45,X/47,XYY female. *FertilSteril.*; 72: 167-169.
- Taketo M, Parker KL, Howard TA, Tsukiyama T, Wong M, Niwa O, Morton CC, Miron PM, Seldin MF. (1995). Homologs of Drosophila Fushi-Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. *Genomics* 25: 565-567.

- Therkelsen AJ (1964). Sterile man with chromosomal constitution, 46,XX. *Cytogenetics* 3: 207-218.
- Torres L, López M, Méndez JP, Canto P, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson RP, Kofman-Alfaro S (1996) Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Hum Genet* 63: 348-355.
- Toublanc JE, Boucekkine C, Abbas N (1993). Hormonal and molecular genetic findings in 46,XX subjects with sexual ambiguity and testicular differentiation. *Eur J Pediatr* 152: 570-575.
- Tsuchiya K, Reijo R, Pge DC, Disteché C (1995). Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region of the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 57: 1400-1407.
- Turner HH (1938). A syndrome of infantilism, congenital webbed and cubitus valgus. *Endocrinology* 23: 566-574.
- Uehara S, Funato T, Yaegashi N, Suzuki H, Sato J, Sasaki T, Yajima A (1999). SRY mutation and tumor formation on the gonads of XY pure gonadal dysgenesis patients. *Am J Hum Genet*, 87: 349-353.
- Ullrich P (1949). Turner's syndrome status Bonnevie-Ullrich. *Am J Hum Genet* 1 : 179-202.
- Vaiman D, Pailhoux E (2000). Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *Trends Genet* 16: 488-494.
- Vainio S, Helkkilä M, Klapert A, Chin N, McMahon, AP (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397: 405-409.
- Van Niekerk WA (1976). True hermaphroditism: an analytic review with a report of 3 new cases. *Am J Obstet Gynecol* 126: 890-907.
- Veitia R, Ion A, Barboux S, et al. (1997). Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet* 99: 648-652.
- Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, de la Chapelle A, Weissenwach J (1986). A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* 38: 109-124.
- Verp MS, Simpson JL (1987). Abnormal sexual differentiation of neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 25: 191-218.

- Vilain E, Jaubert F, Fellous M, McElreavy K (1993). Pathology of XY pure gonadal dysgenesis: absence of testis differentiation associated with mutations in the testis-determining factor. *Differentiation*; 52: 151-159.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup H, Schempp W, Scherer G (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79: 1111-1120.
- Warne GL, Zajac JD (1998). Disorders of sexual differentiation. *Endocrinol Metab Clin NA*; 27: 945- 967.
- Welshons WJ, Russell LB (1959). The Y-chromosome as the bearer of male determining factor in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 45: 560-566.
- Werner MH, Huth JR, Gronenborn AM, Clore GM (1995). Molecular basis of human 46,XY sex reversal revealed from the three dimensional solution structure of the human SRY DNA complex. *Cell* 81: 705-714.
- Wilkie AOM, Campbell FM, Daubeney P, Grant DB, Daniels RJ, Mullarkey M, Affara NA, Pitchett M, Huson SM (1993). Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of two cases and literature review. *Am J Hum Genet* 46: 597-600.
- Witt M, Erickson RP (1989). A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 82: 271-274.
- Witt M, Erickson RP (1991) A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by polymerase chain reaction (erratum). *Hum Genet* 86:540.
- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature Genet* 9; 15-20.
- Wulfsberg EA, Weaver RP, Cunniff CM, Jones MC, Jones KL (1989). Chromosome 10qter deletion syndrome: a review and report of three new cases. *Am J Hum Genet* 32: 364-367.
- Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL (1998a). Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nature Genet*; 20: 353-357.
- Yu RN, Ito M, Jameson JL (1998b). The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor - regulatory element. *Mol Endocrinol* 12: 1010-1022.

- Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom T, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker A, McCabe E, Meitinger T, Monace A, Sassone-Corsi P, Camerino G (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372: 635-641.
- Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone Corsi P (1997). DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390: 311-315.
- Zhang YH, Guo W, Wagner RL, Huang BL, McCabe L, Vilain E, Burris TP, Anyane-Yeboa K, Burghes AH, Chitayat D, Chudley AE, Genel M, Gertner JM, Klingensmith GJ, Levine SN, Nakamoto J, New MI, Pagon RA, Pappas JG, Quigley CA, Rosenthal IM, Baxter JD, Fletterick RJ, McCabe ER (1998). DAX1 mutations map to putative structural domains in a deduced three dimensional model. *Am J Hum Genet* 62: 855-864.
- Zeng YT, Ren ZR, Zhang ML, Huang Y, Zeng FY, Huang SZ (1993). A new de novo mutation (A113T) in HMG box of the SRY gene leads to XY gonadal dysgenesis. *J Med Genet* 8: 655-657.
- Zenteno JC, López M, Vera C, Méndez JP, Kofman-Alfaro S (1997). Two SRY-negative brothers without genital ambiguity. *Hum Genet* 100: 606-610.
- Zinn AR, Ross JL (1998). Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr Genet Dev* 8: 322-327.