

Nº 42
2EJ.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ELABORACION DE UN BANCO DE DNA DE PACIENTES CON ANOMALIAS DE LA DIFERENCIACION SEXUAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N:

LUZ MARIA ESCOBAR MORENO

ADRIANA ZAMORA FERNANDEZ

MEXICO D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

I. Introducción	1
II. Marco teórico	3
II.1 Genética molecular	3
II.2 Banco de DNA	11
II.3 Diferenciación sexual normal y patológica humana	13
II.3.1 Diferenciación cromosómica	14
II.3.2 Diferenciación gonadal	26
II.3.3 Diferenciación fenotípica	28
II.3.4 Síndrome de Turner	32
II.3.5 Disgenesia gonadal mixta	42
II.3.6 Hermafroditas verdaderos	45
II.3.7 Varones XX	52
III. Banco de DNA de pacientes con anomalías de la diferenciación sexual.	57
IV. Material y métodos	60
V. Resultados	67
VI. Discusión	86
VII. Conclusiones	92
VIII. Bibliografía	93

I. INTRODUCCION

El hombre siempre se ha preocupado por conocer cómo se encuentra y cómo se manifiesta la información genética contenida en las células. En 1857, Virchow observó por primera vez cromosomas humanos en células en división, aunque su naturaleza no fue reconocida entonces. Para 1885 ya se había aceptado que los cromosomas constituyen la base física de la herencia. A partir de entonces se emprendió la tarea de determinar el número de los cromosomas y el mecanismo de determinación sexual en la especie humana.(1)

El primer investigador fue Guyer, quien en 1910 reportó un número total de 22 cromosomas en hombres y 24 en mujeres; además planteó que el mecanismo de determinación sexual era del tipo X-O. (2) Von Winiwarter concluyó que el número de cromosomas era de 48 en mujeres y 47 en hombres, y que el mecanismo de determinación sexual dependía de la presencia de uno o dos cromosomas X. En 1917, Weiman reporta la presencia de los cromosomas X y Y. (3,4)

Painter [1921-1923] dedujo correctamente el mecanismo XY de determinación sexual y concluyó que la mitad del esperma contenía cromosoma X y la otra mitad cromosoma Y. Sin embargo, planteó que el número de cromosomas en el humano era de 48. (4,5)

Durante las siguientes dos décadas esto fue aceptado, hasta que en 1956 Tjio y Levan (6) demostraron que el número correcto era de 46 cromosomas. Otras investigaciones apoyaron estos resultados(7).

De esta manera quedó establecido que el número de cromosomas en la especie humana es de 46 y que el mecanismo de determinación sexual es del tipo XY.

En el humano, la presencia o ausencia del cromosoma Y determina el camino de la diferenciación sexual(8). Dentro de las enfermedades genéticas, el presente trabajo incluye a

conjunto de enfermedades ocasionadas por defectos originados en el proceso de la diferenciación sexual.

Para complementar este trabajo se incluye una revisión bibliográfica sobre el proceso normal de diferenciación sexual, así como de los padecimientos que abarca esta tesis.

Debido a la importancia que en los últimos años ha tenido la biología molecular, en el Servicio de Genética del Hospital General de México SSA se vio la necesidad de dar un espacio a esta área con el fin de apoyar a la citogenética. Para ello se dio inicio con el banco de DNA, ya que la obtención de DNA es la base de las técnicas de biología molecular.

El objetivo general de esta tesis es elaborar un banco de DNA de pacientes con anomalías de la diferenciación sexual en el Servicio de Genética del hospital general de México SSA. Los objetivos particulares son los siguientes:

- 1.- Complementar el trabajo experimental con una revisión bibliográfica sobre el proceso normal de la diferenciación sexual, así como de los padecimientos que se incluyen en este banco de DNA.
- 2.- Estandarizar la técnica de extracción de DNA a partir de sangre periférica.
- 3.- Realizar un análisis cuantitativo y cualitativo de las muestras de DNA obtenidas.
- 4.- Emplear el DNA obtenido en técnicas de biología molecular para fines tanto inmediatos como a largo plazo.
- 5.- Dar inicio a un banco de DNA para posteriormente incluir otro tipo de enfermedades.

II. MARCO TEORICO

II.1 GENETICA MOLECULAR

Hasta mediados del siglo XX, el estudio de las enfermedades hereditarias estaba basado en la genética clásica, la cual se concretaba a analizar a los individuos afectados mediante su historia clínica y familiar, el examen físico, algunos estudios de laboratorio y el análisis del árbol genealógico. Para los genetistas clásicos la unidad fundamental es un gen indivisible y abstracto, aunque el estudio detallado de su naturaleza e identidad física no es esencial. De aquí que sus teorías de los mecanismos de herencia y sus predicciones experimentales no dependan del conocimiento de las estructuras a nivel submicroscópico o molecular.(9)

En los años cincuentas, gracias a los grandes avances tanto en física como en química, fue posible estudiar a las moléculas biológicas por técnicas tales como la cristalografía de rayos X y el análisis cromatográfico de proteínas. Con el empleo de estas nuevas técnicas, en 1953, Watson y Crick determinaron la estructura de la molécula del DNA, lo cual permitió además explicar su duplicación. Con este hecho se inició la biología molecular.(3) Para ésta la unidad fundamental es una molécula química concreta, los nucleótidos del DNA, quedando el gen relegado a una unidad secundaria, que comprende cientos o miles de nucleótidos.(8)

El estudio de los cromosomas a nivel del DNA provee una nueva perspectiva en la expresión del gen y puede permitir una correlación entre fenotipo y genotipo.(10)

La biología molecular echa mano de métodos y herramientas empleados en otras disciplinas, como son los bioquímicos, fisicoquímicos, difracción de rayos X, microscopía electrónica, además de tener sus propias herramientas. La finalidad de esta área es: 1) Explicar los mecanismos por los cuales cambia la información genética y se hace posible la

evolución de los seres vivos, 2) explicar los mecanismos de regulación de la expresión genética, 3) decodificar toda la información contenida en el DNA, y 4) determinar la organización y dinámica molecular de los genomas.(11)

El campo de la biología molecular no puede estar aislado, sino que requiere del trabajo conjunto con el servicio de citogenética y con el área clínica. (12)

En la década de los setentas hubo una revolución en la biología molecular debida principalmente a la aparición de los métodos de DNA recombinante. Estos métodos han llevado al aislamiento y caracterización de los genes de cualquier organismo y a la determinación de secuencias de DNA y de cualquier secuencia codificante de proteínas. También ha sido posible el seguimiento de genes a través de familias y de cambios evolutivos. La habilidad para aislar y analizar genes humanos ha tenido un efecto más profundo en el campo de la genética humana que en otras áreas de la biología, permitiendo el entendimiento de muchas enfermedades hereditarias a nivel molecular.(13)

Las herramientas básicas que se utilizan en la genética molecular son las enzimas de restricción y las sondas. Tanto el DNA como las enzimas y las sondas pueden utilizarse en diversas técnicas como son la hibridación tipo Southern, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), elaboración de bibliotecas genómicas o cromosómicas, genética inversa, ligamiento genético, entre otras.

Existen dos categorías de **mapas genéticos**:(14)

1) **Mapas físicos**, basados en el DNA que conforma cada cromosoma. Incluyen mapas de restricción y clonas ordenadas de una genoteca. Una nucleasa de restricción en particular cortará cualquier molécula de DNA, originándose una serie de fragmentos específicos denominados fragmentos de restricción. Comparando los tamaños de los fragmentos de restricción producidos de una región genética determinada después del tratamiento con una combinación de diversas nucleasas de restricción, puede construirse un mapa de restricción de esa región, mostrando la localización de cada sitio de corte (o sitio de restricción) en relación a sus sitios de restricción vecinos. Debido a que las diferentes enzimas de

restricción reconocen específicamente una pequeña secuencia de DNA, un mapa de restricción refleja el arreglo de secuencias de nucleótidos específicas en la región. Esto permite comparar diferentes regiones de DNA [comparando sus mapas de restricción] sin tener que determinar sus secuencias de nucleótidos. Los mapas de restricción también son importantes en la clonación del DNA, permitiendo la localización del gen de interés en un fragmento de restricción en particular.

2) **Mapas de ligamiento genético.** Se apoyan en la frecuencia de co-herencia de dos o más características que actúan como marcadores genéticos y que difieren en el padre y en la madre.(14) Cuanto más próximos estén dos marcadores en un mismo cromosoma parental, con menos frecuencia se separarán sus alelos al intercambiarse DNA entre los cromosomas homólogos durante la meiosis. Así, para precisar la distancia que media entre un gen de particular interés y un marcador, se correlaciona el patrón de herencia de sus alelos. Si en una familia afectada los individuos que desarrollan la enfermedad heredan casi siempre la misma versión del marcador, el gen mutante y el marcador se encontrarán en el mismo cromosoma y muy próximos. Se dice entonces que el marcador y el gen afectado están ligados.(15) Para hacer un mapa de ligamiento se requiere estudiar a múltiples miembros de una familia, así como tomar en cuenta más de un marcador. Estos marcadores deben estar estrechamente ligados para dar resultados confiables.(16)

El **análisis por ligamiento** constituye una herramienta muy importante para detectar padecimientos genéticos en los cuales no ha sido posible identificar al gen responsable (15). Se basa en la identificación de marcadores cercanos al gen afectado y en la frecuencia de co-herencia de dos o más de éstos, cada uno diferente en la madre y el padre, y con un sitio específico en el cromosoma. Tradicionalmente, estos marcadores eran genes cuya expresión se detectaba por medio de sus efectos. Recientemente ha sido posible utilizar, como marcadores genéticos, pequeñas secuencias de DNA que contienen un sitio de corte de nucleasas de restricción y que difieren entre los individuos; esta secuencia es

particularmente útil para el mapeo genético porque origina fragmentos de restricción polimórficos de longitud variable (RFLP, por sus siglas en inglés) que pueden ser detectados por hibridación tipo Southern mediante una sonda complementaria. (14)

La clonación de secuencias de DNA es la inserción de un fragmento de DNA genómico en un vector [segmento de DNA que tiene capacidad de replicarse y conservarse dentro de una bacteria]. El DNA se somete a una digestión con endonucleasas de restricción, obteniéndose varios fragmentos. Por otro lado, se tiene un vector que contiene un gen con resistencia a un medicamento, dicho vector también se somete a una digestión con endonucleasas. En seguida, por acción de la ligasa, se efectúa la unión entre uno de los fragmentos del DNA genómico y el vector, obteniéndose la clona [DNA genómico de 1 a 40 Kb más el vector], la cual se introduce al huésped apropiado, que generalmente es una bacteria [*E. coli*]. Se denomina inserto al DNA clonado que se ha unido al vector y que se replica con la bacteria (13).

La tecnología de DNA recombinante permite el aislamiento rutinario y el análisis de genes.

Una biblioteca genómica contiene todas las secuencias del genoma de un organismo en particular, incluyendo tanto a las que codifican como a las que no lo hacen (10).

Una vez extraído el DNA, se digiere parcialmente con enzimas de restricción, obteniéndose fragmentos variables. Estos son clonados en un vector, de tal forma que suficientes clonas son generadas para que sea altamente probable que todas las secuencias estén representadas varias veces (13).

De esta manera se generarán millones de colonias diferentes de células transformadas. Cada una de estas colonias va a estar formada por una clona derivada de una sola célula ancestral, por lo que contiene un plásmido recombinante con la misma secuencia de DNA genómico insertada. Así cada plásmido contiene una clona genómica de DNA, mientras que toda la colección de plásmidos conforma una biblioteca de DNA genómico (14).

También es posible construir bibliotecas cromosoma-específicas, utilizando como fuente de inserción cromosomas separados físicamente o líneas celulares híbridas que contienen un solo cromosoma humano. La clonación de bibliotecas representativas de cada cromosoma humano es de gran importancia para la investigación de rearrreglos específicos de cromosomas asociados con desórdenes genéticos y con neoplasias (10).

Ambos tipos de clonas tienen usos en genética humana, muchos de los cuales incluyen el estudio del DNA humano y la elaboración de sus mapas de restricción. (13)

Cuando se pretende localizar un gen cuyo producto se desconoce, se emplea la llamada **genética inversa**. Esta pretende conocer la región aproximada del cromosoma en la que se encuentra el gen, a pesar de que se desconozca la función del mismo. La técnica consta de los siguientes pasos:(17)

- 1) Construcción de un mapa de la región relevante del genoma que contenga al menos tres marcadores: el gen blanco y otros dos marcadores que lo estén flanqueando.
- 2) Caminata cromosómica para clonar todo el DNA que se encuentra en el intervalo entre los marcadores.
- 3) Localización de genes en el DNA clonado.
- 4) Probar, por correlación, los genes candidatos con el gen blanco.
- 5) Realizar pruebas de identidad entre el gen candidato y el gen blanco.

Esta técnica ha probado su utilidad en la identificación de los genes implicados en varias enfermedades genéticas como la distrofia muscular tipo Duchenne y tipo Becker, la enfermedad granulomatosa crónica, el retinoblastoma, la fibrosis quística, y la neurifibromatosis tipo I, entre otras. (18)

Hay una gran variedad de **técnicas para detectar mutaciones** que se asocian a desórdenes genéticos. Estas mutaciones pueden ser *de novo* o bien haber sido heredadas durante varias generaciones. Una de las más empleadas es la técnica del oligonucleótido alelo-específico (ASO). Esta permite identificar la mutación empleando para ello una sonda específica.(19)

La hibridación tipo Southern (20) se emplea para identificar secuencias específicas de DNA, para las cuales se cuenta con sondas. A grandes rasgos, esta técnica consiste en lo siguiente: el DNA aislado se digiere con enzimas de restricción, obteniéndose diferentes fragmentos de DNA. Los fragmentos son separados, de acuerdo a su tamaño, por electroforesis en gel de agarosa. Para que el DNA esté accesible a la sonda, se hace una réplica del gel, transfiriéndolo a una hoja de nitrocelulosa o membrana de nylon. Bajo condiciones de hibridación, se incuba el papel con una solución que contiene a la sonda marcada (esta sonda es una secuencia conocida de DNA marcada radiactivamente o con marcas fluorescentes). Posteriormente, se hace un lavado para eliminar la marca inespecífica. Por autorradiografía, se detecta la secuencia complementaria a la sonda de DNA (14)(Fig. 1).

La técnica de PCR amplifica de forma exponencial el DNA de una región seleccionada del genoma más de un millón de veces. Es un método extremadamente sensible, que puede detectar a una sola copia de una secuencia de DNA en una muestra. Consiste en lo siguiente: el DNA aislado se calienta para separar la doble cadena, y la muestra se enfría en presencia de un exceso de dos oligonucleótidos [cada uno de 15 a 20 nucleótidos de largo] que han sido sintetizados químicamente para aparear secuencias separadas por X nucleótidos [donde X generalmente comprende entre 50 y 2000pb]. Los dos oligonucleótidos funcionan como cebadores específicos para la síntesis de DNA *in vitro*, la cual es catalizada por una DNA polimerasa, y ellos determinan los extremos del fragmento final de DNA que se obtiene. Todo lo anterior corresponde a un ciclo, cada uno duplica la cantidad de DNA sintetizada en el ciclo anterior.(14) De esta manera, al final de 20 ciclos la amplificación es de aproximadamente un millón de veces [2^{20}] (21)(Fig. 2).

Este método ideado por Kary Mullis(22) a mediados de los ochentas, fue originalmente aplicado al diagnóstico prenatal de anemia de células falciformes(23). Sin

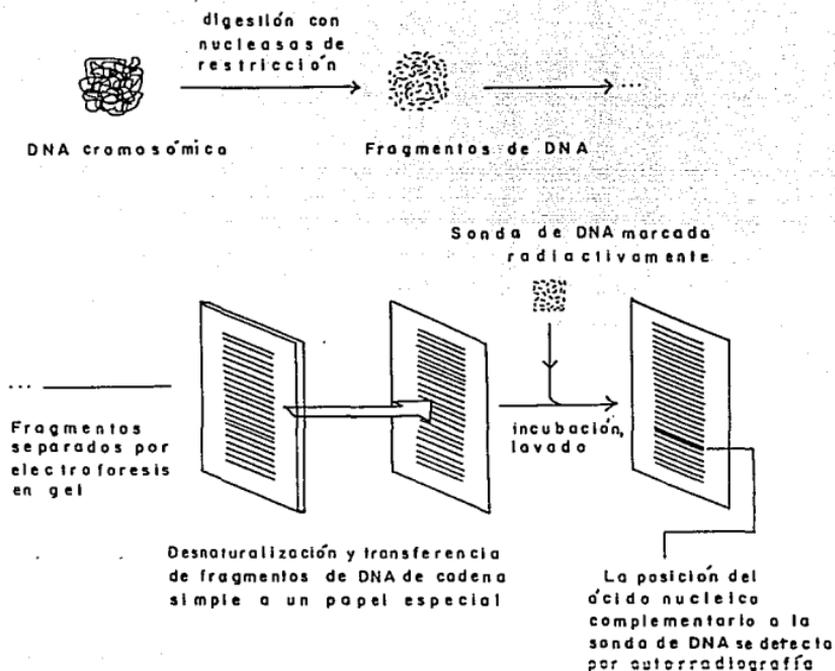


Figura 1. Hibridación tipo Southern (14)

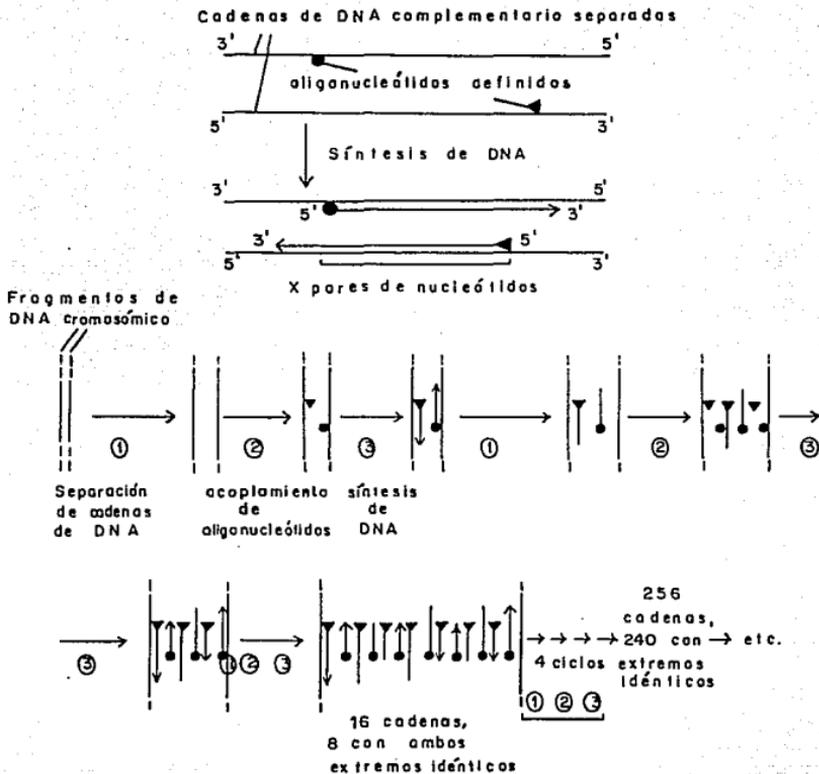


Figura 2. Reacción en cadena de la Polimerasa PCR (14).

embargo, en los últimos años, las aplicaciones de esta técnica se han diversificado de tal forma que abarca una gran variedad de muestras biológicas [sangre, cabello, semen, tejido incluido en parafina, etc.] así como distintas disciplinas del conocimiento [genética, inmunología, virología, biología evolutiva, medicina forense, etc.] (24,25).

II.2 BANCO DE DNA

Para todas las técnicas de biología molecular se parte de un banco de DNA, por lo que es importante establecer qué es, cómo se elabora y cómo se maneja.

¿Qué es un banco de DNA?

Es una colección de muestras de DNA de pacientes y/o familiares, que permite realizar estudios moleculares prospectivos y retrospectivos.

Propósito de un banco de DNA

Análisis del DNA en familias afectadas por padecimientos genéticos para fines de confirmación de diagnóstico a nivel molecular, diagnóstico prenatal, diagnóstico presintomático y detección de portadores.

Además el banco de DNA constituye un recurso invaluable para la investigación a nivel molecular de los desórdenes genéticos. (26)

¿Cuáles desórdenes comprende?

La mayoría de los desórdenes para los cuales se realiza un banco de DNA son de tipo monogénico, es decir, que involucran a un solo gen. Algunos de éstos son: fibrosis quística, Corea de Huntington, distrofia miotónica, esclerosis tuberosa, distrofia muscular Duchenne/Becker, inmunodeficiencias ligadas al X y hemofilia A y B. (26)

Además puede incluirse cualquier padecimiento genético no monogénico y otras enfermedades para las cuales puedan aplicarse alguno de los propósitos antes mencionados.

Tal sería el caso de leucemias, diabetes, artritis reumatoide, etc.

¿De qué miembros de la familia debe conservarse DNA?

Esto depende del tipo de padecimiento en estudio ya que en algunos casos se requiere DNA de los familiares más cercanos, como es el caso de las enfermedades con patrón de herencia mendeliano por lo que deben incluirse las siguientes muestras: padres, hermanos e hijos en caso de haberlos. En estos casos es necesario elaborar un banco de DNA de la familia. Mientras que en otros únicamente se requiere la muestra del paciente, como en el síndrome de Turner.

En todos los bancos de DNA es necesario incluir muestras de DNA de controles sanos femeninos y masculinos.

Tipo de muestra

Ordinariamente la sangre venosa es la muestra más utilizada y más conveniente debido a su fácil obtención y al buen rendimiento que de ella se alcanza.

Otros tipos de muestras que pueden emplearse son los cultivos de fibroblastos y médula ósea. Además, se ha visto en necropsias que el hígado es una fuente rica de DNA cuando está fresco aunque se autolisa rápidamente. Otra opción es utilizar el bazo que no se autolisa tan rápido, pero no es tan buena fuente de DNA. (26)

Con el surgimiento de la técnica de PCR se ha incrementado la variabilidad en el tipo de muestra además de que ha disminuido la cantidad requerida gracias a su alta sensibilidad. Algunas de las muestras que se pueden utilizar son: células de la mucosa bucal, gotas secas de sangre, y cabellos.(21)

Extracción de DNA

Esta se realiza a partir de 20ml, de sangre, siguiendo la técnica modificada de la Dra. Gorodezky(27), la cual se analizará detalladamente más adelante. [Materiales y Métodos]

Identificación de la muestra

Se debe asignar una clave con un número progresivo al microtubo que contiene a la muestra.

Simultáneamente esta clave y número deben incluirse en un registro ya sea manual o por computadora donde además se deben anexar los siguientes datos: (26)

- Nombre completo
- Fecha de nacimiento
- Dirección completa
- Fecha de toma de muestra
- Institución de procedencia
- Identificación familiar
- Datos clínicos
- Estudios realizados: cariotipo, biopsias, ultrasonidos, etc.

Servicio-investigación

Es importante que el banco tenga un uso práctico inmediato además de los fines para la investigación a largo plazo. El uso práctico incluye cualquiera de los propósitos establecidos previamente. En el área de la investigación los estudios están encaminados hacia un entendimiento de la etiología y del desarrollo de la enfermedad, así como a una probable aplicación práctica a largo plazo.

II.3 DIFERENCIACION SEXUAL NORMAL Y PATOLÓGICA HUMANA

La diferenciación sexual puede dividirse en tres etapas consecutivas: cromosómica, gonadal y fenotípica.(28)

La diferenciación cromosómica inicia desde el momento de la fertilización cuando el espermatozoide aporta un cromosoma X ó Y y el óvulo un cromosoma X iniciándose el

dimorfismo sexual característico de los mamíferos. De esta forma las hembras poseen dos cromosomas X y los machos un cromosoma X y uno Y normalmente, siendo el cromosoma Y la principal señal determinante del sexo.(28)

II.3.1 DIFERENCIACION CROMOSOMICA

CROMOSOMA Y

El tamaño del cromosoma Y es pequeño, constituye aproximadamente 2% de la longitud total del genoma haploide y contiene $4-6 \times 10^7$ pares de nucleótidos del DNA.(29) Presenta dos regiones, la primera de ellas es heterocromática y se ubica en la región de los brazos largos (esta región distal no se transcribe); la segunda corresponde a una región eucromática, que abarca todo el brazo corto y la región proximal del brazo largo.(8) La porción eucromática está en el orden de 2×10^7 pares de bases(29)(Fig. 3).

El cromosoma Y posee una pequeña cantidad de genes activos, algunos de los cuales se relacionan con el desarrollo somático. Entre éstos se encuentran los que corresponden a la maduración esquelética, crecimiento corporal, prevención de los estigmas del síndrome de Turner, desarrollo dental y espermatogénesis.(8)

Con los estudios realizados por Jacobs y Strong en 1959 se determinó el papel crítico del cromosoma Y en la inducción de la diferenciación testicular independientemente del número de cromosomas X. A partir de entonces se inició la búsqueda del gen responsable de esta diferenciación. En 1966 se determinó que dicho gen se encuentra en el brazo corto de Y(30).

Esto significa que el cromosoma Y codifica para un factor dominante indispensable para la masculinización. En presencia de dicho factor, la gónada embrionaria indiferenciada se desarrolla como un testículo en vez de ovario. La subsecuente diferenciación sexual masculina es una consecuencia de los productos hormonales del testículo (31).

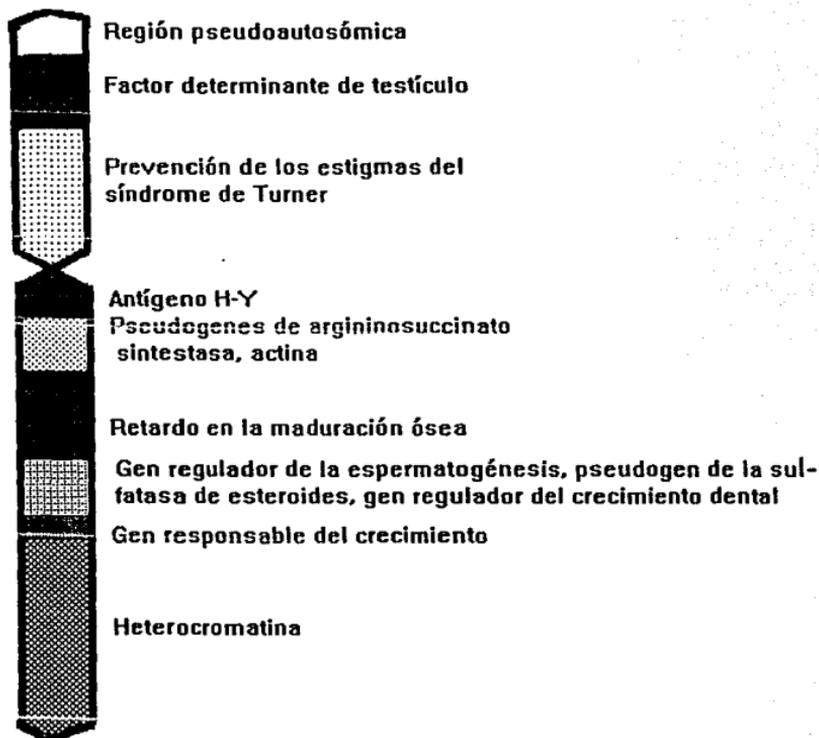


Figura 3. Genes asignados al cromosoma Y. [8]

Debido a la naturaleza incierta del material genético del Y implicado en la determinación sexual, éste fue denominado como TDF (factor determinante de testículo) en el humano y como Tdy en su homólogo murino. Debe entenderse, sin embargo, que no toda la información genética requerida para la formación testicular está contenida dentro de TDF/Tdy, sino que todo el proceso de determinación sexual está bajo el control de una ruta genética, en la cual probablemente la mayoría de los genes participantes son autosómicos o ligados al X.(17)

La primera hipótesis al respecto fue planteada por Watchel y cols. en 1975. En ésta se establecía que TDF corresponde a H-Y, un antígeno de histocompatibilidad masculino.(32) Esta hipótesis fue refutada al encontrarse ratones con testículos que carecían de H-Y.(30)

Con el fin de poder identificar y clonar a TDF se han revisado detalladamente mapas del cromosoma Y. Han sido construidos tres tipos de mapas: mapas de delección a partir del análisis genómico de individuos con reversión sexual, varones XX y mujeres XY; un mapa meiótico de la región pseudoautosómica compartida por ambos cromosomas X y Y; y un mapa de restricción de amplio rango que combina los dos primeros.(17)

En 1986, Vergnaud y cols.(33) estudiando a varones XX elaboraron un mapa del cromosoma Y en el que definieron siete intervalos.

Así, dos conclusiones pueden ser inferidas de los mapas: primero TDF se comporta como una entidad genética única y segundo TDF mapea en la posición distal del brazo corto del cromosoma Y, adyacente a la región pseudoautosómica.(17)

En 1987, Page y cols. (34) intentaron caracterizar a TDF mediante una vía que no presupone la naturaleza del gen o de sus productos, esto es, haciendo uso de la llamada "genética inversa" o, más descriptivamente definida como "clonación posicional". Consideraron posible clonar el gen TDF en base a la determinación precisa de su localización cromosómica. Para ello emplearon los genomas de dos individuos: un varón XX (LGL203) y una mujer XY (WHT1013).

El varón XX porta sólo un fragmento del cromosoma Y correspondiente a los intervalos 1A1 y 1A2 del mapa de Vergnaud. Por otro lado, la mujer XY presenta una delección de 160kb. comprendidas entre 1A1 y 1B. Con esto supusieron que la porción esencial de TDF reside en el intervalo 1A2, el cual mide 140Kb. Clonaron esta porción e identificaron en ella una secuencia de DNA que incluye a pDP1007 y codifica para una proteína, presumiblemente el factor determinante de testículo. Encontraron que esta proteína se conservaba en los mamíferos a lo largo de la evolución. Este gen fue denominado ZFY(34).

Además, Page y cols.(34) observaron que el inserto pDP1007 hibridiza fuertemente con un locus único en el cromosoma X del genoma femenino (ZFX). Postularon que el sexo se determina por el número total de ZFX y ZFY que se expresan: una dosis única es una determinante femenina, mientras que una dosis doble ó mayor es una determinante masculina, asumiendo que el locus ZFX está sujeto a la inactivación.

Los genes ZFX y ZFY pertenecen a una familia de genes con características similares. Todos los miembros de ésta poseen trozo dominios de Zn, el cual es uno de los más altamente conservados en secuencias específicas de proteínas de unión a DNA en eucariontes, y es semejante a muchos factores de transcripción(35).

Sin embargo, investigaciones posteriores aportaron datos que eliminaron la hipótesis de que ZFY era TDF.

Un hecho excluyente fue que en los marsupiales, las secuencias asociadas a ZFY no se localizan en los cromosomas X o Y sino en autosomas. Esto puede significar dos cosas: que el mecanismo de determinación sexual sea diferente en marsupiales y euterios, o bien, que ambos mecanismos sean idénticos y que entonces ZFY no sea TDF (36).

El patrón de expresión generalizado de ZFY también fue inconsistente con lo esperado para el gen TDF(35).

Por otro lado, Koopman y cols.(37) encontraron que en los ratones normales la expresión de Zfy-1 y Zfy-2 está determinada por las células germinales, las cuales no se requieren para el desarrollo masculino. Además, en los ratones mutantes *We/We* el desarrollo testicular se da en ausencia de Zfy-1 y Zfy-2 detectables, por lo que estos genes no pueden ser considerados como candidatos para TDF/Tdy.

En 1988, Schneider-Gädicke y cols.(38) demostraron inequívocamente que el gen ZFX escapa al proceso de inactivación, eliminando con ello la hipótesis de que la determinación sexual era debida a un efecto de dosis. Para demostrar que ZFX no está sujeto a la inactivación, realizaron experimentos por la técnica de Northern. Encontraron que el nivel de transcripción de ZFX aumentaba con el número de cromosomas X presentes, sugiriendo que ZFX escapa a la inactivación. .

Palmer y cols(39), reportaron cuatro varones XX que poseían secuencias del Y que no incluían a ZFY. Se propuso entonces que estos son varones debido a que en su genoma poseen TDF. De acuerdo a sus resultados, TDF se localiza próximo a la región pseudoautosómica a 60 kb.

Todas las evidencias anteriores eliminaron a ZFY como TDF. Sin embargo, es probable que este gen tenga una función masculina específica en la espermatogénesis, ya que se ha conservado selectivamente a lo largo de la evolución(35).

Sinclair y cols.(40), profundizaron en el trabajo de Palmer y definieron una región de 35 kb de secuencias específicas inmediatamente adyacente a la región pseudoautosómica donde debe encontrarse TDF. La técnica empleada para encontrar esta región fue la caminata cromosómica.

Para identificar TDF en la región de 35 kb, el DNA de esta región fue digerido empleando enzimas de restricción obteniéndose 50 fragmentos de 0.5-1 kb. Cada uno de éstos fue marcado radiactivamente para ser usado como sonda en transferencia tipo Southern. Se corrieron muestras de DNA de humanos (hombres y mujeres), murino (machos y hembras), bovino e híbridos de hámster, junto con muestras de los cromosomas

X y Y. Se encontró que sólo un fragmento era único en el cromosoma Y y se conservaba en el genoma de los murinos y bovinos. Esta banda fue la pY 53.3, la cual fue denominada SRY [región determinante del sexo en el cromosoma Y](40).

La secuencia de SRY contiene 669 pb de un marco abierto de lectura. La proteína supuestamente codificada por éste, tiene una sorprendente similitud con un motivo conservado en varias proteínas no histónicas relacionadas con HMG1 y HMG2 (grupo de alta movilidad)(40).

Gubbay y cols. (37) demostraron que el homólogo murino Sry está presente en Sxr', la porción mínima del cromosoma Y en ratones que se sabe es requerida para la determinación sexual. Así mismo, definieron una delección de Sry en una hembra mutante para Tdy.

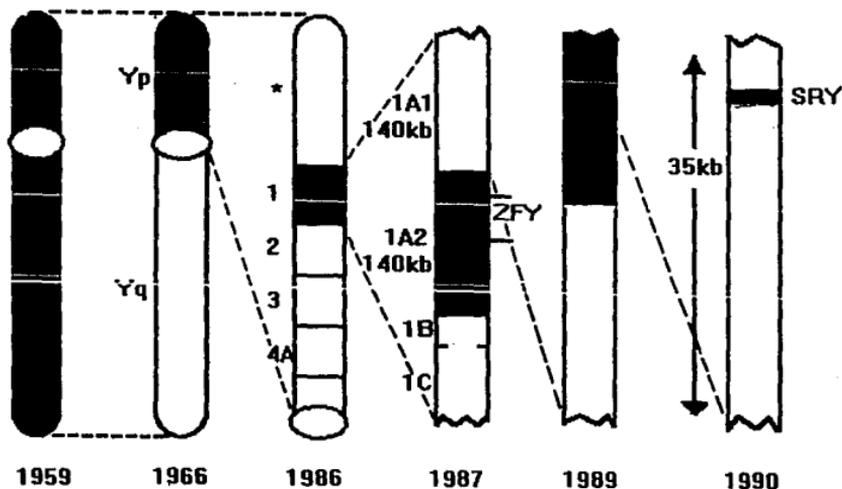
La expresión fetal de Sry también ha sido estudiada detalladamente en embriones de ratones amplificando el RNA de las crestas genitales por PCR. Estos estudios muestran que los transcritos de SRY/Sry están restringidos a la porción somática de dicha cresta uno a dos días antes del primer signo de formación testicular (41).

Koopman y cols. (42) plantearon que la mejor forma de probar la función de SRY/Sry, es introducirlo en embriones XX y observar si se desarrollan como machos. El Sry contenido en un fragmento genómico de 14Kb (f741) da origen a desarrollo testicular normal en ratones transgénicos cromosómicamente femeninos, tanto en la etapa embrionaria como adulta. En dos casos, se observó testículo en embriones cuya cromatina sexual indicó una constitución cromosómica XX (la constitución cromosómica fue asignada por tinción de la cromatina sexual de células amnióticas). Análisis por hibridación tipo Southern, mostraron que estos dos machos carecían de secuencias Zfy y que eran transgénicos con muchas copias de Sry. Observaron que la formación del cordón testicular (primer signo de desarrollo testicular a partir de las crestas genitales) era normal. Concluyeron que no todos los transgénicos XX muestran reversión sexual debido al mosaicismo o por efecto de posición en la expresión de Sry.

Dedujeron, en base a sus resultados, que Sry es el único gen ligado al Y requerido para dar origen al desarrollo masculino, por lo que propusieron que Sry es Tdy. Sry actúa por un periodo corto para iniciar el desarrollo testicular, esto lo debe hacer por interacción con otros genes, algunos de los cuales estarán implicadas en la regulación de Sry, mientras que otros serán blanco de Sry en la cascada de la diferenciación testicular. Todos estos genes deben mapearse en cualquier otro sitio del genoma porque como ellos mostraron, Sry es el único gen ligado a Y requerido para el desarrollo masculino en ratones. Mutaciones en algunos de estos genes pueden explicar casos de desarrollo masculino en individuos XX que carecen de SRY, de mujeres XY donde SRY está intacto y de hermafroditas verdaderos en quienes no se ha detectado SRY (42)(Fig. 4).

Berta y cols.(43) realizaron estudios en mujeres XY con reversión sexual. En una de ellas se encontró una mutación *de novo*. Esta provocó un cambio conservado dentro del supuesto motivo de unión a DNA del SRY. La asociación de una mutación *de novo* con un nuevo fenotipo proporciona evidencia de que fenotipo y mutación están relacionados, por lo tanto SRY se requiere para la diferenciación sexual masculina. Otra mujer XY con reversión sexual presentó una mutación presente también en su padre. Hay varias posibles explicaciones para esta variante: 1) la reversión sexual es debida a otros factores genéticos ó ambientales; 2) podría pertenecer a una familia de genes ligados a X o a autosomas que predisponen a la reversión sexual; 3) finalmente podría causar directamente reversión de sexo y que el padre sea un mosaico para secuencia silvestre y la variante. Ambas mutaciones se encontraron en las secuencias relacionadas con HMG, por lo que potencialmente pueden afectar la supuesta capacidad de unión de la proteína al DNA.

Vincent R. Harley y cols.(44) realizaron estudios sobre la actividad de unión a DNA de SRY recombinante de varones normales y mujeres XY. La secuencia de SRY/Sry sugiere que pueda codificar para una proteína de unión al DNA, siendo esto consistente con un papel como factor de transcripción. La proteína producto de SRY/Sry contiene un motivo



*región pseudoautosómica

Figura 4. Búsqueda del factor determinante de testículo desde 1959, cuando se demostró que el cromosoma Y era el determinante masculino en ratones y humanos, hasta la identificación en 1990 de la región determinante de sexo [SRY en humanos, Sry en ratones][30].

que se encuentra en varias proteínas que se sabe o sospecha tienen actividad de unión a DNA. Al motivo se le denomina caja HMG. Aparentemente SRY no tiene afinidad por DNA de una sola cadena.

En cerca de 15% de las mujeres XY se han encontrado mutaciones en SRY, localizándose todas éstas dentro de la región que codifica para la caja HMG. La mayoría de estas mutaciones son *de novo*. Se realizaron estudios con las secuencias de SRY provenientes de 6 mujeres XY y se observó una disminución en la capacidad de unión a DNA. Los resultados coinciden en que la actividad reducida de unión al DNA contribuye a la reversión sexual, y que la caja HMG se requiere para la unión al DNA, por lo que esta actividad es necesaria para el desarrollo testicular(44).

Además observaron que SRY se une específicamente a la secuencia de DNA AACAAAG, pudiendo ser éste el sitio óptimo de unión de SRY(44).

Por otra parte el gen SRY de la mayoría de las mujeres XY estudiadas parecía normal. Es posible que éstas tengan mutación(es) en SRY que no haya(n) podido ser detectada(s) por la técnica empleada, ya sea porque la mutación no haya sido identificada en una banda ó porque no se haya encontrado en la región analizada. Alternativamente estos individuos pueden tener mutaciones en otra parte de la ruta determinante de sexo(44).

Tomando en cuenta la información obtenida a partir de estudios realizados tanto en humanos como en ratones, es muy probable que SRY sea TDF(44) .

CROMOSOMA X

El primer reporte sobre la existencia del cromosoma X data de 1891, cuando Henking describió "un elemento cromatínico peculiar" que en la segunda división del espermatocito se retrasaba con respecto a los otros cromosomas durante la anafase. Debido a lo incierto de su naturaleza, lo llamó "X". Este fue estudiado por otros investigadores tanto en insectos como en diversos animales, estableciéndose así su naturaleza. Fue McClung quien en 1902 propuso su papel en la determinación sexual (2).

La participación del cromosoma X en la determinación gonadal y gametogénica en ambos sexos es fundamental(28).

El proceso de inactivación del cromosoma X no ha podido ser explicado completamente, pero se cree que resulta de una inactivación controlada en *cis* de la mayoría de los genes a lo largo del cromosoma. Esto implica que únicamente serán inactivados los genes del mismo cromosoma, sin afectar a los otros genes del otro cromosoma X (45).

Hay dos formas de inactivación del X. La primera se realiza en forma no al azar inactivándose preferentemente el cromosoma X paterno. Esto se lleva a cabo en tejidos no embrionarios (46).

El otro tipo de inactivación sigue un patrón al azar, y ocurre en las células de masa interior, las cuales formarán las células somáticas adultas de la mujer. Este segundo tipo de inactivación inicia en la embriogénesis temprana (gástrula)(46).

Es un hecho que las células germinales siguen un ciclo de inactivación y reactivación. Para que se lleve a cabo la meiosis es necesario que las células germinales se reactiven, pues se requiere la presencia de los dos cromosomas X activos para el intercambio de información entre ellos(46).

El control de la inactivación del X puede enfocarse bajo 4 aspectos principales(47).

- 1) La iniciación de la inactivación.
- 2) La propagación del proceso de inactivación a lo largo del cromosoma.
- 3) El mantenimiento del estado activo ó inactivo a lo largo de la vida del animal.
- 4) La reactivación del estado inactivo del cromosoma X en el oocito.

Hay evidencias que sugieren la existencia de un locus específico requerido en *cis* para que se lleve a cabo la inactivación. Este es el centro de inactivación del X (XIC)(48).

Pruebas sobre la existencia del XIC surgieron a partir de trabajos realizados sobre translocaciones entre cromosomas X y autosómicos, ya que únicamente un segmento era inactivado. En determinado momento del desarrollo, un XIC en cada célula recibe una señal que bloquea su función, mientras que el otro inicia su proceso de inactivación(49).

En el humano, el XIC ha sido mapeado en la banda Xq13. Brown y cols.(50) han identificado, dentro de esta región, dos marcadores. Uno de ellos es el DXS128; el otro ha resultado especialmente interesante, y corresponde al llamado XIST (transcritos específicos del X inactivo) que muestra un patrón especial, transcribiéndose activamente en el cromosoma X inactivo, y siendo inactivo en el cromosoma X activo.

Existen algunos modelos acerca de la función principal de XIST en la inactivación del cromosoma X. Uno de ellos propone que el producto de XIST podría ser una molécula que actúa *in cis* para causar inactivación. El segundo establece que XIST podría ser el sitio de XIC, el cual actúa conjuntamente con otro producto diferente para causar inactivación. Un tercero establece que XIST actúa sobre XIC, de modo que XIC produzca ó interactúe con molécula(s) inactivadora(s). Es posible, sin embargo, que XIST no sea el centro principal sobre el cual actúe la señal, sino que una molécula externa regulada por el desarrollo interactúe con XIC, causando la inactivación del X y como consecuencia de ésto se expresa XIST(48).

El proceso que controla la inactivación debe ser capaz de excluir a ciertos genes del cromosoma, al mismo tiempo que mantenga rigurosamente estable la inactivación de otros. Hasta la fecha son varios los genes que se ha descubierto escapan al proceso inactivador de X; como son MIC2 y Xg (los cuales codifican para proteínas de superficie), el gen de la esteroide sulfatasa, ZFX,, A159T y el más recientemente descubierto RPS4X. Debe mencionarse aquí mismo a XIST que escapa también a la inactivación, aunque no se expresa en el cromosoma X activo (45,51)[Fig. 5].

En el DNA de los vertebrados, una fracción de las citosinas en las secuencias C-G están metiladas debido a la existencia de una enzima metilante (metilasa). Una vez establecido el patrón de metilación del DNA, cada sitio de metilación es heredado a la progenie. Un gen inactivo que contiene DNA metilado, usualmente pierde muchos de sus grupos metilo después de que el gen se ha activado(14). Hay evidencia que el proceso de

Genes sujetos a la inactivación

Genes que escapan a la inactivación

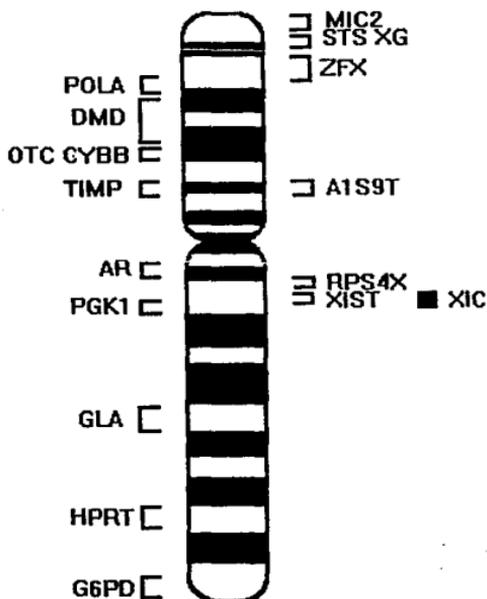


Figura 5. Mapa del cromosoma X humano describiendo sus genes y su estado de inactivación (51).

metilación tiene un papel en la inactivación, pero parece que está más involucrado en mantener la inactivación que en la propagación misma. Se ha observado que los genes en el X inactivo tienden a estar altamente metilados en el extremo 5' de la región promotora(49). Se ha visto que al tratar células con el agente desmetilante 5-azacitidina, se ocasiona una desrepresión parcial del X inactivo. Es decir, algunos genes se reactivan al haber una desmetilación, mientras que otros permanecen inactivos(47).

II.3.2 DIFERENCIACION GONADAL

Funcional y anatómicamente, la gónada está constituida por dos partes(52):

- 1) Una línea celular germinal, la cual tiene membranas que impiden el paso indiscriminado de sustancias del plasma y fluido intersticial. En el ovario, lo que rodea a las células germinales es el folículo, mientras que en el testículo son los túbulos seminíferos.
- 2) Células endócrinas que rodean a las células germinales. Las primeras secretan hormonas esteroides sexuales, hormonas proteicas y otros productos necesarios para el desarrollo de las células germinales. Hay dos tipos principales de células endócrinas en la gónada. Unas de ellas se encuentran inmediatamente adyacentes a las células germinales y son llamadas células granulosa en el ovario y células de Sertoli en el testículo. Estas secretan principalmente estrógenos. Las otras se encuentran más distantes de las células germinales y están separadas de éstas por medio de una membrana; estas células se conocen como teca o células intersticiales en el ovario y células de Leydig en el testículo. Estas secretan principalmente andrógenos.

La diferenciación gonadal empieza a distinguirse alrededor de la 6a. a 7a. semana de vida intrauterina. La gónada indiferenciada se origina a partir de dos tipos de células: las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales(CGP)(53).

La gónada indiferenciada consiste de una cresta mesonéfrica primordial con varios componentes: epitelio celómico que es precursor de las células de Sertoli y granulosa, células estromáticas mesenquimatosas precursoras de la teca y las células de Leydig, y células germinales(52).

Aproximadamente en la 4a. semana de vida intrauterina las CGP migran desde el endodermo del Intestino hacia su destino final; si bien se desconoce el factor ó factores que las guían, es claro que las células somáticas ubicadas en la región de las crestas genitales emiten y/ó tienen señales específicas que las atraen a esta región urogenital. Inmediatamente inician un proceso de proliferación que ocurre simultáneamente con la proliferación de las células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico que bordea a esta región, dando lugar a la formación del blastema gonadal(28).

La gónada indiferenciada se puede diferenciar entonces en testículo ó en ovario. La transformación de gónada a testículo ocurre entre los 43 a 49 días, y está controlada por TDF. La diferenciación ovárica ocurre más tarde(54).

La diferenciación sexual normal se lleva a cabo mediante una cascada de eventos en donde cada paso es dependiente del anterior. Todo lo anterior da por resultado la diferenciación de las gónadas, de los genitales internos y externos y por tanto la asignación de caracteres sexuales secundarios(55).

Cuando las células germinativas llevan los cromosomas XY, inducen la diferenciación de la gónada a testículo. En la sexta semana de gestación empiezan a formarse los tubúlos espermatogénicos seguidos de una diferenciación de las células de Sertoli en la séptima semana y de las células de Leydig de la 8a. a la 9a. semana. En este momento el testículo ya es reconocible; las células germinales se encuentran dentro de la médula, mientras que la corteza, incluyendo sus células de Leydig, ha sufrido una regresión. Para esta diferenciación no se requiere de andrógenos ni de la influencia de ninguna otra hormona(52). El testículo realiza dos funciones primordiales(55).

1) Las células de Leydig producen la testosterona; ésta, de manera conjunta con el testículo, induce el desarrollo de los conductos de Wolff ó mesonéfricos.

2) Las células de Sertoli sintetizan una proteína, hormona antimülleriana (HAM), que junto con el testículo no permite la evolución de los conductos de Müller ó paramesonéfricos, los cuales involucionan.

Cuando las células germinales presentan un complemento cromosómico XX, inducen la diferenciación de la gónada a ovario. Las oogonias se originan a partir de las células primordiales. Estas entran a mitosis hasta la semana 20-24. Desde la semana 8-9 y hasta los seis meses después del nacimiento, algunas oogonias inician la meiosis (ocitos primarios) misma que queda suspendida en la primera profase hasta la maduración sexual del individuo. Desde el comienzo de la oogénesis se inicia un proceso de degeneración de los ocitos. Al mismo tiempo que se inicia la meiosis, el ovario primitivo empieza a sintetizar hormonas estrogénicas, las cuales pueden contribuir a su diferenciación más tarde(52).

II.3.3 DIFERENCIACION FENOTIPICA

La diferenciación fenotípica comienza alrededor de la octava semana de vida intrauterina, y como consecuencia de las diferencias anatómicas y funcionales de las gónadas empieza el desarrollo del fenotipo masculino ó femenino del embrión(53).

La diferenciación de los ductos genitales y de los genitales externos requiere de señales hormonales específicas de la gónada para producir el fenotipo masculino. Sin tales señales resultará el fenotipo femenino(53).

Durante la etapa sexual indiferenciada [3 a 7 semanas] se desarrollan dos ductos genitales en cada lado. En el hombre, en las semanas 9 y 10 el crecimiento y diferenciación de los conductos de Wolff, es inducido por la testosterona, originándose así el conducto deferente, el epidídimo, la vesícula seminal y el conducto eyaculador, finalizando esto en la semana 12(52). Los conductos de Müller sufren una regresión en las semanas 7 a 8, casi al mismo tiempo en que las células de Sertoli del testículo aparecen. Estas células producen

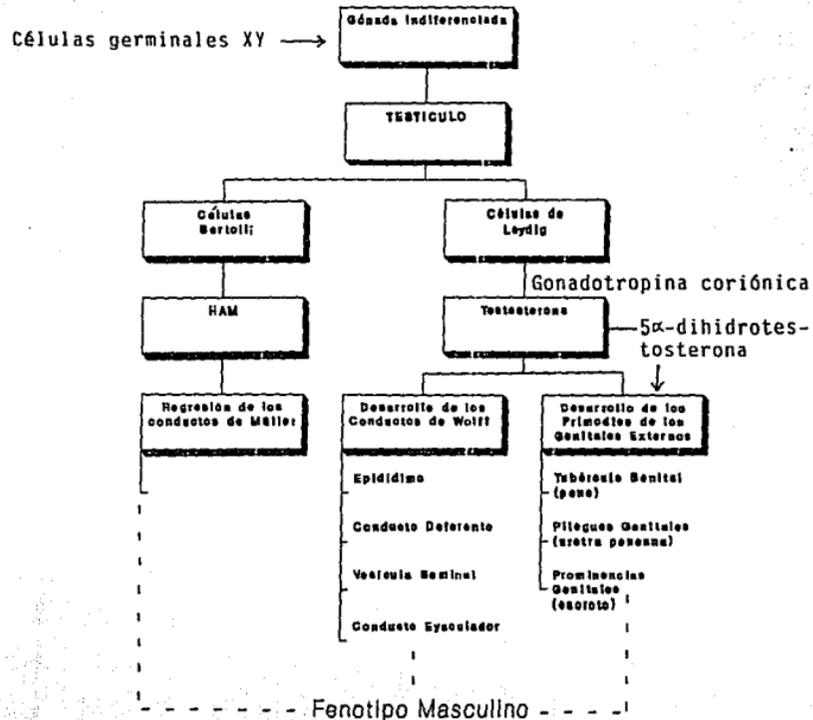
una glicoproteína, la hormona antimülleriana, la cual causa atrofia de los ductos müllerianos. Esta hormona también inicia el descenso de los testículos hacia el área inguinal (52).

Al mismo tiempo que se inicia el desarrollo de los conductos de Wolff, los genitales externos inician su diferenciación. Estos se derivan del tubérculo genital, prominencias genitales, pliegues genitales y seno urogenital. La testosterona debe ser secretada a la circulación fetal y subsecuentemente convertida a dihidrotestosterona dentro de estos tejidos para que ocurra esta diferenciación. Con la estimulación androgénica, el tubérculo genital crece y se transforma en el pene; las prominencias genitales se pliegan y fusionan constituyendo el escroto, los pliegues uretrales se agrandan y forman la uretra peneana y el cuerpo esponjoso, y el seno urogenital da origen a la glándula prostática (53,55)(Fig. 6).

En la mujer, los conductos de Müller se desarrollan debido a la ausencia de HAM. Posteriormente, las granulosa producen HAM, sin embargo, ésta ya no causa regresión de los conductos. Por lo tanto, éstos crecen y se diferencian en las trompas de Falopio en su parte superior, mientras que en la parte inferior forman el útero, cérvix y parte superior de la vagina(52). Los conductos de Wolff sufren una regresión, debido a que no hay estímulo de la testosterona(53). Todo este proceso no requiere de hormonas ováricas. Los genitales externos comienzan a diferenciarse en las semanas 9 y 10; éstos se desarrollan sin una influencia hormonal significativa. Los primordios de los genitales externos darán origen a otras estructuras: el tubérculo genital al clitoris, los pliegues genitales a los labios menores, las prominencias genitales a los labios mayores, y el seno urogenital a la porción inferior de la vagina(52)(Fig. 7).

Se puede concluir que la tendencia natural del embrión, desde el punto de vista de diferenciación sexual, es hacia la feminización ya que el proceso de masculinización requiere de un sistema inductor complejo con múltiples mecanismos de regulación(53).

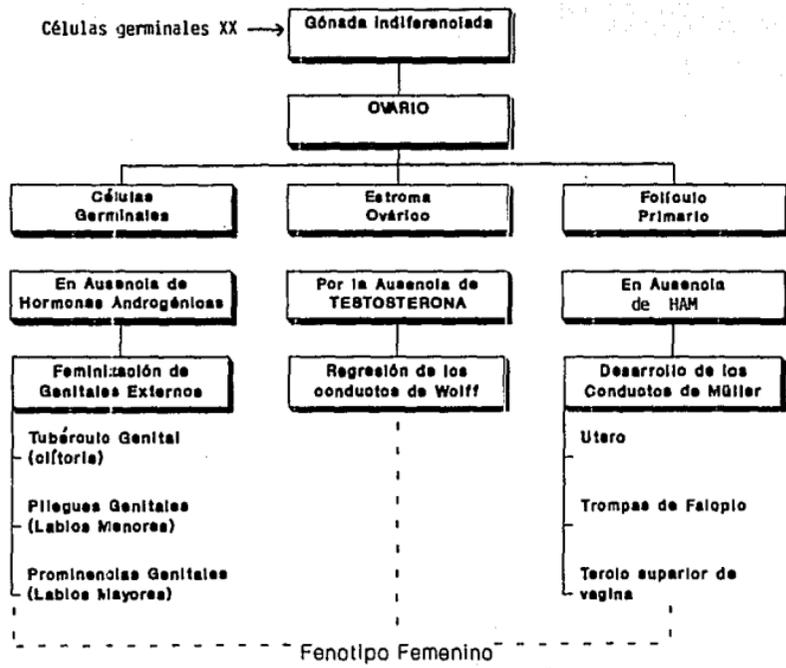
DIFERENCIACION SEXUAL MASCULINA



30

Figura 6. (8,55)

DIFERENCIACION SEXUAL FEMENINA



31

Figura 7. (8,55)

Defectos que ocurren a lo largo de la diferenciación sexual durante la vida embrionaria ocasionan alteraciones que corresponden a un conjunto de enfermedades específicas. Estas pueden presentarse a nivel cromosómico, como es el caso de los Síndromes de Turner y disgenesia gonadal mixta, o bien a nivel gonadal, en donde el sexo cromosómico y gonadal del individuo no corresponden, como el caso del hermafroditismo verdadero, de varones XX y de mujeres XY (28).

II.3.4 SINDROME DE TURNER

En 1938 Henry Turner (56) describió, por primera vez, un síndrome de infantilismo sexual, cuello alado congénito y *cubitus valgus* en siete pacientes femeninos cuyas edades fluctuaban entre 15 y 23 años.

Cabe mencionar que ya en 1930, Ulrich había descrito a pacientes con características similares. Sin embargo, no las relacionó con la ausencia de caracteres sexuales, ya que el grupo comprendía sólo a prepúberes(55).

En 1940, Albright y cols. y Varney y cols. encontraron niveles elevados en la excreción de gonadotropina en orina y muy bajos niveles de estrógeno en pacientes adolescentes y adultos afectados(55). Cuatro años más tarde, Wilkins y Fleischmann(57) describieron las gónadas de estas pacientes por primera vez. Observaron que en lugar de ovarios había cintillas bilaterales de tejido conectivo y ausencia de células germinales.

Polani y Wilkins en 1954 encontraron que las pacientes con síndrome de Turner eran cromatina X negativa, es decir, el corpúsculo de Barr estaba ausente(55).

Las bases cromosómicas del síndrome fueron establecidas en 1959 por Ford y cols.(58) cuando estudiaron a una paciente de 14 años. Estudios citogenéticos realizados en ella demostraron una constitución cromosómica 45,X.

En 1976 quedó establecido que los estigmas de Turner eran causados por la presencia de una sola copia del brazo corto del cromosoma X (59).

Se han seguido realizando estudios sobre el síndrome de Turner enfocándose principalmente a su etiología y a posibles tratamientos que permitan al paciente el desarrollo de caracteres sexuales secundarios.

FRECUENCIA

Este síndrome se presenta aproximadamente en 1 de 2500 recién nacidas vivas, considerando el fenotipo y todos los cariotipos posibles(28,55). En general no es hereditario, por lo que en mujeres que ya han tenido una hija con el síndrome, el riesgo de tener otra hija afectada, un aborto ó nacida muerta con ésta ó con otras anomalías cromosómicas, no se ve incrementado.

CONSTITUCION CROMOSOMICA

Existe variabilidad en la constitución cromosómica de las pacientes. Para cada una de las cuales se reportan frecuencias diferentes: (55)

<u>GENOTIPO</u>	<u>FRECUENCIA%</u>
45, X	55
45, X/46, XX	10
45, X/46, XX/47, XXX	
45, X/47, XXX	
y otros.	
45, X/46, Xi(Xq)	20
46, X del(Xp)	5
46, Xr(X)	5
46, Xi(Yq)	5

Los mecanismos por los cuales pueden producirse los genotipos anteriores pueden ser (28):

1) La pérdida de un cromosoma sexual, puede ocurrir durante la meiosis I o II bien sea en el óvulo o en el espermatozoide. Por un lado, un óvulo portador únicamente de autosomas puede ser fecundado por un espermatozoide portador de un X, o bien un óvulo normal puede ser fecundado por un espermatozoide carente de cromosoma sexual; en ambos casos el resultado es un cigoto 45,X. En alrededor de 72% de los pacientes, el cromosoma X presente es de origen materno. Varios estudios apoyan lo anterior al reportar una relación poco mayor a 2:1 entre el Xmaterno y el Xpaterno (59,60,61).

2) En caso de mosaicismo, éste es debido a errores en mitosis postcigóticas, como una no disyunción mitótica o la pérdida de un cromosoma sexual por retraso en la anafase durante la primera división mitótica(61).

3) En caso de alteración estructural del cromosoma X. La proporción en cuanto al origen paterno o materno de estas alteraciones es similar(59).

MANIFESTACIONES CLINICAS

El síndrome de Turner comprende pacientes fenotípicamente femeninas, que tienen en común talla baja, infantilismo sexual, así como una gran variedad de anomalías somáticas asociadas(61).

En general los pacientes con síndrome de Turner presentan talla baja. En México, el promedio de estatura final es de 137.6 ± 5.8 cm. según estudio de Armendares y Salamanca(55). En otro estudio realizado en el Hospital General de México SSA, se reportó una estatura final de 1.32m(62). Esta talla final se ve afectada también por factores ambientales, además de los genéticos.

Los genitales externos son de tipo infantil, observándose vello púbico muy escaso, labios mayores hipopigmentados, labios menores casi imperceptibles y ligera hipertrofia del clítoris(55). El desarrollo de caracteres secundarios está ausente o muy disminuido. En

general, las pacientes presentan amenorrea primaria, si bien se han reportado algunos casos de pacientes que tienen menstruaciones espontáneas. Las glándulas mamarias están poco o nada desarrolladas, el vello axilar está ausente y no presentan ensanchamiento de caderas(61).

Internamente los ductos genitales son de carácter femenino pero inmaduros. Se encuentran largas fibras defectuosas de tejido conectivo, paralelas a las trompas de Falopio, que consisten en estroma fibroso similares a las encontradas en el estroma ovárico, aunque carecen de folículos primordiales. La matriz, la parte superior de la vagina y las trompas de falopio se encuentran poco desarrolladas(61).

ALTERACIONES SOMATICAS ASOCIADAS

Las características craneofaciales en el síndrome de Turner son una cara triangular, ptosis, epicanto bilateral, abatimiento de las comisuras labiales, micrognatia e implantación baja de los pabellones auriculares(61).

El cuello parece ser ancho y corto, con *pterygium* e implantación baja de cabello. El cuello alado es propio de edades mayores del lactante, ya que en el recién nacido se encuentra piel redundante(60).

Ordinariamente el pecho es ancho, en forma de escudo o tonel. La presencia de *cubitus valgus* es un signo característico, así como los nevos pigmentados(55).

Se han visto algunos desórdenes asociados con el tracto genitourinario, anomalías esqueléticas, enfermedades autoinmunes y cardiovasculares, destacando, por su elevada frecuencia, la coartación de la aorta(60).

El retraso mental en las pacientes con el síndrome de Turner generalmente se presenta cuando hay una anomalía cromosómica adicional. Se han realizado estudios sobre la conducta social de pacientes con síndrome de Turner, cuyos resultados indican que hay una diferencia mínima o no la hay en desviaciones psicopatológicas y en conflictos sociales(63).

CANCER

Individuos con síndrome de Turner tienen un alto riesgo, mayor que la población en general, de generar tumores en el sistema reproductivo [gonadoblastoma]. Esto se asocia a mosaicos en que está presente el cromosoma Y. El riesgo parece incrementarse sustancialmente cuando se elevan las gonadotropinas(60).

El riesgo de gonadoblastoma en individuos 45X/46XY puede aumentar un 25% alrededor de los 30 años. A estos pacientes se les deben remover sus gónadas atrofiadas antes de iniciar la escuela, para evitar tanto una masculinización como una degeneración maligna tumoral. Ambas estrías deben ser removidas, pues es alto el riesgo de tumores bilaterales(60).

DIAGNOSTICO

En un recién nacido se sospecha del síndrome de Turner al observarse talla baja, linfedema de pies y manos, y piel excesiva en cuello. En niñas el diagnóstico clínico se realiza al presentar corta estatura, junto con algunos de los estigmas asociados ya mencionados. Amenorrea primaria en edad adolescente hace sospechar sobre el síndrome(60).

El diagnóstico confirmativo es el análisis de los cromosomas, que generalmente se realiza a partir de cultivos de linfocitos de sangre periférica(61).

Es importante identificar mosaicos 45X/46XY dada la importancia que reviste la presencia del Y. Es necesario combinar las técnicas citogenéticas con técnicas moleculares con el fin de obtener resultados óptimos, ya que se ha visto que las primeras pueden ser insuficientes. Tal es el caso de los pacientes 45,X que presentan una segunda línea celular con un cromosoma marcador (46,X + mar) cuya naturaleza cromosómica es indispensable determinar. En muchas ocasiones con las técnicas citogenéticas no se logra detectar

material del cromosoma Y por encontrarse en muy pequeñas cantidades(64). Una combinación de técnicas citogenéticas y moleculares utilizando hibridación *in situ* para marcadores específicos del Y, es de gran utilidad para su identificación.

CONSTITUCION CROMOSOMICA 45, X

Mediante estudios realizados en embriones y fetos muertos se ha determinado que el genotipo 45,X tiene una alta letalidad intrauterina. Un 99% de los embarazos con producto 45,X se abortan espontáneamente(59,60,65).

La proporción de muerte fetal y de embriones entre un genotipo 45,X y un mosaico 45,X/46,XX es de 13.5 a 1. Una posible explicación es que los mosaicos tienen una expresión fenotípica del genotipo más leve por lo cual se encuentran menos asociados a muertes fatales y embrionarias. En contraste a lo anterior, en nacidos vivos e individuos mayores con genotipo de síndrome de Turner la proporción es de 3.6 [45,X] a 1 [45, X/46, XX](65).

Con el fin de explicar el elevado porcentaje de genotipo 45, X, Hook y Warburton,(65) sugirieron la posibilidad de que todos los fetos 45, X que logran sobrevivir al nacimiento son realmente mosaicos crípticos para una línea celular normal en algún órgano o tejido en el cual es necesario que haya la doble dosis del cromosoma X [o un X y un Y] para lograr la sobrevivencia fetal.

Varios investigadores han apoyado esta hipótesis. En 1990, Held y cols.(66) realizaron estudios citogenéticos y moleculares, los cuales aportaron información para corroborar la hipótesis de un efecto fetoprotector debido a la presencia de un locus o loci de un segundo cromosoma sexual (X o Y) . En los resultados que obtuvieron trabajando con un grupo de 87 pacientes con síndrome de Turner se vio notablemente disminuido el porcentaje de cariotipo 45,X al mismo tiempo que el porcentaje de mosaicos aumentó considerablemente, respecto a otros estudios con los cuales se compararon resultados. El incremento se atribuyó a la detección de una segunda línea celular que contenía pequeños

cromosomas marcadores en pacientes que se consideraban 45,X. Esto los llevó a determinar que la detección de mosaicismo cromosómico depende de varios factores como son el número de células examinadas, número y tipo de tejido examinado (Held y cols. trabajaron con piel, cultivo de fibroblasto gonadal y/o sangre periférica) y técnicas de cultivo empleadas, entre otras.

En este estudio, sin embargo, 20-25% de los pacientes permanecía con un genotipo 45, X. Held y cols. consideraron que la razón por la cual estos individuos escapan al aborto puede explicarse en base a algún mosaicismo embrionario presente en un órgano en el cual es necesario para la sobrevivencia, a pesar de que no se exprese en el tejido estudiado, o bien puede deberse a un embrión mosaico y una subsecuente pérdida de la segunda línea celular por una selección *in vivo* durante el desarrollo embrionario. Concluyeron, en base a estudios *in vivo* e *in vitro*, que la pérdida de la segunda línea celular era debida a una selección por la inestabilidad de los cromosomas marcadores(66).

Thaddeus y cols. en un artículo reciente(67), apoyan la hipótesis de Hook. Describen el caso de una mujer embarazada a la que a las nueve semanas de gestación se le practicó un diagnóstico prenatal por cultivo de vellosidades coriónicas. El cariotipo obtenido fue de 45,X(65%)/46,X,r(X)(35%). La pareja decidió terminar con el embarazo a las 14 semanas. Cultivaron células del pericardio y músculo del feto para estudios citogenéticos, obteniendo un cariotipo de 45, X en 95% de las células y de 46,Xr(X) en el restante 5%. Realizaron estudios de PCR gracias a los cuales determinaron que el cromosoma X anular era de origen paterno. Por los resultados obtenidos, concluyeron que existe una pérdida gradual del cromosoma anular durante las divisiones celulares. Consideraron que de no haber sido interrumpido el embarazo, éste hubiera llegado a término resultando una niña con severas manifestaciones clínicas del síndrome de Turner cuyo cariotipo se esperaría fuera 45, X.

Postularon que abortos durante el segundo trimestre y niñas nacidas vivas con cariotipo 45,X representan concepciones donde el segundo cromosoma sexual, X o Y, era estructuralmente anormal. La presencia de material cromosómico X o Y permite la sobrevivencia del feto, con un fenotipo cuya severidad se ve reflejada en la cantidad de material cromosómico presente y el momento durante el cual se perdió. Sugieren que la pérdida no es debida a un proceso de selección sino a su inestabilidad en la división celular, característica común de los cromosomas en anillo(67).

TRATAMIENTO

El tratamiento para las pacientes con este síndrome está dirigido hacia un intento de aumentar la estatura, corregir las anomalías somáticas e inducir los caracteres sexuales secundarios y la menstruación(61).

FERTILIDAD

Se ha reportado fertilidad en pacientes con síndrome de Turner, si bien son casos raros. Ocurre principalmente en mujeres que pasan por la pubertad de manera espontánea, siendo factible que éstas experimenten una menopausia temprana y que tengan un mayor número de embarazos anormales, los cuales incluyen abortos así como niños con anomalías cromosómicas (aproximadamente en una tercera parte). Se ha reportado que mujeres Turner tienen hijas Turner que también presentan mosaicismo, y lo mismo ocurre con madres que tienen deleciones del cromosoma X (60).

ETIOLOGIA

El fenotipo Turner es consecuencia de la presencia de un sólo cromosoma X activo, ya que se requieren los dos cromosomas X activos durante las primeras semanas de vida intrauterina. Estos también son indispensables para que la oogonia entre en meiosis y pueda llevarse a cabo el desarrollo normal del ovario. Se ha sugerido que una monosomía

presente en las células germinales y en los oocitos de embriones femeninos humanos carentes de un cromosoma X, puede llevar a la degeneración de los oocitos y secundariamente a una disgenesia ovárica (68).

El síndrome de Turner se asocia generalmente con la pérdida de un cromosoma sexual y se cree que es el resultado de una dosis única de un gen o genes presentes tanto en el cromosoma X como en el Y (69). Se piensa que más de un gen puede estar implicado en la aparición de los estigmas de Turner, entre éstos se han sugerido el gen *XIST* y el gen *RPS4X* (51).

En 1990 Fisher y cols.(69) aislaron dos genes, uno en el cromosoma X (*RPS4X*) y el otro en el Y (*RPS4Y*), los cuales codifican para isoformas de una proteína ribosomal S4. Esta es una de las aproximadamente 33 proteínas encontradas en la subunidad pequeña del ribosoma. El gen *RPS4Y* se localiza en la porción distal del brazo corto del cromosoma Y; mientras que *RPS4X*, que escapa a la inactivación, se localiza en la banda Xq13.1 del brazo largo del X cercano a *XIC*. Cada uno codifica para una proteína de 263 residuos de aminoácidos. Estas proteínas tienen una homología de 93% difiriendo únicamente en 19 residuos. Son altamente transcritas ya que se han encontrado en una amplia variedad de líneas celulares y tejidos tanto en hombres como en mujeres. Los transcritos de *RPS4X* están presentes en todos los tejidos masculinos y femeninos. Es posible que las isoformas codificadas por X y Y, aunque pueden ser grandemente intercambiables, sean funcionalmente diferentes de alguna manera. La información sobre *RPS4X* apoya la observación de que los genes que escapan a la inactivación puedan tener un homólogo en el cromosoma Y(69).

Estudios realizados en dos tipos de mujeres XY han apoyado la hipótesis de Ferguson-Smith(70). El primero corresponde a mujeres XY con disgenesia gonadal que no presentan ningún estigma de Turner, las cuales poseen un cromosoma Y casi intacto. El segundo corresponde a mujeres XY que presentan disgenesia gonadal así como algunas anomalías somáticas características del síndrome de Turner. Estas últimas presentan

deleciones en el brazo corto del cromosoma Y. Comparaciones fenotípicas y genotípicas entre ambos tipos sugieren que las deleciones Yp en las mujeres Turner XY incluyen uno o más genes cuya presencia previene las características extragonadales del síndrome. El fenotipo Turner, o al menos sus componentes extragonadales, son probablemente el resultado de la presencia de una en vez de dos copias de un gen o genes comunes a los cromosomas X y Y. Fisher y cols. sugieren que la haploinsuficiencia de *RPS4Y* y *RPS4X* da por resultado algunos o todos los estigmas de Turner. Para explicar aquellos casos de pacientes Turner con deleciones de Xp o isocromosomas de Xq, Therman y Susman (1990) han propuesto que los genes de Turner escapan a la inactivación en cromosomas X intactos pero están propensos a la inactivación en cromosomas con anomalías estructurales(71).

Fisher y cols.(69) cuestionan el hecho de que niveles reducidos de proteínas ribosomales puedan producir algunas de las anomalías anatómicas del síndrome de Turner. Mencionan un precedente encontrado en *Drosophila*, donde han resultado diferentes fenotipos debido a deficiencias en proteínas ribosomales individuales. Moscas heterocigotas para mutaciones *Minute* muestran desarrollo larval retardado, viabilidad disminuida, talla reducida, fertilidad disminuida y otras anomalías somáticas específicas. Al igual que en el fenotipo de Turner, estos fenotipos *Minute* han sido caracterizados como haploinsuficiencias. Algunos, sino es que los 50 loci *Minute* en *Drosophila* codifican para proteínas ribosomales. En base a lo anterior, Fisher y cols. postulan que el fenotipo de Turner puede ser resultado, al menos en parte, de niveles reducidos de la proteína ribosomal RPS4. Niveles disminuidos de RPS4 podrían retardar el grado de ensamblaje ribosomal, lo cual reduciría la síntesis proteica. Los niveles de síntesis de proteína varían notablemente entre los tipos de células, tejidos y etapas de desarrollo en el humano(69).

II.3.5 DISGENESIA GONADAL MIXTA

Es un síndrome relacionado a anomalía en la diferenciación sexual y que se caracteriza por la presencia de tejido testicular (normal, disgénico o tumor testicular) en un lado y una gónada estriada (no gónada) del otro lado (72).

Aunque un número de pacientes intersexuales con desarrollo gonadal asimétrico ya habían sido descritos antes de 1963, la disgenesia gonadal mixta fue la primera en ser definida claramente por Sohval en ese mismo año. Sohval(73) hace mención de un nuevo grupo de pacientes con anomalías sexuales con suficientes rasgos clínicos y anatómicos en común para considerarlos como una variedad intersexual distinta. Describe a 5 pacientes cuyo fenotipo era masculino o femenino, genitales con elementos de ambos sexos, con una gónada estriada de un lado y un testículo del otro y cromatina negativos. Propone el nombre de disgenesia gonadal mixta o atípica.

CONSTITUCION CROMOSOMICA

La mayoría de los pacientes presentan un cariotipo 45,X/46,XY (74,75,76) seguido de los cariotipos 46,XY y otros mosaicos más complejos. Todos los pacientes son cromatina negativa. No se ha encontrado ninguna correlación entre cariotipo y fenotipo(74), ya que se ha visto que la expresión fenotípica del cariotipo 45,X/46,XY puede variar desde una mujer con infantilismo sexual tipo Turner hasta un hombre con estatura baja con características masculinas y endocrinológicamente normal(77).

CARACTERISTICAS CLINICAS

Presentan genitales externos ambiguos en una amplia variedad, que van desde una hipertrofia de clitoris hasta una ligera hipospadia. Es sumamente raro que los genitales sean puramente femeninos o masculinos. Fuera de estas características, su apariencia física es normal. Los caracteres sexuales secundarios se manifiestan en la edad normal, mostrando

generalmente tendencia hacia la masculinidad. Puede haber un ligero desarrollo mamario, principalmente en aquellos pacientes que presentan un tumor, y aparece la menstruación(61).

Los rasgos clínicos caen dentro de tres fenotipos(77). Los dos primeros corresponden a mujeres Turner, unas con características masculinas y otras no. En estos dos casos pueden presentarse algunos de los estigmas típicos del síndrome de Turner, como pueden ser corta estatura, tórax en escudo, *pterygium colli*, implantación baja de cabello, nevos pigmentados, cuello alado, entre otros, así como algunas anomalías cardiovasculares y renales(74). Dentro del grupo que no presenta masculinización, las pacientes presentan invariablemente corta estatura e infantilismo sexual, mientras que pueden o no presentar otros estigmas de Turner. En el otro grupo, las pacientes presentan consistentemente un testículo unilateral y estrías contralaterales intraabdominales. La clitorimegalia prepuberal usualmente se ve aumentada durante la pubertad y está acompañada por hirsutismo. El último fenotipo comprende individuos con ambigüedad genital franca y el testículo unilateral descendido en el escroto(77).

La deficiencia funcional debida al desarrollo gonadal anormal, se expresa como una producción y/o acción incompletas de la HAM y de la testosterona. Debido a ésto hay una inhibición incompleta persistente en el desarrollo mülleriano y una diferenciación incompleta de los derivados Wolfianos, así como una virilización parcial de los genitales externos, ocasionando una asimetría en genitales externos e internos(74).

Aunque el testículo unilateral es intraabdominal, a veces puede estar situado en el canal inguinal o incluso en el escroto, mostrando un grado de diferenciación variable, que puede ser desde rudimentario hasta casi normal. En la mayoría de los pacientes se han encontrado trompas de Falopio bilaterales, a pesar de la presencia del testículo. En algunos casos se encuentran vasos deferentes y/o epidídimo. En todos los casos se encuentra un útero rudimentario(74).

En el otro lado se encuentra una gónada rudimentaria tipo cintilla, parecida a la del síndrome de Turner, o bien puede no encontrarse ningún tipo de gónada. En ambos casos la gónada estriada muestra principalmente tejido conectivo ondulado o en espiral, dando la apariencia de un estroma ovárico; además de ésta, en la disgenesia gonadal mixta se observan frecuentemente estructuras tubulares así como acúmulos de células granulosas(74).

TUMORES

Es muy frecuente la aparición de tumores malignos, como el gonadoblastoma y disgerminoma(74). Los pacientes que presentan gonadoblastomas muestran características muy particulares: presentan una frecuente virilización en la pubertad, poseen una gónada estriada unilateral, una menor incidencia y grado de genitales ambiguos al nacimiento, generalmente no presentan los estigmas de Turner, alcanzando frecuentemente una altura normal(78). El cariotipo más comúnmente encontrado es el 45, X/46, XY(74).

DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO

La disgenesia gonadal mixta puede detectarse al momento del nacimiento debido a la ambigüedad de genitales externos. Sin embargo la mayoría de los casos son detectados en edad adulta(74). Debe pensarse seriamente en una DGM cuando se encuentran genitales externos ambiguos con cromatina negativa y se palpe una sola gónada en el escroto o región inguinal (o no se palpe ninguna). En estos casos es necesario hacer un cariotipo y una exploración quirúrgica con biopsia gonadal(79).

Una vez que el diagnóstico ha sido confirmado, deben extirparse tanto el testículo como la estra gonadal debido al peligro de malignización, además de una terapia hormonal sustitutiva. Si los genitales externos tienden a la masculinización, se recomienda reconstruirlos y educar al paciente como niño. Si los genitales son más femeninos, éstos

deben corregirse quirúrgicamente y se educará al paciente como niña, suministrándole en la pubertad un tratamiento con hormonas sexuales femeninas. Es preferible asignar un sexo femenino en vista de que muchos presentan talla baja(61).

El origen de este síndrome es atribuible, en la mayoría de los casos, a un mosaicismo, el cual surge probablemente por la pérdida del cromosoma Y durante una de las primeras mitosis después de la fertilización. En el caso de los pacientes con un cariotipo 46,XY se sugiere que su etiología es debida a una mutación que resulta en falta de desarrollo gonadal (80).

HERMAFRODITISMO VERDADERO

El síndrome de hermafroditismo verdadero es una condición clínica en la cual ambos tejidos, testicular y ovárico, se encuentran en un mismo individuo.(81)

De acuerdo con el tipo y distribución de las gónadas, estos pacientes pueden clasificarse en los siguientes grupos: (82)

<u>TIPO</u>	<u>DISTRIBUCION</u>	<u>PORCENTAJE</u>
Lateral	ovario-testículo	30%
Unilateral	ovotestes-ovario	30%
	ovotestes-testículo	11%
Bilateral	ovotestes-ovotestes	20%
Otros	ovotestes-desconocido	4%
	otras	5%

CONSTITUCION CROMOSOMICA

El cariotipo más frecuentemente encontrado en los hermafroditas verdaderos corresponde a 46,XX (59.5%), seguido por 46,XX/46,XY (12.8%) y por 46,XY (12.3%). Otros mosaicos han sido reportados entre ellos 46, XY/47, XXY, 45, X/46, XY (15.3%). (61,82)

Entre los hermafroditas verdaderos con cariotipo 46,XX, el patrón de distribución gonadal más común es un ovario de un lado y un ovotestes del otro (37%) seguida por ovotestes-ovotestes (28.4%) y por un ovario de un lado y un testículo del otro en 19.8% de los casos.(82)

En los hermafroditas verdaderos con un ovario de un lado y un ovotestes del otro, la probabilidad de no detectar cromosoma Y y de que el paciente tenga un complemento cromosómico 46, XX es de 72.8%. (82)

La presencia del cromosoma Y se asocia comúnmente a un fenotipo masculino, aunque la ausencia del cromosoma Y no necesariamente se asocia a uno femenino.(82)

RASGOS CLINICOS

Los genitales externos generalmente son ambiguos, aunque en raras ocasiones pueden presentar masculinos o femeninos normales. En la pubertad aparecen los caracteres sexuales secundarios y pronto se diferencian hacia uno u otro sexo; además pueden presentar desarrollo mamario (ginecomastia, 80%) y sangrados menstruales (50%).(83)

La mayoría de los sujetos presentan hipospadias, así como criptorquidia. Se han reportado hernias inguinales en poco menos de la mitad de los hermafroditas verdaderos. (61,84)

En 10% de los casos el útero es normal. En la mitad de los pacientes está presente la próstata.(82)

La mayoría de los hermafroditas verdaderos son deficientes en la producción de dihidrotestosterona fetal o bien son insensibles a ésta. De esta forma, el tejido testicular parece ser capaz de estabilizar los ductos Wolffianos, pero incapaz de diferenciar totalmente los genitales externos masculinos.(82)

Respecto a la apariencia de los genitales externos, se ha reportado que 63% presentan pliegues labioescrotales, 17% escroto normal, 13% un hemiescroto y únicamente

7% labios mayores normales. Con esta información es evidente que suficiente dihidrotestosterona debió estar presente para virilizar parcialmente los genitales externos de los hermafroditas verdaderos.(82)

GONADAS

El ovotestes (cuando en una gónada se encuentran presentes tejido testicular y ovárico) es la gónada más comunmente encontrada en los hermafroditas verdaderos (44.3%). Se localiza preferentemente en la porción ovárica. El porcentaje entre el tejido ovárico y testicular influye en el descenso del ovotestes y eventualmente en el sitio en el que se encontrará en el paciente. Mientras haya mayor cantidad de tejido ovárico, mayor probabilidad habrá de que se encuentre en la posición del ovario. De igual forma, mientras más tejido testicular esté presente habrá mayor posibilidad de encontrarla en el área labioescrotal. Cuando la cantidad de ambos tejidos es semejante, no hay un patrón para su localización.(82)

El hecho de que el tejido ovárico sea firme al palparlo y el testicular sea suave, es una característica clínica valiosa ya que éste es muy útil al palpar la gónada de un recién nacido con genitales externos ambiguos. De esta forma un ovotestes puede ser diagnosticado clínicamente.(82)

La histología de la porción ovárica es generalmente normal. La anomalía más comunmente encontrada en infantes es una reducción en el número de folículos primordiales. Es interesante destacar que 50% de los ovotestes muestran evidencia de ovulación. En el caso del tejido testicular, éste es histológicamente anormal en la mayoría de los casos; sólo en raras ocasiones se han observado espermatogonias y espermatozoides. Alrededor de un tercio de los pacientes muestran signos de hiperplasia de las células de Leydig. Otra característica clínica observada con frecuencia es la abundancia de células de Sertoli en el lumen de los túbulos seminíferos.(82)

Adyacente al ovotestes generalmente hay un sólo ducto, cuya apariencia puede ser engañosa. En 65% muestra apariencia de trompa de falopio, mientras que 35% muestra apariencia de vaso deferente. La evidencia muestra que a mayor tejido testicular es más probable que el ducto sea un vaso deferente. No se han encontrado ambos tipos de ductos juntos.(82)

El ovario es la segunda gónada más común en hermafroditas verdaderos (33.4%) Comúnmente se sitúa en la posición normal del ovario. Cuando una gónada con características macroscópicas de un ovario se encuentre en el canal inguinal o en el pliegue labioescrotal, la posibilidad de que esta gónada sea un ovotestes debe ser seriamente considerada.(82).

La mayoría de los ovarios encontrados en los hermafroditas verdaderos muestran signos de ovulación (como presencia de *corpus luteum*).(61)

La producción normal de estrógenos es evidente ya que hay un buen desarrollo de los senos en alrededor de 70% de los casos reportados.(82)

El testículo corresponde a 22.3% de las gónadas totales. En la mayoría de los casos se localizan en el escroto(63%), mientras que el resto en posición ovárica (22%), en región inguinal (14%) y en el anillo inguinal interno en 1%.(82)

Histológicamente el testículo presenta un patrón similar al encontrado en el ovotestes. Su apariencia usual es la de un testículo inmaduro con el lumen de los túbulos llenos con células de Sertoli. Se ha reportado hiperplasia de las células de Leydig en 19% de los casos y espermatogénesis en 12%. Junto a un testículo invariablemente se encuentra un vaso deferente y un epidídimo.(82)

DIAGNOSTICO

Deben realizarse una serie de estudios diagnósticos, como es un examen físico completo con examinación rectal. Es esencial, además, hacer el cariotipo.(85)

El diagnóstico confirmativo requiere que se realice una biopsia para identificar la presencia de tejido testicular y ovárico .(83,84)

Hay varias características claves que pueden ser identificadas en el momento del nacimiento durante el examen de rutina. Entre éstas están los hipospadias con criptogonadismo, escroto bifido y una masa inguinal en caso de una supuesta mujer. Un diagnóstico temprano es muy importante, ya que se ha visto que después de los tres meses de edad es tarde para hacer un cambio de sexo sin provocar algún trastorno psicológico. (83)

Desafortunadamente en muchos casos el hermafrodita verdadero no se detecta sino hasta que se observa un desarrollo sexual contradictorio durante la pubertad lo que alerta al médico. En este momento, en las mujeres se puede detectar voz grave, clitorimegalia, acné, hirsutismo debido a estimulación androgénica y un patrón de vello de tipo masculino; mientras que en el hombre se puede observar una hematuria periódica (quizás debido a que está funcionando el tejido uterino el cual se vacía en el tracto urinario), ginecomastia, hidrocele o masa escrotal, así como un patrón femenino de vello.(83)

El sexo debe ser asignado primeramente en base a consideraciones de funcionalidad y en segundo término a aspectos de fertilidad. Tales consideraciones incluyen la habilidad para una reconstrucción genitourinaria funcional. Consideraciones menos importantes incluyen los hallazgos cromosómicos y la posible fertilidad.(85)

Se ha visto que criar al infante como mujer ha dado los mejores resultados. Sin embargo, puede asignarse el sexo masculino si se presentan ciertos criterios tales como: diagnóstico tardío del paciente que lo ha llevado a identificarse socialmente como varón; un infante con un falo bien desarrollado sin importar la edad (75% son criados como varones); y una fuerte presión de los padres para que el infante sea criado como niño.(85)

FERTILIDAD

En muy raras ocasiones se ha observado espermatogénesis, mientras que la ovulación es común. Se han reportado pocos casos de hermafroditas verdaderas

embarazadas. Tal es el caso de tres pacientes que se embarazaron, las cuales tuvieron un parto prematuro que era de esperarse debido al desarrollo anormal del útero. Los niños nacieron normales con genitales externos normales.(84,86)

TRATAMIENTO

Dependiendo de la edad en la que se haya realizado el diagnóstico, se sugerirá un tratamiento diferente. Los procedimientos quirúrgicos y la administración de hormonas son muy variables. Una vez que se ha asignado el sexo, se deben remover todos los tejidos gonadales contradictorios para erradicar antagonismo hormonal.(83)

En la mujer se recomienda que sus genitales externos sean reconstruidos después del tercer año de vida, mientras que en el hombre la edad recomendada es el cuarto año. (85)

Se recomienda remover el ovotestes por completo porque: 1) con la escisión parcial no se asegura que se vaya a remover por completo el tejido contradictorio, 2) después de la gonadectomía es fácil lograr la terapia hormonal de reemplazo, 3) en la adolescencia puede haber un desarrollo anormal sino se eliminó por completo el tejido contrario y 4) la fertilidad no debe ser impedimento para su remoción, ya que la capacidad de reproducción no se ha demostrado en pacientes con ovotestes.(83)

El tratamiento que se le puede dar al varón incluye reparación de hipospadias, remoción de órganos internos femeninos, masectomía, prótesis testicular (que se recomienda sólo hasta la pubertad a menos que haya algún problema psicológico) y administración de andrógenos.(83)

En la mujer se incluyen la amputación del falo, una revisión y construcción de la vagina, así como la administración de estrógenos suplementarios.(83)

En general, en los pacientes que presentan hernia ésta debe ser reparada al momento de la exploración gonadal y abdominal. Los procedimientos quirúrgicos a elegir varían dependiendo de cada caso particular.(83)

CANCER

Es infrecuente encontrar gonadoblastomas entre hermafroditas verdaderos. En una revisión hecha por van Nieker (1976), entre 300 pacientes sólo encontró uno que presentó gonadoblastoma y cinco con disgerminoma. Se han reportado 30 casos de pacientes con neoplasias gonadales. El riesgo de desarrollar neoplasias en células germinales se ha asociado a la presencia del cromosoma Y (81).

ETIOLOGIA

Existen tres hipótesis para explicar el origen del hermafroditismo verdadero.

El **mosaicismo** explica el origen en los casos en los que se ha detectado la presencia del cromosoma Y en alguna otra línea celular. Esto justifica el hecho de encontrar tanto células cromatina positiva como negativa en un mismo individuo. El caso más común de mosaicismo XX/XY ha sido explicado como resultado de una doble fertilización ya sea de un óvulo binucleado, de un óvulo y su cuerpo polar o bien por la fusión de dos óvulos fertilizados normalmente (quimera). Así, dos espermatozoides diferentes (uno X y uno Y) contribuyen a la formación de un cigoto XX/XY. (83)

En los casos que no se ha detectado mosaicismo se ha sugerido que éste puede estar oculto por ejemplo, en las gónadas. (87)

La segunda hipótesis planteada es la de un **intercambio X-Y** (Ferguson-Smith) (88) sin embargo ésta no ha sido apoyada por los estudios moleculares recientes. (81)

La **mutación autosómica** es la más aceptada en la actualidad para explicar la mayoría de los casos. Esta ha sido apoyada por los casos familiares que se han reportado. Waibel y cols. (89) describen a dos hermanos con hermafroditismo verdadero, a los cuales no se les detectó ninguna secuencia del Y. Raine y cols. (90) estudiaron a dos hermanos con hermafroditismo verdadero en los que tampoco se detectó ninguna secuencia de Y.

Sugirieron que su etiología se debía a una mutación en un autosoma o cromosoma X, la cual resulta en una diferenciación a testículo u ovotestes en un individuo con cariotipo 46,XX en ausencia del cromosoma Y.

Berkovitz y cols. (81) reportaron el caso de cinco pacientes sólo en uno de ellos se detectaron secuencias del Y. En base a sus resultados, ellos apoyan la hipótesis de una mutación autosómica dominante que lleva al desarrollo testicular en pacientes que no tienen cromosoma Y. Ellos citan trabajos que apoyan lo anterior, como es el caso de estudios realizados en pacientes con disgenesia gonadal XY que implican dos genes autosómicos en la diferenciación testicular.(91,92) Además, investigaciones en el ratón también sugieren que genes autosómicos tienen un papel en la diferenciación testicular.(93) Berkovitz concluye que el hermafroditismo verdadero es una condición genéticamente heterogénea y que la presencia de Y es poco común. La mayoría de los casos representan cambios en un gen autosómico o en un gen ligado al X que permiten la diferenciación testicular en ausencia de TDF.(81)

11.3.7 VARONES XX

En 1964 de la Chapelle(94) reportó, por primera vez, el caso de un varón con una constitución cromosómica XX. El paciente tenía 19 años; su apariencia general era atlética, como la de un hombre normal aunque su pene y escroto eran pequeños. Pensó que ambos cromosomas X eran de origen materno.

FRECUENCIA

Se presenta aproximadamente con una frecuencia de 1 en 20,000 varones, siendo la mayoría de los casos esporádicos aunque se han reportado algunos casos familiares(87,95,96,97,98).

CARACTERISTICAS CLINICAS

El fenotipo es masculino. Su apariencia general es normal. La talla final es ligeramente menor al promedio de los hombres en su familia(84). No difieren de la población general respecto a la inteligencia(79). Su constitución esquelética es normal, al igual que sus órganos internos(61).

Existe variación fenotípica, siendo las características más comunes las siguientes. El pene y el escroto son pequeños, pero bien diferenciados y los conductos Wolffianos son normales. Los testículos son pequeños, los túbulos seminíferos están disminuidos en tamaño y número, y presentan fibrosis intersticial y peritubular(98). Las células de Leydig son hiperplásicas y generalmente no se detectan espermatogonias, aunque ocasionalmente se encuentran algunas inmaduras, por lo tanto no hay espermatogénesis(61). Esta es debida a la pérdida del brazo largo del cromosoma Y que contiene el gen AZF-3 (factor 3 de azoospermia) el cual es necesario para que la espermatogénesis sea completa(98).

No tienen un desarrollo puberal normal. El vello en la cara y cuerpo están disminuidos y el vello púbico se encuentra distribuido de manera ginecoide. Cerca de 30% presenta ginecomastia (61).

La testosterona es relativamente baja y se observa un incremento de las gonadotropinas(84). La hipospadias está presente en 10% de los casos. No hay anomalías somáticas asociadas(61,84).

Frecuentemente los varones XX se han relacionado con el Síndrome de Klinefelter, por presentar características fenotípicas similares(99).

DIAGNOSTICO

Muchos casos se detectan en edad adulta, ya que los pacientes acuden a consulta por presentar testículos o pene pequeños, o bien por esterilidad. La correlación cariotipo (46,XX)-fenotipo confirma esta entidad clínica.(28).

ETIOLOGIA

Se han postulado tres posibles explicaciones respecto a su etiología(61,84):

- 1) Un mosaicismo XX/XY que tenga una línea celular no detectada o que la línea con cromosoma Y haya desaparecido.
- 2) Una mutación en un gen autosómico que conduce a la diferenciación de los testículos.
- 3) Intercambio o translocación entre los cromosomas X y Y.

La hipótesis del mosaicismo postula la existencia de una línea celular que contenga al cromosoma Y, o bien que lo haya perdido durante su desarrollo. Siendo el cromosoma Y el responsable de la diferenciación de la gónada a testículo. No hay evidencias que apoyen esta suposición(61,79,84).

La segunda hipótesis está apoyada por los casos familiares de varones XX, así como por los varones XX en los que no se han detectado secuencias del Y (Y-). Se ha visto que en algunos animales como la cabra y el ratón de sexo invertido (SxrXX) la mutación de un gen autosómico lleva a la diferenciación testicular(61). Sin embargo, Skordis y cols.(100) consideran que es difícil, si no imposible, distinguir entre una mutación intragónica y una translocación Y-autosoma. Estos investigadores han reportado una familia en la cual coexisten dos varones XX y dos hermafroditas verdaderos 46,XX. Proponen que la masculinidad puede deberse a un alelo mutado el cual explicaría la presencia de testículos tanto en los hermafroditas como en varones XX Y(-). En este caso podría tratarse de un alelo dominante ya que se presentaron cuatro individuos afectados provenientes de tres padres diferentes.

Nacer Eddine Abbas y cols.(87) apoyan esta hipótesis y sugieren que el gen mutado puede ser un gen desencadenante de la determinación sexual. Para apoyar esto último están analizando varios casos familiares con al menos dos hermanos o gemelos afectados. Con esto, pretenden mapearlo en un autosoma o en el cromosoma X.

La tercera hipótesis es la que ha sido más apoyada para explicar la etiología de los varones XX. Ferguson-Smith en 1966 (88) propuso que el intercambio anormal X-Y era muy factible durante la profase de la primera división meiótica en el espermatozito primario. Por consiguiente habría un cromosoma X que contenga material proveniente del Y (X^Y) conteniendo al gen TDF. Como resultado de la fertilización de un óvulo con un espermatozoides X^Y se forma un cigoto XX^Y. Si el cromosoma X^Y es inactivado se promoverá la diferenciación del ovario. En caso de que la inactivación sea preferentemente en el cromosoma X normal, el X^Y activo inducirá la diferenciación testicular. Variaciones en la proporción de las dos líneas celulares llevarán a una amplia diversidad de fenotipos, como pueden ser el desarrollo de ovarios, ovotestes y testículos. Esta hipótesis explicó la herencia inusual del Xg cuyo locus se encuentra cercano a la región pseudoautosómica. Por esto es factible que durante el intercambio X-Y se transfiera este gen al cromosoma Y, por lo cual se ha visto que los varones XX cuya madre es Xg(a-) heredan el Xg(a+) paterno. Además este intercambio refutó la idea de que los dos cromosomas X eran de origen materno, confirmándose que uno de éstos se hereda del padre(88).

De la Chapelle(101), en 1984, aportó evidencia de la presencia de secuencias del Y en el cromosoma X, al estudiar un niño XX que expresaba el alelo 12E7 de su padre (el cual es un marcador ligado al Y), pero no expresaba el alelo Xg de su padre.

En 1985, Page y cols.(95) trabajando con sondas específicas del Y, encontraron secuencias específicas de éste en tres de cuatro casos familiares de varones XX .

Anderson y cols.(96) en 1986, por hibridación *in situ* detectaron secuencias específicas del Y en metafases de tres varones XX, demostrando que estas secuencias se localizaban en el extremo del brazo corto del cromosoma X. Magenis y cols. (1987) aportaron más evidencias sobre el intercambio X-Y, empleando estudios de hibridación *in situ* (102).

Petit y cols. (1987) dividieron a los varones XX en varones XX Y(+) y varones XX Y(-). Atribuyen la etiología de los varones XX Y(+) al intercambio anormal X-Y que ocurre esporádicamente; proponen que este intercambio reemplaza al que normalmente ocurriría, ya que ningún paciente posee un alelo telomérico pseudoautosómico del X como evidencia de un previo o subsecuente intercambio normal. Respecto a la etiología de los varones XX Y(-), la atribuyen a otras hipótesis, como son la pérdida del cromosoma Y en un individuo que era originalmente XXY o a una mutación autosómica o en el X (103).

Schempp y cols.(97), en 1989, trabajando con once varones XX demostraron que en nueve de ellos el intercambio X-Y no tenía efecto en el patrón de inactivación del X. Sus resultados indicaron una dependencia del patrón de inactivación del X en el tamaño del segmento perdido por el intercambio. Si en el intercambio resulta la pérdida de *loci* pseudoautosómicos en el X o de *loci* específicos del X cercanos a la región pseudoautosómica (como el *locus* Xg, que está perdido en la mayoría de los varones XX), el patrón de inactivación permanece al azar. En cambio, si la delección ocurre próxima al locus STS, el cual escapa a la inactivación, las células sobrevivirán únicamente con el cromosoma XY inactivado.

Ferguson-Smith y cols.(104), en 1990, hicieron un estudio correlacionando el fenotipo-genotipo en varones XX, encontrando que únicamente los varones XX Y(-) tenían anomalías en los genitales externos, presentando estos pacientes una ginecomastia más prominente.

Se ha reportado que aproximadamente 30% de los casos son varones XX Y(-) y que éstos generalmente corresponden a casos familiares. Por otra parte los casos restantes (70%) corresponden a los varones XX Y(+), cuya etiología sería un intercambio anormal X-Y(104).

Estudios realizados con sondas para SRY reportan algunos casos de varones XX negativos, cuestionándose la importancia de este gen para la diferenciación testicular (105,106).

III. BANCO DE DNA DE PACIENTES CON ANOMALIAS EN LA DIFERENCIACION SEXUAL.

Propósito del banco

El banco incluye pacientes que requieren análisis de DNA para los siguientes propósitos:

-Confirmación de diagnóstico a nivel molecular. Esto incluye la identificación de cromosomas marcadores.

-Búsqueda de secuencias específicas del cromosoma Y, no detectadas por las técnicas citogenéticas habituales.

-Investigación

¿Cuáles desórdenes comprende?

Aunque se pretendía incluir a todos los padecimientos de la diferenciación sexual, dada la baja incidencia de algunos de ellos como mujeres XY y disgenesia gonadal pura no fue posible su inclusión en este banco de DNA. Por lo tanto sólo comprendió a pacientes con las siguientes anomalías de la diferenciación sexual:

- Síndrome de Turner
- Disgenesia gonadal mixta
- Hermafroditismo verdadero
- Varones XX

¿De qué miembros de la familia debe conservarse DNA?

En general para este tipo de padecimientos no se requieren muestras de familiares, excepto en aquellos casos en que existan antecedentes heredo-familiares.

Para este tipo de bancos es indispensable incluir muestras de DNA de controles normales femeninos (mujeres XX) y masculinos (varones XY), ya que en las técnicas moleculares se requieren como punto de comparación.

Tipo de muestra

La muestra que se utilizó para este tipo de banco fue sangre periférica (20 ml).

Identificación de la muestra

Se ha asignado una clave por padecimiento, cada uno de los cuales se sigue con un número progresivo, junto al cual se indica el año en que fue tomada la muestra. Las claves asignadas son: T (Síndrome de Turner), DG (Disgenesia gonadal mixta), HV (Hermafroditismo verdadero) y VX (Varones XX). En cuanto a los controles, los masculinos tienen la clave CM y los femeninos la clave CF. Además, los microtubos que contienen las muestras están etiquetados de diferente color, dependiendo del padecimiento, con el fin de facilitar su localización.

Servicio-investigación

Para el caso específico del síndrome de Turner, la finalidad es buscar mosaicismos del cromosoma X o del Y que estén en bajos porcentajes, o identificar cromosomas marcadores, los cuales pueden corresponder a derivados del X o del Y. Esto es importante ya que la presencia de secuencias del cromosoma Y predisponen a la malignización de la gónada disgenética. En la disgenesia gonadal mixta el objetivo es averiguar qué secuencias del cromosoma Y están presentes, ya que generalmente estas pacientes poseen un Y anormal. Otra aplicación de las sondas específicas del cromosoma Y es determinar la presencia de secuencias de este cromosoma que expliquen la etiología del fenotipo masculino en individuos con un cariotipo 46,XX como es el caso de los varones XX y algunos hermafroditas verdaderos. Presumiblemente, éstas secuencias están contenidas en pequeños segmentos del cromosoma Y translocados al X o a autosomas y que no son detectadas por las técnicas citogenéticas(13).

Aplicaciones

Las muestras de DNA se utilizarán, a corto plazo, para las técnicas moleculares de hibridización tipo Southern y PCR.

Para la técnica de hibridización tipo Southern se requiere que el DNA sea de alto peso molecular, no muy fragmentado, y libre de proteínas, para que las enzimas de restricción puedan actuar convenientemente.

Para la técnica de PCR, el DNA puede estar degradado, pero la presencia de proteínas puede causar interferencia.

IV. MATERIAL Y METODO

Como muestra biológica se incluyeron muestras de controles así como de pacientes con anomalías de la diferenciación sexual.

Los controles corresponden a individuos sanos masculinos y femeninos, cuya edad fluctuó entre los 18 y 45 años, siendo todos de la población mestiza mexicana. Ninguno de éstos tenía antecedentes de anomalías de la diferenciación sexual.

En cuanto a los pacientes sus edades fluctuaron entre 2 y 35 años.

TECNICA DE EXTRACCION DE DNA(27) MODIFICADA

Todo el material que se emplea debe estar limpio y estéril.

- 1.- Extraer aproximadamente 20ml. de sangre periférica y colocarla en tubos de vacutainer con EDTA (3 tubos de 13 x 100). Agitar para evitar formación de coágulos.
- 2.- Centrifugar a 3000rpm. en una centrifuga clínica durante 25 minutos.
- 3.- Tomar con una pipeta Pasteur la capa de glóbulos blancos y transferirla a dos tubos de 13x100.
- 4.- Añadir aproximadamente 7ml., por tubo, de buffer de lisis de glóbulos rojos (BLGR). Tapar con parafilm y mezclar perfectamente.
- 5.- Centrifugar a 3000 rpm. durante 10 minutos.
- 6.- Decantar el sobrenadante quedando en el fondo el botón de glóbulos blancos.
- 7.- Agregar nuevamente BLGR, homogenizar y centrifugar 10 minutos a 3000rpm. Decantar el sobrenadante. Repetir este paso hasta que el botón de glóbulos blancos quede lo más limpio posible.
- 8.- Resuspender el botón de glóbulos blancos con aproximadamente 400µl. de BLGR por tubo, después agitar en vortex para obtener una solución homogénea.
- 9.- Añadir buffer de lisis de glóbulos blancos (BLGB) aproximadamente 2ml. por tubo.
- 10.- Agitar suavemente.
- 11.- Dejar en incubación toda la noche en baño María a 42°C.

- 12.- Añadir fenol-(cloroformo:isoamílico 1:24) volumen a volumen.
- 13.- Agitar manualmente hasta obtener una emulsión completa (aproximadamente 5 min.)
- 14.- Centrifugar 20 minutos a 3000rpm en una centrifuga Sol-Bat.
- 15.- Tomar cuidadosamente la fase superior y pasarla a un tubo limpio de 13 x 100 (no tomar la interfase).
- 16.- Hacer una segunda extracción de la misma manera, centrifugando durante 10 minutos.
- 17.- Pasar la fase superior a un tubo limpio y realizar las extracciones que se requieran con cloroformo:isoamílico volumen a volumen, centrifugando durante 10 minutos, hasta que ya no se observe interfase.
- 18.- Pasar la fase superior de ambos tubos a un solo tubo de 50ml.
- 19.- Añadir NaCl 5M hasta una concentración final de 100mM. (volumen final en ml. x 20= μ l. de NaCl que hay que agregar).
- 20.- Agregar 2-3 volúmenes de etanol absoluto a -20°C.
- 21.- Agitar suavemente hasta que se forme un precipitado blanco (DNA). Dejar de agitar cuando el DNA flote.
- 22.- Recoger el DNA con una pipeta pasteur de punta curvada.
- 23.- Lavar sumergiéndolo unas 10 veces en etanol al 70% a -20°C.
- 24.- Dejar secar para eliminar el exceso de etanol.
- 25.- Resuspender en TE (el volumen depende de la cantidad de DNA obtenido variando de 100-500 μ l.) Guardar la muestra en un microtubo.
- 26.- Refrigerar la muestra a 4°C.

Una vez extraída la muestra, el rendimiento de DNA debe ser medido. Además, es deseable determinar la integridad del DNA en todas las muestras. Esto se logra por medio de un análisis espectrofotométrico y de una electroforesis del DNA.

ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO

En cuanto al análisis espectrofotométrico, éste consiste en determinar la absorbancia de una dilución 1:100 de la muestra a dos longitudes de onda (260nm y 280nm). A partir de la lectura a 260nm. (correspondiente a los ácidos nucleicos), se calcula la concentración de la muestra:

$$\text{concentración de DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$$

$$1 \text{ D.O.}_{260} = 50 \mu\text{g de DNA/ml} = 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \quad (107)$$

La cantidad total de DNA (en μg) se calcula:

$$\mu\text{gs totales de DNA} = \text{conc. } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{volumen total } (\mu\text{l})$$

Además, la relación 260/280 permite conocer si la muestra está contaminada con proteínas, considerando que la lectura a 280nm. corresponde a la fracción proteica. Una relación menor a 1.7 indica la presencia de proteínas(108).

TECNICA DE ELECTROFORESIS (107)

La electroforesis del DNA es la migración de éste. en base a su carga y peso, al aplicarse un campo eléctrico. Debido a su carga negativa, el DNA migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite visualizar la calidad de la muestra, así como la presencia o ausencia de RNA contaminante(109).

Procedimiento:

- 1.- Preparar agarosa al 0.8% (ver preparación de reactivos)
- 2.- Sellar las orillas del portagel.
- 3.- Preparar suficiente buffer de electroforesis para llenar la cámara y preparar el gel.(ver preparación de reactivos)
- 4.- Pesar la agarosa y mezclarla con la cantidad adecuada de buffer de electroforesis en un matraz Erlenmeyer.
- 5.- Dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 60°C, adicionar el bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{gs/ml}$. y homogeneizar.

- 6.- Colocar el peine.
- 7.- Vaciar la solución de agarosa en el portagel y dejar gelificar.
- 8.- Retirar el peine cuidadosamente.
- 9.- Colocar el portagel en la cámara de electroforesis y añadir el buffer de electroforesis hasta cubrir el gel aproximadamente un milímetro por encima.
- 10.- Mezclar cada muestra de DNA (1-2 μ g.) con 2 μ l. de buffer de carga y llevar con Tris-EDTA (TE) a un volumen final de 20 μ l. Adicionar cuidadosamente cada muestra a un pozo.
- 11.- Conectar los electrodos a la cámara y encendar la fuente de poder (70-100v).
- 12.- Dejar correr la muestra aproximadamente 2/3 del largo del gel de agarosa.
- 13.- Observar en el transiluminador.

PREPARACION DE REACTIVOS

Extracción de DNA:

1.- BLGR :

Tris-HCl pH 7.6 10mM.

MgCl₂ 5mM.

NaCl 10mM.

H₂O bidestilada

Esterilizar y restituir el volumen perdido.

2.- BLGB :

Tris-HCl pH 7.6 10mM.

EDTA pH 8 10mM.

NaCl 50mM.

SDS 0.2%

H₂O bidestilada

Esterilizar y restituir el volumen perdido.

Adicionar proteinasa K a una concentración de 200µg/ml.

3.- NaCl 5M.

4.- Fenol saturado:

El fenol redestilado se equilibra con una solución amortiguadora antes de ser utilizado para la extracción de ácidos nucleicos. Para ello, el fenol sólido se calienta en un baño María a 65°C para que se funda. Una vez que esté todo líquido, se adiciona un volumen equivalente de Tris 1M. pH 8.0. Se mezclan ambas fases agitando cuidadosamente. Se deja a 4°C hasta que se separe en dos fases (fase superior-acuosa y fase inferior-orgánica). Se elimina la fase superior y se adiciona Tris 0.1M pH 8.0 en un volumen equivalente al del Tris 1M. Nuevamente se agita y se dejan separar las fases. Se mide el pH de la fase acuosa, el cual no debe ser menor de 7.6. En caso de serlo, se repite

el procedimiento con Tris 0.1M pH 8.0 hasta alcanzar un pH satisfactorio. Se retira la mitad de la fase acuosa. Con el fin de reducir la oxidación se adiciona 8-hidroxiquinoleína. El fenol saturado se mantiene en refrigeración(110).

5.- Cloroformo-isoamílico (24:1) a 4°C.

7.- Etanol absoluto a -20°C

8.- Etanol 70% a -20°C.

9.- TE:

Tris pH8 10mM.

EDTA pH8 0.1mM.

H₂O bidestilada

Esterilizar y restituir el volumen perdido.

Electroforesis:

1.- Agarosa 0.8-1%. Para disolver la agarosa se emplea buffer de electroforesis. Se calienta la mezcla en un horno de microondas hasta la disolución completa de la agarosa. Se restituye el agua que se haya perdido.

2.- Buffer de electroforesis:

a) TAE (solución stock 50X para un litro)

Tris base 242 g.

Ac. acético glacial 57.1 ml.

EDTA 0.5M pH8 100 ml.

H₂O bidestilada cbp 1,000ml.

Para la electroforesis se utiliza una solución 1X.

b) TBE (solución stock 5x para un litro)

Tris base	54 g.
Ac. bórico	27.5 g.
EDTA 0.5M pH8	20 ml.
H ₂ O bidestilada	cbp 1,000 ml.

Para la electroforesis se utiliza una solución 1X.

3.- Bromuro de etidio

Solución stock	10mg./ml.
Solución de trabajo	0.5µg./ml.

4.- Buffer de carga (a 4°C)

Azul de Bromofenol	0.25%
Xilen-cianol	0.25%
Glicerol	30%
H ₂ O bidestilada	

V. RESULTADOS

Se trabajaron un total de 93 muestras, de las cuales 48 correspondieron a controles sanos y las 45 restantes a pacientes.

De las 48 muestras de controles sanos, éstas corresponden a:

- 26 controles femeninos XX
- 22 controles masculinos XY (Gráfica 1).

Respecto a las muestras de los pacientes, éstas se dividen en:

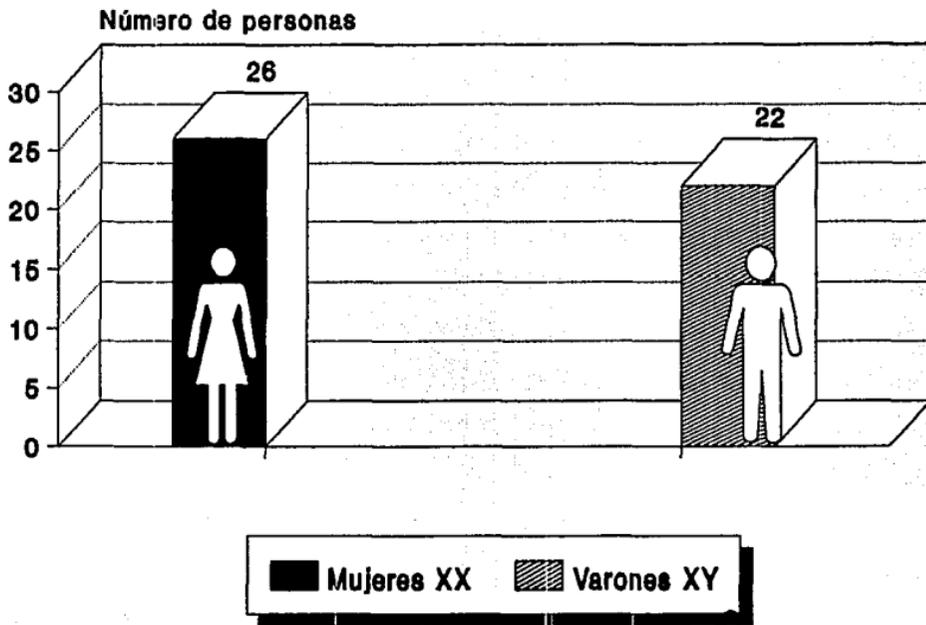
- 24 con síndrome de Turner
- 10 con disgenesia gonadal mixta
- 7 con hermafroditismo verdadero, a excepción del HV04 que no es un hermafrodita verdadero, pero que se incluyó en este grupo con el fin de confirmar que no presenta alteraciones en los cromosomas sexuales.
- 4 varones XX (Gráfica 2).

La mayoría de los pacientes fueron captados a través de la Unidad Metabólica Pediátrica del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán.

En general, todas las muestras fueron trabajadas de la siguiente manera: en cuanto se disponía de la sangre, se procedía a la extracción del DNA, se esperaba un par de días para que estuviera completamente disuelto y entonces se procedía al análisis espectrofotométrico. Las electroforesis se realizaron en la etapa final, cuando prácticamente se contaba con todas las muestras, ya que era necesario tomar fotografías.

Los resultados globales se presentan en forma de tablas y en fotografías. Se consideró innecesario poner todas las fotografías, por lo que se incluyen sólo algunas de éstas.

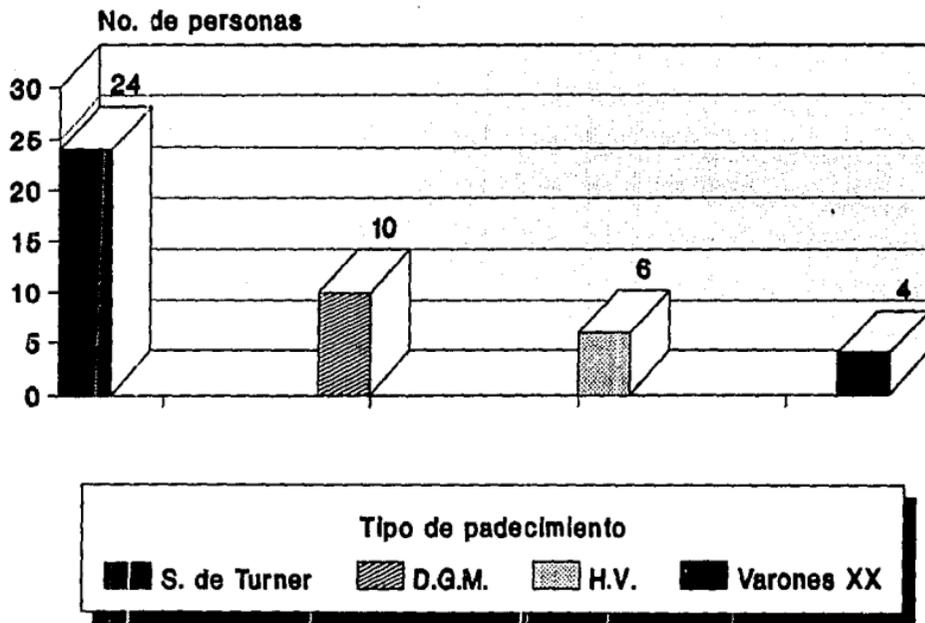
CONTROLES FEMENINOS Y MASCULINOS



69

Gráfica 1

PACIENTES CON ANOMALIAS DE LA DIFERENCIACION SEXUAL



Gráfica 2.

Tabla 1. Análisis espectrofotométrico de las muestras de DNA.

CONTROLES FEMENINOS

CLAVE	VOL. μl.	A260	A280	RELACION 260/280	CONC. μg./μl.	μgs. TOTALES
CF01	300	0.047	0.029	1.621	0.235	70.5
CF02	500	0.076	0.046	1.652	0.380	190.0
CF03	300	0.052	0.030	1.733	0.260	78.0
CF04	600	0.035	0.020	1.750	0.175	105.0
CF05	500	0.059	0.035	1.686	0.295	147.5
CF06	800	0.081	0.049	1.653	0.405	324.0
CF07	500	0.041	0.027	1.519	0.205	102.5
CF08	700	0.044	0.024	1.833	0.220	154.0
CF09	1200	0.075	0.032	2.344	0.375	450.0
CF10	200	0.046	0.024	1.917	0.575	115.0
CF11	150	0.026	0.016	1.625	0.325	48.8
CF12	200	0.042	0.029	1.448	0.525	105.0
CF13	300	0.035	0.022	1.591	0.438	131.3
CF14	500	0.035	0.023	1.522	0.438	218.8
CF15	300	0.059	0.030	1.967	0.295	88.5
CF16	300	0.062	0.026	2.385	0.310	93.0
CF17	300	0.205	0.126	1.627	1.025	307.5
CF18	300	0.056	0.037	1.514	0.280	84.0
CF19	400	0.121	0.079	1.532	0.605	242.0
CF20	400	0.258	0.143	1.804	1.290	516.0
CF21	300	0.230	0.128	1.797	1.150	345.0
CF22	150	0.214	0.113	1.894	1.070	160.5
CF23	350	0.168	0.098	1.714	0.840	294.0
CF24	350	0.070	0.040	1.750	0.350	122.5
CF25	300	0.105	0.055	1.909	0.525	157.5
CF26	300	0.360	0.205	1.756	1.800	540.0

PROMEDIO DE LA RELACION 260/280	1.752
---------------------------------	-------

PROMEDIO DE μgs. TOTALES	199.6
--------------------------	-------

Tabla 2. Análisis espectrofotométrico de las muestras de DNA.

CONTROLES MASCULINOS

CLAVE	VOL. $\mu\text{l.}$	A260	A280	RELACION 260/280	CONC. $\mu\text{g./}\mu\text{l.}$	$\mu\text{gs.}$ TOTALES
CM01	400	0.114	0.070	1.629	0.570	228.0
CM02	350	0.218	0.135	1.615	1.090	381.5
CM03	800	0.050	0.027	1.852	0.250	200.0
CM04	900	0.144	0.077	1.870	0.720	648.0
CM05	400	0.057	0.032	1.781	0.285	114.0
CM06	700	0.042	0.027	1.556	0.210	147.0
CM07	500	0.046	0.028	1.643	0.230	115.0
CM08	300	0.042	0.023	1.826	0.210	63.0
CM09	600	0.050	0.029	1.724	0.250	150.0
CM10	200	0.070	0.056	1.250	0.875	175.0
CM11	200	0.016	0.009	1.778	0.200	40.0
CM12	300	0.078	0.038	2.053	0.390	117.0
CM13	400	0.040	0.024	1.667	0.200	80.0
CM14	400	0.192	0.107	1.794	0.960	384.0
CM15	300	0.227	0.145	1.566	1.135	340.5
CM16	400	0.228	0.128	1.781	1.140	456.0
CM17	400	0.287	0.156	1.840	1.435	574.0
CM18	400	0.260	0.150	1.733	1.300	520.0
CM19	350	0.209	0.121	1.727	1.045	365.8
CM20	350	0.178	0.120	1.483	0.890	311.5
CM21	400	0.148	0.087	1.701	0.740	296.0
CM22	400	0.146	0.077	1.896	0.730	292.0

PROMEDIO DE LA RELACION 260/280	1.717
---------------------------------	-------

PROMEDIO DE $\mu\text{gs.}$ TOTALES	272.6
-------------------------------------	-------

Tabla 3. Análisis espectrofotométrico de las muestras de DNA.

TURNER

CLAVE	VOL. μl.	A260	A280	RELACION 260/280	CONC. μg./μl.	μgs. TOTALES
T01-92	400	0.224	0.128	1.750	1.120	448.0
T02-92	400	0.072	0.029	2.483	0.360	144.0
T03-92	300	0.297	0.163	1.822	1.485	445.5
T04-92	400	0.110	0.051	2.157	0.550	220.0
T05-92	300	0.082	0.046	1.783	0.410	123.0
T06-92	400	0.163	0.089	1.831	0.815	326.0
T07-92	350	0.227	0.135	1.681	1.135	397.3
T08-92	200	0.332	0.185	1.795	1.660	332.0
T09-92	350	0.194	0.108	1.796	0.970	339.5
T10-92	350	0.081	0.049	1.653	0.405	141.8
T11-92	400	0.358	0.206	1.738	1.790	716.0
T12-92	400	0.184	0.100	1.840	0.920	368.0
T13-92	400	0.256	0.161	1.590	1.280	512.0
T14-92	400	0.243	0.144	1.688	1.215	486.0
T15-92	400	0.238	0.130	1.831	1.190	476.0
T16-92	400	0.245	0.143	1.713	1.225	490.0
T17-92	400	0.187	0.113	1.655	0.935	374.0
T18-92	200	0.213	0.123	1.732	1.065	213.0
T19-92	400	0.274	0.159	1.723	1.370	548.0
T20-92	400	0.187	0.114	1.640	0.935	374.0
T21-92	400	0.338	0.186	1.817	1.690	676.0
T22-92	200	0.301	0.169	1.781	1.505	301.0
T23-92	350	0.346	0.198	1.747	1.730	605.5
T24-92	400	0.423	0.234	1.808	2.115	846.0

PROMEDIO DE LA RELACION 260/280	1.794
---------------------------------	-------

PROMEDIO DE μgs. TOTALES	412.6
--------------------------	-------

Tabla 4. Análisis espectrofotométrico de las muestras de DNA.

DISGENESIA GONADAL MIXTA

CLAVE	VOL. μ.	A260	A280	RELACION 260/280	CONC. μg./μl.	μgs. TOTALES
DG01-92	300	0.430	0.307	1.401	2.150	645.0
DG02-92	300	0.668	0.467	1.430	3.340	1002.0
DG03-92	400	0.292	0.176	1.659	1.460	584.0
DG04-92	300	0.234	0.138	1.696	1.170	351.0
DG05-92	400	0.374	0.199	1.879	1.870	748.0
DG06-92	500	0.464	0.276	1.681	2.320	1160.0
DG07-92	500	0.170	0.104	1.635	0.850	425.0
DG08-92	400	0.358	0.208	1.721	1.790	716.0
DG09-92	200	0.170	0.082	2.073	0.850	170.0
DG10-92	400	0.413	0.232	1.780	2.065	826.0

PROMEDIO DE LA RELACION 260/280	1.696
---------------------------------	-------

PROMEDIO DE μgs. TOTALES	662.7
--------------------------	-------

Tabla 5. Análisis espectrofotométrico de las muestras de DNA.

HERMAFRODITAS VERDADEROS

CLAVE	VOL. μ l.	A260	A280	RELACION 260/280	CONC. μ g/ μ l	μ gs. TOTALES
HV01-92	300	0.732	0.488	1.500	3.660	1098.0
HV02-92	300	0.654	0.457	1.431	3.270	981.0
HV03-92	300	0.156	0.088	1.773	0.780	234.0
HV04-92	400	0.218	0.111	1.964	1.090	436.0
HV05-92	300	0.174	0.100	1.740	0.870	261.0
HV06-92	400	0.200	0.127	1.575	1.000	400.0
HV07-92	300	0.302	0.166	1.819	1.510	453.0

PROMEDIO DE LA RELACION 260/280	1.686
---------------------------------	-------

PROMEDIO DE μ gs. TOTALES	551.9
-------------------------------	-------

Tabla 6. Análisis espectrofotométrico de las muestras de DNA.

VARONES XX

CLAVE	VOL. μ l.	A260	A280	RELACION 260/280	CONC. μ g/ μ l	μ gs. TOTALES
VX01-92	400	0.310	0.189	1.640	1.550	620.0
VX02-92	300	0.089	0.043	2.070	0.445	133.5
VX03-92	250	0.049	0.032	1.531	0.245	61.3
VX04-92	350	0.275	0.168	1.637	1.375	481.3

PROMEDIO DE LA RELACION 260/280	1.720
---------------------------------	-------

PROMEDIO DE μ gs. TOTALES	324.0
-------------------------------	-------

Tabla 7. Electroforesis de las muestras de DNA.

CONTROLES FEMENINOS

CLAVE	BANDA DE ALTO PESO MOLECULAR	CALIDAD
CF01	presente	sin degradar
CF02	presente	sin degradar
CF03	presente	sin degradar
CF04	presente	barrido
CF05	presente	poco barrido
CF06	presente	barrido
CF07	presente	sin degradar
CF08	presente	poco barrido
CF09	presente	sin degradar
CF10	presente	sin degradar
CF11	presente	sin degradar
CF12	presente	sin degradar
CF13	presente	sin degradar
CF14	presente	poco barrido
CF15	presente	poco barrido
CF16	presente	poco barrido
CF17	presente	sin degradar
CF18	presente	poco barrido
CF19	presente	barrido
CF20	presente	sin degradar
CF21	presente	poco barrido
CF22	presente	sin degradar
CF23	presente	sin degradar
CF24	presente	barrido
CF25	presente	sin degradar
CF26	presente	poco barrido

Tabla 8. Electroforesis de las muestras de DNA.

CONTROLES MASCULINOS

CLAVE	BANDA DE ALTO PESO MOLECULAR	CALIDAD
CM01	presente	sin degradar
CM02	presente	sin degradar
CM03	presente	poco barrido
CM04	presente	poco barrido
CM05	presente	sin degradar
CM06	presente	sin degradar
CM07	presente	poco barrido
CM08	presente	sin degradar
CM09	presente	barrido
CM10	presente	sin degradar
CM11	presente	barrido
CM12	presente	poco barrido
CM13	presente	poco barrido
CM14	presente	sin degradar
CM15	presente	poco barrido
CM16	presente	sin degradar
CM17	presente	sin degradar
CM18	presente	sin degradar
CM19	presente	poco barrido
CM20	presente	poco barrido
CM21	presente	poco barrido
CM22	presente	sin degradar

Tabla 9. Electroforesis de las muestras de DNA.

TURNER

CLAVE	BANDA DE ALTO PESO MOLECULAR	CALIDAD
T01-92	presente	poco barrido
T02-92	presente	muy barrido
T03-92	presente	poco barrido
T04-92	presente	sin degradar
T05-92	presente	sin degradar
T06-92	presente	poco barrido
T07-92	presente	poco barrido
T08-92	presente	barrido
T09-92	presente	sin degradar
T10-92	presente	sin degradar
T11-92	presente	poco barrido
T12-92	presente	sin degradar
T13-92	presente	sin degradar
T14-92	presente	poco barrido
T15-92	presente	barrido
T16-92	presente	barrido
T17-92	presente	barrido
T18-92	presente	poco barrido
T19-92	presente	poco barrido
T20-92	presente	sin degradar
T21-92	presente	sin degradar
T22-92	presente	poco barrido
T23-93	presente	poco barrido
T24-92	presente	barrido

Tabla 10. Electroforesis de las muestras de DNA.

DISGENESIA GONADAL MIXTA

CLAVE	BANDA DE ALTO PESO MOLECULAR	CALIDAD
DG01-92	presente	poco barrido
DG02-92	presente	poco barrido
DG03-92	presente	sin degradar
DG04-92	presente	sin degradar
DG05-92	presente	poco barrido
DG06-92	presente	sin degradar
DG07-92	presente	sin degradar
DG08-92	presente	poco barrida
DG09-92	ND	
DG10-92	presente	sin degradar

ND: MUESTRA NO ESTUVO DISPONIBLE.

Tabla 11. Electroforesis de las muestras de DNA.

HERMAFRODITAS VERDADEROS

CLAVE	BANDA DE ALTO PESO MOLECULAR	CALIDAD
HV01-92	presente	poco barrido
HV02-92	presente	poco barrido
HV03-92	presente	poco barrido
HV04-92	presente	sin degradar
HV05-92	presente	poco barrido
HV06-92	presente	sin degradar
HV07-92	presente	barrida

Tabla 12. Electroforesis de las muestras de DNA.

VARONES XX

CLAVE	BANDA DE ALTO PESO MOLECULAR	CALIDAD
VX01-92	presente	barrido
VX02-92	presente	sin degradar
VX03-92	presente	barrido
VX04-92	presente	sin degradar

Tabla 13. Datos clínicos.

TURNER

CLAVE	CARIOTIPO
T01-92	45,X/46,X+MAR
T02-92	45,X
T03-92	45,X/46,Xi(Xq)/47,Xi(Xq)i(Xq)/48,Xi(Xq)i(Xq)i(Xq)
T04-92	45,X/46,XY
T05-92	45,Xi(Xq)
T06-92	45,X
T07-92	45,X
T08-92	45,X
T09-92	45,X
T10-92	45,X/46,Xr(X)
T11-92	45,X
T12-92	45,X
T13-92	45,X
T14-92	45,X/46,Xr(X)
T15-92	45,X/46,Xi(Xq)
T16-92	45,X
T17-92	45,X
T18-92	45,X
T19-92	45,X
T20-92	45,X
T21-92	45,X
T22-92	45,X
T23-92	45,X
T24-92	45,X/46,Xidic(Xq)

Porcentaje del cariotipo 45,X	66.66%
-------------------------------	--------

Tabla 14. Datos clínicos.

DISGENESIA GONADAL MIXTA

CLAVE	CARIOTIPO	GONADA DER.	GONADA IZQ.
DG01-92	45,X/46,Xdic(Y)	estria	testículo
DG02-92	45,X/46,XY	testículo	estria
DG03-92	45,X/46,Xidic(Y)	estria	testículo
DG04-92	45,X/46,XY	estria	testículo
DG05-92	N.D.	N.D.	N.D.
DG06-92	45,X/46,XY	gonado- bastoma	estria
DG07-92	46,XY	estria	testículo
DG08-92	45,X/46,XY	N.D.	N.D.
DG09-92	45,X/46,XY	estria	testículo
DG10-92	45,X/46,XY	N.D.	N.D.

N.D.: DATOS NO DISPONIBLES

Tabla 15. Datos clínicos.

HERMAFRODITAS VERDADEROS

CLAVE	CARIOTIPO	GONADA DER.	GONADA IZQ.
HV01-92	46,XX	ovario	ovotestes
HV02-92	46,XX/47,XXY	ovotestes	ovario
HV03-92	46,XX	testículo	ovotestes
HV04-92	papá de HV03-92	testículo	testículo
HV05-92	46,XX/46,XY	N.D.	N.D.
HV06-92	46,XX/46,XY	ovotestes	ovotestes
HV07-92	46,XX/46,XY	N.D.	N.D.

N.D.: DATOS NO DISPONIBLES.

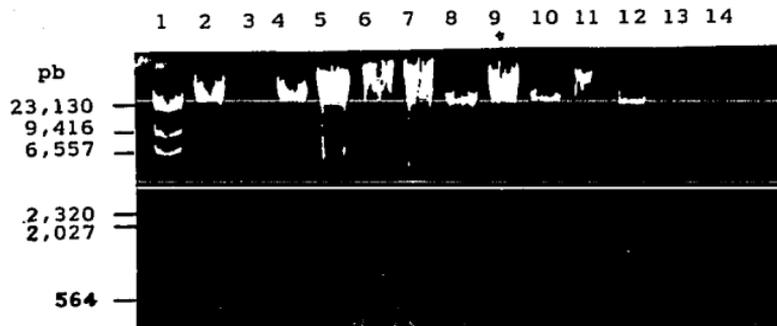


Fig. 8 Electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio. Se usan 2 microgramos de DNA por carril. Carril 1: marcador de peso molecular, λ Hind III. Carriles del 2 al 14: controles femeninos del 1 al 13.

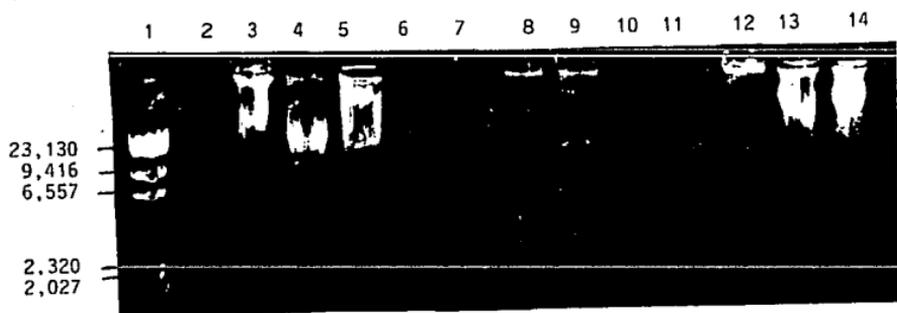


Fig. 9. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio. Se usan 2 microgramos de DNA por carril. Carril 1: marcador de peso molecular, λ Hind III. Carriles del 2 al 14: Turner de 01 a 13.

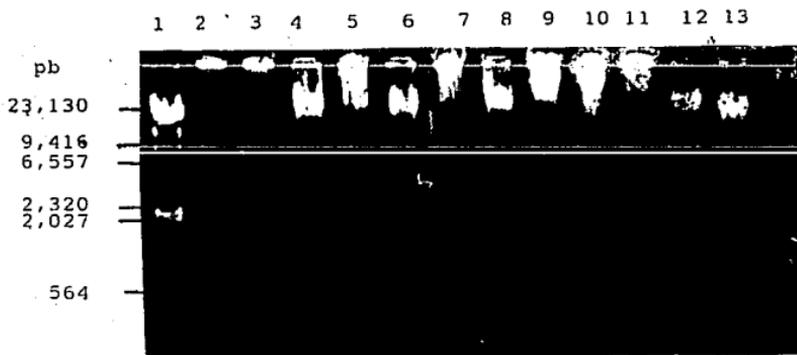


Fig. 10 Electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio. Se usan 2 microgramos de DNA por carril. Carril 1: Marcador de peso molecular, λ Hind III. Carriles del 2 al 7: hermafroditas verdaderos del O1 al O6. Carriles del 8 al 11: varones XX del O1 al O4. Carriles 12 y 13: pacientes Turner 14 y 15.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

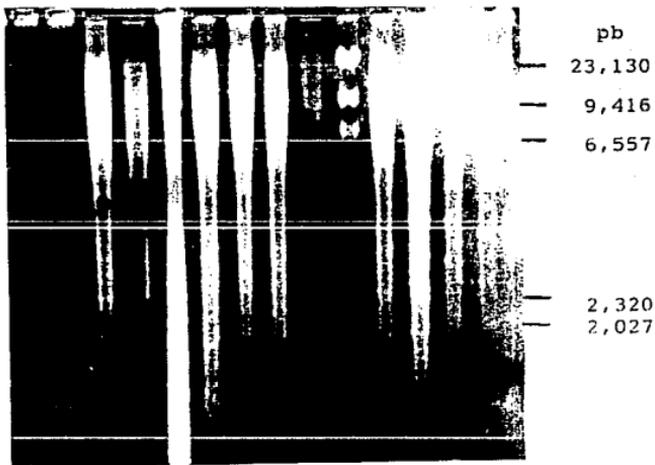


Fig. 11 Electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio. DNA digerido con Eco RI. Carriles del 1 al 9: disgenesia gonadales mixtas 01 a 09. Carril 10: marcador de peso molecular, λ Hind III. Carriles 11 y 12: controles masculinos 01 y 02. Carriles 13 y 14: controles femeninos 01 y 02.

VI. DISCUSION

El primer paso en la elaboración del banco de DNA fue la búsqueda de varias técnicas de extracción de DNA a partir de sangre periférica. Para ello fueron consultados tanto manuales de biología molecular como algunos protocolos establecidos en otros laboratorios. Se eligió el Manual de Biología Molecular de la Secretaría de Salud elaborado por la Dra. Gorodezky (27). Los criterios para su elección fueron los siguientes:

- Disponibilidad** de material y reactivos. El material que se requiere para esta técnica (tubos, pipetas, vasos de precipitado, matraces aforados) se encuentra, por su gran utilidad, en cualquier laboratorio. En general, todos los reactivos estuvieron disponibles en el Servicio de Genética, excepto SDS y Proteinasa K, los cuales tuvieron que solicitarse en un principio.
- Equipo.** Para esta técnica se ocupa muy poco equipo (centrífuga y baño María), el cual estuvo disponible en el Servicio de Genética del Hospital General de México SSA.
- Accesibilidad.** Aunque se requieren dos días para la extracción de DNA, la técnica no es muy complicada. Además, esta técnica es utilizada en varios laboratorios de Genética, en los cuales hubo la facilidad de ver el procedimiento y de contar con el asesoramiento técnico.

Debido a que algunos reactivos y material de consumo tuvieron que ser pedidos al extranjero, fue necesario esperar un tiempo para su obtención. Una vez que se contó con todos los reactivos, la preparación de las soluciones no presentó mayor problema.

Se procedió entonces a la estandarización de la técnica. Para ello se realizaron extracciones de DNA a partir de sangre de voluntarios, siguiendo paso a paso la técnica de la Dra. Gorodezky(27). Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que al hacer el análisis espectrofotométrico se obtuvieron relaciones 260/280 muy bajas (en el orden de 1.2), indicando la presencia de altas concentraciones de proteínas. Además, el rendimiento obtenido era muy bajo y el DNA obtenido se compactaba, por lo cual se disolvía con mucha dificultad.

Se analizó la situación con el fin de determinar qué era lo que estaba sucediendo. Se volvieron a preparar las soluciones de lisis de los glóbulos, ya que se pensó que pudo haber algún error en su elaboración. Sin embargo, se siguieron obteniendo los mismos resultados. Debido a esto, se consideraron otras posibles fuentes de error, como el fenol. En un principio, éste era J.T.Baker y, debido a su baja pureza, era necesario destilarlo. Se cambió por un fenol de otra marca (Merck), de mayor calidad, el cual no requería ser destilado. Inmediatamente, se obtuvieron mejores resultados en cuanto a las relaciones, siendo éstas mayores que las anteriores. A pesar de esto, seguía obteniéndose un bajo rendimiento. En la técnica de la Dra. Gorodezky(27) se realizan las dos primeras extracciones empleando únicamente fenol. Se observó que después de la segunda extracción la fase acuosa disminuía notablemente. Después de consultar la bibliografía(107) se optó por realizar estas extracciones empleando simultáneamente fenol y cloroformo-isoamílico, ya que el cloroformo estabiliza la frontera inestable entre las dos fases. Al utilizar ésta última mezcla, se reduce la cantidad de solución acuosa retenida en la fase orgánica, para maximizar el rendimiento. Una vez que se modificó la técnica, los rendimientos obtenidos fueron mayores además de que la contaminación proteica disminuyó considerablemente. Macroscópicamente, la cantidad de DNA era notablemente mayor a la obtenida anteriormente; además, su aspecto era diferente, ya que no se compactaba, con lo cual se disolvía más rápidamente.

A partir de este momento, los cambios que se realizaron fueron para obtener aún mejores rendimientos. En un principio se utilizaron tubos de 15 ml de polipropileno y después se cambiaron por tubos de vidrio de 13 x 100. Esto se hizo ya que en un principio, después de la primera centrifugación, se eliminaba únicamente el plasma quedando tanto los glóbulos blancos como los rojos, no pudiéndose eliminar gran parte de éstos últimos a pesar de repetidos lavados con BLGR. Al utilizar tubos de vidrio de 13 x 100, fue más fácil visualizar la capa de glóbulos blancos, por lo que se optó por extraer ésta, sin eliminar el plasma, evitando el exceso de glóbulos rojos, lo cual favoreció tanto a la pureza como al rendimiento.

La estandarización de la técnica se realizó únicamente con controles tanto femeninos como masculinos, y una vez que los resultados obtenidos fueron satisfactorios, se procedió a extraer el DNA de los pacientes.

Ya que en el Servicio de Genética no se cuenta con un espectrofotómetro adecuado, las muestras se leyeron en el Servicio de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología. Para la electroforesis en gel de agarosa se siguió el protocolo descrito en el Manual de Biología Molecular(107).

La relación 260/280 óptima es mayor de 1.7.(108) Sin embargo, una relación alrededor de 1.6 se considera buena en la mayoría de los laboratorios, ya que se ha visto que a pesar de tener proteínas, éstas no se encuentran en cantidad suficiente para interferir con las enzimas de restricción. En cuanto al rendimiento, se ha establecido que a partir de 20 ml de sangre, se obtienen aproximadamente 200 μg de DNA, lo cual representa una buena cantidad si se toma en cuenta que, por ejemplo, para la hibridización tipo Southern se requieren 10 μg . y para PCR aun menos.(107)

En la electroforesis el corrimiento del DNA depende de su tamaño. De tal forma que el DNA de alto peso molecular migra en menor proporción que el de bajo peso. Por lo que el DNA de alto peso molecular se observa en la parte superior del gel. La migración depende del tiempo de corrimiento de ahí que sea necesario incluir un marcador de peso molecular.

Como puede observarse en la **tabla 1**, en general, todas las muestras de los controles femeninos tienen una relación arriba de 1.6, excepto seis, que se encuentran en valores menores. En el caso del CF 12 tiene una relación de 1.448, pero en la electroforesis se observa una banda de alto peso molecular, sin degradar, por lo que se considera que es una buena muestra. Este criterio se aplicó para incluir en el banco de DNA aquellas muestras que tuvieron relaciones por debajo de 1.6. Como puede verse, la cantidad total de DNA es muy variable, ya que la estandarización de la técnica se hizo con los controles. En la **tabla 7** se puede observar que todas las muestras presentan una banda de alto peso molecular, lo cual es muy importante, ya que para la hibridización tipo Southern se requiere

DNA de estas características. Únicamente cuatro muestras estaban degradadas, aunque sí presentaban banda de alto peso molecular. El criterio que se aplica para determinar si una muestra tiene alto peso molecular consiste en comparar el corrimiento que ésta presenta con el marcador de peso molecular. Si la muestra presenta la banda de 23,130 pb, se considera que contiene DNA de alto peso molecular. Las muestras 2, 12 y 13 se observan muy tenues en la electroforesis, ya que se puso muy poca cantidad. Es importante hacer notar que las muestras degradadas no son ideales para la hibridización tipo Southern, sin embargo se conservan ya que pueden utilizarse para PCR.

En los controles masculinos (Tabla 2) se observa, en general, una relación muy cercana o arriba de 1.7. El CM 10 presenta una relación muy baja, sin embargo la muestra no fue descartada, ya que en la electroforesis (Tabla 8) se observa que el DNA es de alto peso molecular y no está degradado. En los casos en que la relación es muy baja, lo ideal sería realizar una segunda extracción para eliminar las proteínas. Sin embargo, al hacer esto, observamos que se pierde casi por completo la muestra. Todos los controles masculinos presentan banda de alto peso molecular, y únicamente dos se encuentran barridos. El DNA de los controles masculinos 1, 5, 8, 9 y 10 se observa muy tenue en la electroforesis, ya que se puso muy poca cantidad.

El promedio total del rendimiento de los controles masculinos fue mayor que el de los controles femeninos.

En las muestras de las pacientes con síndrome de Turner (Tabla 3), en general todas tienen una buena relación 260/280, así como un rendimiento adecuado. En la electroforesis (Tabla 9) se puede ver que todas presentan banda de alto peso molecular, aunque algunas de ellas se ven ligeramente barridas.

De acuerdo a las tablas de disgenesia gonadal mixta (Tablas 4 y 10), las primeras presentan una relación un poco baja, sin embargo en la electroforesis presentan alto peso molecular y están poco barridas. En cuanto al rendimiento, éste es muy bueno, ya que en general están arriba de los 350 microgramos totales.

Las primeras dos muestras de los hermafroditas verdaderos (Tablas 5 y 11) tienen una relación 260/280 menor que las demás, pero su rendimiento fue muy alto y en la electroforesis se observa banda de alto peso molecular y poco barrido, aunque debido a que se puso poca cantidad en el gel, la banda se observa muy tenue. El resto de las muestras se encuentran en buenas condiciones.

En cuanto a los varones XX (Tablas 6 y 12), las muestras 1 y 4 tienen un muy buen rendimiento y la relación es mayor de 1.6, y presentan alto peso molecular. Sin embargo, el rendimiento de las muestras 2 y 3 es bajo, aunque sí presentan la banda de alto peso molecular.

Es importante hacer notar que a pesar de que la técnica está estandarizada, la pureza de las muestras puede variar ya que no es una técnica automatizada. Como se trata de un método manual se da variabilidad multifactorial. La cual incluye que la cantidad de sangre varía, como también el tiempo y velocidad de agitación. Además es importante mencionar la variabilidad misma de la muestra biológica ya que se trata de diferentes pacientes.

Las muestras de pacientes que se encuentran degradadas y/o con altas concentraciones de proteínas deben conservarse considerando que no es fácil obtener nuevamente sangre del mismo paciente. Además, no debe olvidarse que estas muestras pueden utilizarse para PCR.

Es importante señalar que se han realizado hibridizaciones tipo Southern con el DNA de algunos pacientes y controles, obteniéndose buenos resultados (111).

En relación a los datos clínicos, en el síndrome de Turner (Tabla 13) llama la atención el alto porcentaje del cariotipo 45,X (66.66%), con respecto al reportado en la literatura [55%](55). Sin embargo, debe tomarse en cuenta que se trata de un grupo de 24

pacientes, por lo que no es muy representativo. Esto pueda deberse a que con las técnicas habituales de citogenética no se pueden detectar mosaicismos que se encuentren en bajas proporciones. Para esto va a ser de gran ayuda realizar hibridaciones tipo Southern para detectar mosaicismos ocultos en estas pacientes. Otra posible explicación es que, debido a que el único tejido analizado es la sangre periférica, el mosaicismo presente en otros tejidos no puede ser detectado. Esto ya ha sido reportado(66), observándose un incremento en el porcentaje de mosaicismos cuando se analiza más de un tejido tanto con técnicas moleculares como citogenéticas.

Respecto a los hermafroditas verdaderos (Tabla 15) y a las disgenesias gonadales mixtas (Tabla 14), no se puede concluir nada, ya que el número de pacientes cuyas muestras se trabajaron fue muy pequeño. Es interesante hacer notar que en el caso de las disgenesias gonadales mixtas, a pesar de ser un grupo pequeño, se refleja el alto riesgo de malignización, ya que en tan sólo 10 casos uno presenta gonadoblastoma. De aquí la importancia de determinar qué secuencias del cromosoma Y son las que están asociadas con gonoblastoma.

Se cumplió con todos los objetivos que se plantearon en un principio ya que se logró elaborar un banco de DNA de buena calidad, así como representativo de los padecimientos producidos por anomalías de la diferenciación sexual. Con esto se sentaron las bases experimentales para que posteriormente puedan hacerse otros bancos de diversas enfermedades hereditarias.

VII. CONCLUSIONES

- 1.- El rendimiento promedio de los controles masculinos es mayor que el de los femeninos debido a que las últimas muestras de los controles masculinos se trabajaron cuando ya se habían superado algunos problemas técnicos, lo cual aumentó el rendimiento.
- 2.- En general, los rendimientos de los controles tanto femeninos como masculinos, fueron menores que los obtenidos para los pacientes, debido a que los primeros se utilizaron en la estandarización de la técnica.
- 3.- Una segunda reextracción, con el fin de eliminar exceso de proteínas, no es adecuada ya que el rendimiento se ve notablemente disminuido, al grado de que se puede llegar a perder por completo la muestra de DNA.
- 4.- Se requiere tanto de la visualización en el gel de agarosa como del análisis espectrofotométrico para tener una idea más veraz de las condiciones en que se encuentra la muestra de DNA.
- 5.- De acuerdo a los resultados obtenidos, puede concluirse que la técnica ha sido estandarizada ya que se obtiene un DNA de buena calidad, con un buen rendimiento, por lo que es adecuado para las técnicas de biología molecular.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bartalos, M. and Baranki, T.A. **Medical cytogenetics**. Williams & Wilkins, Baltimore: 3 and 19, 1967.
- 2.- Mittwoch, Ursula. **Sex Chromosomes** Academic Press, San Diego: 1-10, 1967.
- 3.- Ford, E.H.R. **Human Chromosomes** Academic Press, San Diego: 4-7, 1973.
- 4.-Painter, Theophilus S. Mammalian Spermatogenesis. **J Exp Zool** 137: 291-335, 1923.
- 5.-Painter, Theophilus S. The Y-Chromosomes in Mammals. **Science** 53:503-504, 1921.
- 6.-Tjio, John Hin and Levan, A. The Chromosome Number of Man. **Hereditas** 42:1-6, 1956.
- 7.- Ford, C.E. and Hamerton, J.L. The Chromosomes of Man. **Nature** 178:1020-1023, 1956.
- 8.-Cuevas-Covarrubias, Sergio A. y Kofman-Alfaro, S.. El Cromosoma Y Humano. **Rev Invest Clin** 42:290-297, 1990.
- 9.- Stent, Gunther S. and Calendar, R. **Molecular Genetics**. 2º ed. W.H. Freeman, New York: 21-29, 1978.
- 10.- Davies, Kay E. The Application of DNA Recombinant Technology to the Analysis of the Human Genome and Genetic Disease. **Hum Genet** 58:351-357, 1981.
- 11.-Gómez E., María del Carmen. Perspectiva Molecular de la Teoría Evolutiva. **ICyT** 12:39-42, 1990.
- 12.- Harris, Rodney, *et al.* Molecular Genetics in the National Health Services in Britain. **J Med Genet** 26:219-225, 1989.
- 13.- Donis-Keller, Helen and Botstein, D. Recombinant DNA Methods: Applications to Human Genetics. In **Molecular Genetics in Medicine**, Childs, Barton Ed., Elsevier, New York:17-40, 1988.

- 14.- Alberts, Bruce, *et al.* **Molecular Biology of the Cell**, 2º ed., Garland Publishing, New York: 189-191,269-271, 1989.
- 15.- White, Ray y Lalouel, J.M. Cartografía Cromosómica con Marcadores de ADN. **Investigación y Ciencia Sci Am** 159:11-20, 1988.
- 16.- McKusick, Victor A. The Morbid Anatomy of the Human Genome: A Review of Gene Mapping in Clinical Medicine. **Medicine** 65:parte IV,1-7, 1986.
- 17.- Goodfellow, Peter N. J., Hawkins Ross and Sinclair A. H. Cloning the Mammalian Sex-Determining Gene, TDF. In **Genome Analysis. Volume 3: Genes and Phenotypes**. Davies Kay E and Tilghman S.M. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: 59-77, 1991.
- 18.- Lap-Cheese, Tsui and Estivill, X. Identification of Disease Genes on the Basis of Chromosomal Localization. In **Genome Analysis. Volume 3: Genes and Phenotypes**. Davies Kay E and Tilghman S.M. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor:1-36, 1991.
- 19.- Rossiter, Belinda J. F. and Caskey, C.T. Molecular Studies of Human Genetic Disease. **Facob J** 5:21-27, 1991.
- 20.- Southern, E. M. Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. **J Mol Biol** 98:503-517, 1975.
- 21.- Erlich, Henry A. Part One: Basic Methodology. In **PCR Technology**. Stockton Press, New York:1-5, 1987.
- 22.- Mullis, K.B. and Faloona, F. Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase Catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzimol** 155:335-350, 1987.
- 23.- Saiki, R.K. *et al.* Enzymatic Amplification of B-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science** 230:1350-1354, 1985.
- 24.- White, Thomas J., Arnheim, N. and Erlich, H.A.. The Polymerase Chain Reaction. **TIG** 5:185-189, 1989.

- 25.- Lynch, Jennifer R. and Brown, J.M. The Polymerase Chain Reaction: Current and Future Clinical Applications. **J Med Gen** 27:2-7, 1990.
- 26.- Yates, John R.W., Malcolm, S. and Read, A. P. Guidelines for DNA Banking. **J Med Genet** 26:245-250, 1989.
- 27.- Gorodezky, Clara et al. **Manual de Prácticas de Biología Molecular**. Depto. de Inmunogenética, INNN, México:1-6, 1990.
- 28.- Kofman-Alfaro, Susana y otros. Diferenciación Sexual Normal y Patológica. En **Genética Clínica**, Gulzar-Vázquez, J. Jesús, Ed., Manual Moderno. México:396-406, 1988.
- 29.- Huntington, F. Willard. **The Y Chromosome, Part A: Basic Characteristics of the Y Chromosome**. Alan R. Liss, New York:125-140, 1985.
- 30.- McLaren, Anne. What makes a man a man? **Nature** 346:216-217, 1990.
- 31.- Hawkins, J. Ross, Koopman, P. and Berta, P. Testis-Determining Factor and Y-Linked Sex Reversal. **Current Biol** 1:30-33, 1991.
- 32.- McLaren, Anne. Sex Determination in Mammals. **TIG** 4:153-157, 1988.
- 33.- Vergnaud G. et al. A Deletion Map of the Human Y Chromosome Based on DNA Hybridization. **Am J Hum Genet** 38:109-124, 1986.
- 34.- Page, D.C. et al. The Sex-Determining Region of the Human Y Chromosome Encodes a Finger Protein. **Cell** 51:1091-1104, 1987.
- 35.-Koopman, P.A. and Lovell-Badge, R. The ZFY Gene Family in Humans and Mice. **TIG** 7:132-136, 1991.
- 36.- Sinclair, A.H. Sequences Homologous to ZFY, a Candidate Human Sex-Determining Gene, are Autosomal in Marsupials. **Nature** 336:780-783, 1988.
- 37.-Koopman, P. et al. ZFY Gene Expression Patterns are not Compatible with a Primary Role in Mouse Sex Determination. **Nature** 342:940-942, 1989.
- 38.-Schneider-Gädick, Ansbart et al. ZFX has a Gene Structure Similar to ZFY, the Putative Human Sex Determinant, and Escapes X Inactivation. **Cell** 57:1247-1258, 1989.

- 39.- Palmer, M.S. *et al.* Genetic Evidence that ZFX is not the Testis-Determining Factor. **Nature** 342:937-939, 1989.
- 40.- Sinclair, Andrew H. *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature** 348:240-244, 1990.
- 41.- Koopman, Peter *et al.* Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. **Nature** 348:450-452, 1990.
- 42.-Koopman, Peter *et al.* Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry. **Nature** 351:117-121, 1991.
- 43.- Berta, Philippe *et al.* Genetic Evidence Equating SRY and the Testis-Determining Factor. **Nature** 348:448-450, 1990.
- 44.-Harley, Vincent R. *et al.* DNA Binding Activity of Recombinant SRY from Normal Males and XY Females. **Science** 255:453-456, 1992.
- 45.- Brown, Carolyn J. and Willard, H.F.. Localization of a Gene That Escapes Inactivation to the X Chromosome Proximal Short Arm: Implication for X Inactivation. **Am J Hum Genet** 46:273-279, 1990.
- 46.-Gartler, Stanley M. and Riggs, A. D. Mammalian X Chromosome Inactivation. **Ann Rev Genet** 17:155-190, 1983.
- 47.-Lyon, Mary F. The William Allan Memorial Award Address: X-Chromosome Inactivation and the Location and Expression of X-linked Genes. **Am J Hum Genet** 42:8-16, 1988.
- 48.-Brown, Carolyn J. *et al.* A Gene from the Region of the Human X Inactivation Centre is Expressed Exclusively from the Inactive X Chromosome. **Nature** 349:38-44, 1991.
- 49.- Lyon, Mary F. The Quest for the X Inactivation Centre. **TIG** 7:69-70, 1991.
- 50.- Brown, Carolyn J. *et al.* Localization of the X Inactivation Centre on the Human X Chromosome in Xq13. **Nature** 349:82-84, 1991.
- 51.-Davies, Kevin. The Essence of Inactivity. **Nature** 349:15-16, 1991.
- 52.- Berns, R.M. and Loey, M.N. **Principles of Physiology**. The C.V. Mosby Company, Saint Louis:579-588, 1990.

- 53.-Kofman-Alfaro, Susana, Merchant-Larios, H. y Pérez-Palacios, G. **Diferenciación Sexual: I. Bases Biológicas del Dimorfismo Sexual.** *Rev Invest Clín* 34:349-359, 1982.
- 54.- Simpson, J. **Disorders of Sexual Differentiation.** San Diego, Academic Press, San Diego:51-110, 1976.
- 55.- Salamanca, Fabio. **Citogenética Humana.** Médica Panamericana, México:107-115, 151-160, 1990.
- 56.- Turner, Henry. **A Syndrome of Infantilism, Congenital Webbet Neck and Cubitus Valgus.** *Endocrinol* 23:566-574, 1938.
- 57.- Wilkins, Lawson and Fleischmann, W. **Ovarian Agenesis.** *J Clin Endocrinol* 4:357-375, 1944.
- 58.- Ford, C.E. *et al.* **A Sex-Chromosome Anomaly in a Case of Gonadal Dysgenesis (Turner's Syndrome).** *Lancet*:711-753, 1959.
- 59.- Jacobs, P. A. *et al.* **A Cytogenetic and Molecular Reappraisal of a Series of Patients with Turner's Syndrome.** *Am Hum Genet* 54:209-223, 1990.
- 60.- Hall, Judith G. and Gillchrist, D.M.. **Turner Syndrome and its Variants.** *Pediatric Clinics of North America* 37:1421-1440, 1990.
- 61.- Williams, R.H. **Tratado de Endocrinología.** 6ª ed. Interamericana, México:485-493, 1985.
- 62.- Arenas Diaz, Silvia M. C. **Correlación Fenotipo-Cariotipo en Mujeres con Alteraciones Numéricas y Estructurales del Cromosoma X.** Tesis Profesional. Facultad de Química, UNAM, México: 100, 1990.
- 63.- Lothar, Pels *et al.* **Long-Term Follow-up in Females with Ullrich-Turner Syndrome.** *Clin Genet* 40:1-5, 1991.
- 64.- Gemmill, Robert M. *et al.* **Y Chromosome-Specific DNA Sequences in Turner-Syndrome Mosaicism.** *Am J Hum Genet* 41:157-167, 1987.

- 65.- Hook, E. B. and Warburton, D. The Distribution of Chromosomal Genotypes Associated with Turner's Syndrome: Livebirth Prevalence Rates and Evidence for Diminished Fetal Mortality and Severity in Genotypes Associated with Structural X Abnormalities or Mosaicism. **Hum Genet** 64:24-27, 1983.
- 66.- Held, K. R. et al. Mosaicism in 45,X Turner Syndrome: Does Survival in Early Pregnancy Depend on the Presence of Two Sex Chromosomes?. **Hum Genet** 88:288-294, 1992.
- 67.- Kelly, Thaddeus E., Ferguson, J.E. and Golden, W. Survival of Fetuses with 45,X: an Instructive Case and an Hypothesis. **Am J Med Genet**. 42:825-826, 1992. .
- 68.- Epstein, Charles J. **The Consequences of Chromosome Imbalance**. Cambridge University Press, 1986.
- 69.- Fisher, Elizabeth M.C. et al. 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, 1990.
- 70.- Ferguson-Smith M.A. Karyotype-Phenotype Correlations in Gonadal Dysgenesis and its bearing on the Pathogenesis of Malformations. **J Med Genet** 2:142-155, 1965.
- 71.- Therman, E. and Susman, B. The similarity of Phenotypic Effects caused by Xp and Xq Deletions in the Human Female: a Hypothesis. **Hum Genet** 85:175-183, 1990.
- 72.- Nonomura, N. et al. Mixed Gonadal Dysgenesis: Case Reports and a Review of 65 Japanese Cases. **Arch Androl** 26:15-19, 1991.
- 73.- Sohval, Arthur R. Hermaphroditism with "Atypical" or "Mixed" Gonadal Dysgenesis. **Am J Med** 36:281-292, 1964.
- 74.- Méndez, Juan Pablo y Kofman-Alfaro, S. Mixed Gonadal Dysgenesis: Clinical Cytogenetic Endocrinological and Histopathological Findings in 16 Patients. **Comunicación personal**, 1992.
- 75.-Donahoe, P.K., Crawford, J.D. and Hendren, H. Mixed Gonadal dysgenesis: pathogenesis and management. **J Pediatr Surg** 14:287-300, 1979.

- 76.- Robboy, S.J., *et al.* Dysgenesis of Testicular and Streak Gonads in the Syndrome of Mixed Gonadal Dysgenesis. *Hum Pathol* 13:700-716, 1982.
- 77.- McDonough, Paul G. and Thi Tho, P. The Spectrum of 45,X/46,XY Gonadal Dysgenesis and its Implications. *Pediatr Adol Gynecol* 1:1-17, 1983.
- 78.- Davidoff, Frank and Federman, D. Mixed Gonadal Dysgenesis. *Pediatr* 52:725-739, 1973.
- 79.- Labhart, Alexis. *Endocrinología Clínica. Teórica y Práctica*. Salvat, Madrid:666-669, 1990.
- 80.- Berkovitz, Gary D. *et al.* Clinical and Pathologic Spectrum of 46,XY Gonadal Dysgenesis: its Relevance to the Understanding of Sex Differentiation. *Medicine* 70:375-383, 1991.
- 81.- Berkovitz, Gary D. *et al.* The Role of the Sex-Determining Region of the Y Chromosome (SRY) in the Etiology of 46,XX True Hermaphroditism. *Hum Genet* 88:411-416, 1992.
- 82.- Van Niekerk, Willem A. and Retief, A.E.. The Gonads of Human True Hermaphrodites. *Hum Genet* 58:117-122, 1981.
- 83.- Olsson, Carl A. *et al.* True Hermaphroditism. *J Urol* 105:586-590, 1971.
- 84.- Greenspan, Forsham. *Endocrinología Básica y Clínica*. Manual Moderno, México:436, 1988.
- 85.- Braren, Victor *et al.* True Hermaphroditism: a Rational Approach to Diagnosis and Treatment. *Urol* 15:569-575, 1980.
- 86.- Aleksander, Talerman *et al.* True Hermaphrodite with Bilateral Ootestes, Bilateral Gonadoblastomas and Dysgerminomas, 46,XX/46,XY Karyotype, and a Successful Pregnancy. *Cancer* 66:2668-2672, 1990.
- 87.- Eddine Abbas, Nacer *et al.* A Possible Common Origin of "Y-Negative" Human XY Males and XX True Hermaphrodites. *Hum Genet* 84:356-360, 1990.
- 88.- Ferguson-Smith, M.A. X-Y Chromosomal Interchange in the Aetiology of True Hermaphroditism and of XX Klinefelter's Syndrome. *Lancet*:475-476, 1966.

- 89.- Waibal, F. *et al.* Absence of Y-Specific DNA Sequences in Human 46,XX True hermaphrodites and in 45,X Mixed Gonadal Dysgenesis. *Hum Genet* 76:332-336, 1987.
- 90.- Raine, J. *et al.* Absence of Y Specific DNA Sequences in two Siblings with 46,XX Hermaphroditism. *Arch Dis Child* 64:1185-1187, 1989.
- 91.- Gessler M., Thomas G.H. *et al.* .A Deletion Map of the WAGR Region of Chromosome 11. *Am J Hum Genet* 44:486-496, 1989.
- 92.- Hall B.D. and Spranger, N.W. Campomelic Dysplasia: further Elucidation of a Distinct Entity. *Am J Dis Child* 134:285-289, 1980.
- 93.- Washburn L.L. and Eicher, E.M. Sex Reversal in XY Caused by dominant Mutation on Chromosome 17. *Nature* 303:338-340, 1983.
- 94.- De la Chapelle, Albert *et al.* XX Sex Chromosomes in a Human Male. *Acta Med Scand (Suppl.)* 412:25-38, 1964.
- 95.- Page, David C., De la Chapelle, A. and Weissenbach, J. Chromosome Y-Specific DNA in Related Human XX Males. *Nature* 315:224-226, 1985.
- 96.- Andersson, Mea, Page, D. and De la Chapelle, A. Chromosome Y-Specific DNA is Transferred to the Short Arm of X Chromosome in Human XX Males. *Science* 233:786-788, 1986.
- 97.- Schemp, W. *et al.* Localization of Y Chromosome Sequences and X Chromosomal Replication Studies in XX Males. *Hum Genet*, 1989.
- 98.- Van Dyke, D.C. *et al.* Clinical Management Issues in Males with Sex Chromosomal Mosaicism and Discordant Phenotype/Sex Chromosomal Patterns. *Clin Pediatr* 30:15-21. 1991.
- 99.- De la Chapelle, Albert. The Etiology of Maleness in XX Men. *Hum Genet* 58:105-116, 1981.
- 100.- Skordis, Nicos A. *et al.* Familial 46,XX Males Coexisting with Familial 46,XX True Hermaphrodites in same Pedigree. *J Pediatr* 110:244-248, 1987.

- 101.- De la Chapelle, Albert *et al.* Genetic Evidence of X-Y Interchange in a Human XX Male. **Nature** 307:170-171, 1984.
- 102.- Magenis, R. Ellen *et al.* Further Cytologic Evidence for Xp-Yp Translocation in XX Males Using In Situ Hybridization with Y-Derived Probe. **Hum Genet** 75:228-233, 1987.
- 103.- Petit, C. *et al.* An Abnormal terminal X-Y Interchange Accounts for most but not all cases of Human XX Maleness. **Cell** 49:595-602, 1987.
- 104.- Ferguson-Smith, M.A. *et al.* Genotype-Phenotype Correlations in XX Males and their Bearing on Current Theories of Sex Determination. **Hum Genet** 84:198-202, 1990.
- 105.- Ternes Pereira, Eliana *et al.* 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, 1991.
- 106.- Ferguson-Smith M.A. *et al.* The Secret of Sex. **Lancet** i. 336:809-810, 1990.
- 107.- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook **Journal of Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2^o ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- 108.- Ausubel M., Frederick *et al.* **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, New York, 1987.
- 109.- Lehninger, Albert L. **Bioquímica**. 2^a ed. Omega, Barcelona:185, 1985.
- 110.- Phenol Equilibration. Boletín Técnico. Indianapolis, **Boehringer Mannheim**, Indianapolis, 1990.
- 111.- López L., Marisol. Resultados de hibridación tipo Southern de algunos pacientes y controles del banco de DNA. **Comunicación personal**, 1992.