



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

0346 4
2eje.

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Investigación de secuencias derivadas del
cromosoma Y en individuos con diferentes tipos
de disgenesia gonadal

T E S I S

Que para obtener el grado Académico de

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

p r e s e n t a

Q. F. B. MARISOL LOPEZ LOPEZ

Director de Tesis: Méd. Cir. Esp. Susana Kofman Epstein

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA:

A mis padres: José López Gimeno y Carmen López de López.

A mi esposo: Rafael Familiar González.

A mis hijas: Itziar y Mariel.

A mi hermano: José Manuel López López.

A mis cuñadas: Irene, Leticia y MarInella.

A mis cuñados: Javier y Gerardo.

A mis sobrinas: Andrea, Giulia y Oriana.

A mis sobrinos: Diego, Gerardo e Isaac.

A mis suegros: Socorro González y Javier Familiar.

A los miembros del Jurado:

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz.

Méd. Cir. Esp. Susana H. Kofman Epstein.

Dr. Horacio Merchant Laríos.

Méd. Cir. Gregorio Pérez Palacios.

Méd. Cir. Fabio A. Salamanca Gómez.

M. en C. Víctor M. Valdés López.

Dr. Marco A. Cerbón Cervantes.

A todos los pacientes con anomalías de la diferenciación sexual.

AGRADECIMIENTOS:

**Asesora de Tesis: Dra. Susana Kofman,
Servicio de Genética, Hosp. General de México, SSa.
Facultad de Medicina, UNAM.**

**Dr. Guillermo Alfaro Martínez,
Departamento de Inmunología, IBM, UNAM.
Instituto Nacional de Cancerología, SSa.**

**Dr. Robert P. Erickson,
Universidad de Arizona (Tucson).**

**Dr. Juan Pablo Méndez,
Dra. Patricia Canto,
Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán.**

**Q.F.B. Alicia Cervantes Peredo,
Servicio de Genética, Hosp. General de México, SSa.**

**Miembros del laboratorio,
Instituto Nacional de Cancerología, SSa.
Servicio de Genética, Hosp. General de México, SSa.**

**Este proyecto fue apoyado por:
Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA),
Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), Hos-
pital General de México SSa y Departamento de Sistemas
Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
(UAM-X).**



M.C. ESCHER. Mosalco II (1957)

INDICE

RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCION	4
1.1 DIFERENCIACION SEXUAL NORMAL	4
1.1.1 ETAPA CROMOSOMICA	4
1.1.1.1 EL GEN ZFY	5
1.1.1.2 EL GEN SRY	7
1.1.2 ETAPA GONADAL	11
1.1.2.1 DIFERENCIACION TESTICULAR	13
1.1.2.2 DIFERENCIACION OVARICA	14
1.1.2 ETAPA FENOTIPICA	15
1.2 CROMOSOMAS SEXUALES EN EL HUMANO	15
1.2.1 CROMOSOMA Y	15
1.2.1.1 ESTRUCTURA	16
1.2.1.2 GENES	17
1.2.1.3 ANORMALIDADES DEL CROMOSOMA Y	18
1.2.2 CROMOSOMA X	18
1.2.2.1 ESTRUCTURA	19
1.2.2.2 INACTIVACION DEL CROMOSOMA X	19

1.2.2.3	ANORMALIDADES DEL CROMOSOMA X	21
1.3	SECUENCIAS HOMOLOGAS EN LOS CROMOSOMAS SEXUALES	22
1.3.1	REGION PSEUDOAUTOSOMICA	23
1.3.2	GENES PSEUDOAUTOSOMICOS	25
1.4	DISGENESIA GONADAL	25
1.4.1	SINDROME DE TURNER	25
1.4.2	DISGENESIA GONADAL MIXTA	30
1.4.3	DISGENESIA GONADAL PURA 46, XY	31
2.0	OBJETIVOS	34
3.0	MATERIALES Y METODOS	35
4.0	RESULTADOS	42
5.0	DISCUSION	61
6.0	CONCLUSIONES	69
7.0	BIBLIOGRAFIA	70

RESUMEN

En el ser humano, el desarrollo fenotípico masculino o femenino es resultado de una cascada de eventos moleculares y morfológicos complejos que deben ocurrir apropiadamente en tiempo y en secuencia durante la ontogenia.

El sexo genético masculino del embrión es determinado por su constitución cromosómica, en particular por la presencia del gen *TDF* (factor determinante testicular) localizado en el brazo corto del cromosoma Y. El sexo gonadal masculino, o la formación del testículo, es subsecuentemente determinado por este gene y por otras vías secundarias. A su vez, el testículo produce hormonas que regulan la diferenciación de los genitales internos y externos, resultando en el sexo fenotípico masculino.

En el embrión femenino, la ausencia de cromosoma Y, y por ende de *TDF*, determina que la gónada bipotencial se desarrolle como ovario. La baja y tardía producción de AMH permite el desarrollo de los ductos Mülllerianos, mientras que los ductos Wolffianos sufren regresión por ausencia de testosterona, resultando en la diferenciación de los genitales internos y externos femeninos.

El desarrollo reciente de la genética molecular permitió la localización del gen *SRY* en una región de 35 kb adyacente al límite pseudoautosómico en Yp. Este gen codifica para la síntesis de una proteína con una caja HMG con capacidad de unión a DNA. Las evidencias que demuestran que el gene *SRY* es equivalente a *TDF* son principalmente: el desarrollo masculino resultante en ratones transgénicos XX, y la presencia de mutaciones en algunos casos de reversión sexual humana (mujeres XY).

El gene *ZFY*, previamente sugerido como *TDF*, está localizado a 160 kb del límite pseudoautosómico de Yp. Las evidencias que excluyeron a *ZFY* como *TDF* son principalmente: el descubrimiento de que secuencias homólogas a la clona *ZFY* humana son autosómicas en marsupiales, el hallazgo de la expresión de los homólogos murinos *Zfy-1* y *Zfy-2* en células germinales, la ausencia de *ZFY* en algunos varones XX y la observación de que el gene homólogo *ZFX* (Xp) escape al mecanismo de inactivación.

Aun cuando la función del gen *ZFY* no es clara, se ha propuesto que actúe durante la espermatogénesis. Además, considerando al síndrome de Turner como una haploinsuficiencia, los

genes *ZFY* y *RPS4Y* han sido sugeridos como genes anti Turner.

El cromosoma Y es pequeño, contiene muy pocos genes y su función principal es la determinación testicular. En contraste, el cromosoma X es grande y tiene miles de genes. La equivalencia en la dosis génica entre machos y hembras se logra mediante la inactivación transcripcional de uno de los cromosomas X en el núcleo de cada célula somática femenina.

Los cromosomas X y Y humanos comparten de manera significativa secuencias similares de DNA, probablemente debido a su origen evolutivo común. El segmento homólogo más estudiado es la región pseudoautosómica, a través del cual recombinan ambos cromosomas durante la meiosis masculina.

Tradicionalmente, la investigación en genética humana se ha realizado en individuos afectados mediante la historia clínica y familiar, el examen físico, algunos estudios de laboratorio y el análisis del árbol genealógico. Sin embargo, en los últimos años el desarrollo de técnicas moleculares de gran precisión ha permitido estudiar y diagnosticar padecimientos genéticos analizando el DNA del paciente y sus familiares.

La aplicación de esta metodología en diferentes trastornos de la diferenciación sexual ha permitido discriminar enfermedades fenotípicamente similares pero genotípicamente diferentes, además de entender más claramente algunos aspectos de la etiología de estos padecimientos.

Con el propósito de reconocer la presencia de secuencias específicas del cromosoma Y (región centromérica y genes *ZFY* y *SRY*) en individuos mexicanos con diferentes tipos de disgenesia gonadal, en la presente investigación se analizaron 40 pacientes con síndrome de Turner, 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta y 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY.

El análisis citogenético en sangre periférica de las 40 pacientes con síndrome de Turner mostró un complemento cromosómico 45,X en 25 casos (62.5%). Las 15 pacientes restantes (37.5%) presentaron un mosaico 45,X/46,XX (4 casos), 45,X/46,Xi(Xq) (4 casos), 45,X/46,X+mar (5 casos), 45,X/46,Xdel(Xp) (1 caso) y 45,X/46,XY (1 caso).

Los hallazgos moleculares en los casos con síndrome de Turner permitieron identificar 5 pacientes con secuencias del cromosoma Y en su genoma (T1, T3, T22, T31 y T32). Los casos T1 (45,X/46,XY) y T22 (45,X) sólo fueron positivos para la región centromérica, lo que permitió asumir que el marcador de T1 fuera derivado del cromosoma Y y que la paciente T22 presente un mosaico críptico con una segunda línea celular con cromosoma Y anormal, probablemente similar

al de T1. Los casos T3 (45,X/46,XY), T31 (45,X), y T32 (45,X) fueron positivos para la región centromérica y para los genes *ZFY* y *SRY*. En T3 se confirmó la normalidad de Yp, mientras que las pacientes T31 y T32 fueron consideradas mosaicos ocultos con una segunda línea celular con cromosoma Y normal o anormal.

Debido al elevado riesgo que presentan las pacientes con material genético derivado del Y y gónadas disgenéticas de desarrollar gonadoblastomas, se sugirió gonadectomía bilateral preventiva en las pacientes T1, T3, T22, T31 y T32.

Las demás pacientes con síndrome de Turner (n=35) fueron negativas para todas las secuencias del cromosoma Y analizadas. Estos datos permitieron concluir que los cromosomas marcadores de las pacientes T9, T13 y T35 sean derivados del cromosoma X.

En los 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta el análisis citogenético reveló un cariotipo 45,X/46,XY. El análisis molecular de estos casos mostró la presencia de la región centromérica y de los genes *ZFY* y *SRY*, confirmando la existencia de un cromosoma Y con un brazo corto aparentemente normal.

Los estudios moleculares en las 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY mostraron la presencia de la región centromérica y de los genes *ZFY* y *SRY*. En ambos casos los genes presentan el tamaño molecular apropiado, aunque no se realizaron estudios de secuenciación que permitieran demostrar o descartar la presencia de mutaciones.

La diferenciación sexual en el humano es aún un proceso no totalmente elucidado. La identificación del gen *SRY* como *TDF* constituye sólo un paso en este mecanismo, faltando el esclarecimiento de los eventos morfológicos y la detección de otros genes que participen en la cascada que conduce al fenotipo masculino normal. Este trabajo contribuye al entendimiento del proceso de diferenciación sexual normal y patológico en el humano, al analizar a un número importante de pacientes con diferentes tipos de disgenesia gonadal.

1.0 INTRODUCCION

1.1 DIFERENCIACION SEXUAL NORMAL

La diferenciación sexual es un proceso dinámico que está sujeto a un programa secuencial, ordenado e interrelacionado que se lleva a cabo en tres etapas consecutivas: el establecimiento del sexo cromosómico durante la fertilización, el desarrollo del sexo gonadal y el desarrollo de las características sexuales secundarias, colectivamente denominadas sexo fenotípico (George, 1992).

Este paradigma constituye el dogma central de la diferenciación sexual y fue formulado por Alfred Jost a finales de los años cuarentas para explicar los resultados de los experimentos de castración fetal que realizó en conejos. Él observó que la extirpación de las gónadas (ovarios o testículos) antes de la diferenciación sexual ocasionaba invariablemente que los embriones castrados se desarrollaran como hembras (Jost, 1953).

1.1 ETAPA CROMOSOMICA

En 1923, se demostró citológicamente la existencia de los cromosomas X y Y en el humano (Painter, 1923). Por analogía con *Drosophila*, se asumió que la determinación sexual en los mamíferos estaba mediada por la proporción entre el número de cromosomas X y autosomas presentes. Sin embargo, en 1959 cuatro reportes en la literatura pusieron de manifiesto el papel crucial del cromosoma Y en la determinación sexual de los mamíferos: Welshons y Russell (1959) demostraron que los ratones XO eran hembras; Jacobs y Strong (1959) describieron el cariotipo 47,XXY en un varón con síndrome de Klinefelter; Ford et al (1959a) reportaron el cariotipo 45,X en una mujer con síndrome de Turner; y Ford et al (1959b) describieron 2 cromosomas supernumerarios (un X y un 21) en un varón 48,XXY+21 con síndromes de Klinefelter y Down. Estas observaciones demostraron que en presencia de un cromosoma Y, independientemente del número de cromosomas X, el embrión de mamíferos se desarrolla como macho, mientras que en ausencia del cromosoma Y se desarrolla como hembra. Además, llevaron a suponer la existencia de gene (s)

determinantes del sexo masculino en el cromosoma Y, cuya presencia o ausencia determina el destino de la gónada bipotencial, en testículo u ovario, respectivamente. A su vez, las hormonas gonadales controlan las demás características dimórficas sexuales (Jost et al., 1973). En el ser humano, este gen fue posteriormente denominado *TDF* (por sus siglas en inglés, "testis determining factor") y en el ratón *Tdy* ("testis determining Y").

En los años siguientes, la búsqueda de *TDF* fue objeto de numerosas investigaciones, a lo largo de las cuales varios genes y secuencias fueron propuestos tomando en cuenta diferencias bioquímicas en machos y hembras, y la conservación evolutiva que presentan genes fundamentales.

La observación de que anticuerpos provenientes de ratonas transplantadas con tejido masculino reaccionaban con células del sexo heterogamético de mamíferos (XY) llevó a proponer al antígeno H-Y como producto de *TDF* (Wachtel et al., 1975). Por más de 10 años, esta propuesta fue considerada válida, pero el hallazgo de ratones machos XX Sxr que no expresaban H-Y excluyó esta hipótesis (McLaren et al., 1984). Otro candidato para *TDF* fue la secuencia repetida *Bkm* ("banded-krait minor"), originalmente aislada de la serpiente *Bungarus fasciatus* (Jones y Singh, 1981) y presente en los cromosomas sexuales de algunos vertebrados. Sin embargo, en el humano estas secuencias están dispersas en el genoma y no están concentradas en la región sexo-específica del cromosoma Y (Kiel-Metzger et al., 1985).

Los individuos con reversión sexual (varones XX, mujeres XY y hermafroditas verdaderos XX) aparentemente rompen la regla de que el cromosoma Y controle la determinación sexual. En el caso de los varones XX, se demostró que en su gran mayoría presentan secuencias derivadas del cromosoma Y translocadas al cromosoma X por una recombinación ilegítima durante la meiosis paterna (Guellaen et al., 1984). El análisis molecular de los diferentes fragmentos del cromosoma Y presentes en estos pacientes, permitió la construcción de un mapa de delección con 7 intervalos (los primeros 3 incluyen la totalidad de Yp, el cuarto corresponde a la región centromérica y los tres restantes se encuentran en Yq) en el que se demostró que la región terminal del brazo corto (intervalo 1) de este cromosoma era esencial en la diferenciación testicular (Vergnaud et al., 1986).

1.1.1.1 EL GEN ZFY

Page y cols.(1987a) construyeron un mapa genético más detallado subdividiendo el brazo corto

del cromosoma Y en 13 intervalos. El intervalo 1A2, de 140 kb, se encontró presente en un varón XX que portaba sólo 300 kb del cromosoma Y, y ausente en una mujer X, t(Y;22) que carecía de sólo 160 kb de este cromosoma. Los autores concluyeron que el intervalo 1A2 contenía una parte esencial o todo el gen *TDF*, por lo que utilizaron diferentes sondas de esta región para buscar secuencias conservadas evolutivamente en el cromosoma Y de varios mamíferos. Una de las sondas, pDP1007, identificó una secuencia de DNA de copia única presente en todos los machos de los mamíferos estudiados, y ausente en las hembras. Sin embargo, esta sonda también hibridó con otro fragmento de DNA presente tanto en machos como en hembras. La determinación de la secuencia nucleotídica de pDP1007 reveló el marco de lectura de una proteína de 404 aminoácidos conteniendo 13 motivos de "dedos de zinc", un dominio similar a los reportados en factores de transcripción. En base a estas observaciones, estos investigadores propusieron que la proteína codificada por pDP1007 era el producto de *TDF*, sugiriendo que la proteína se unía específicamente al DNA regulando la transcripción de otro gen en la vía que conduce a la diferenciación de la gónada masculina. Al gen se le nombró *ZFY* ("zinc finger gene on Y chromosome") y *ZFX* a su homólogo en el cromosoma X. La gran homología entre *ZFX* y *ZFY* sugirió que estos genes tuvieran una función equivalente proponiéndose que la determinación sexual estuviera controlada por la dosis génica (Page et al., 1987a).

Posteriormente, se descubrieron cuatro genes homólogos a *ZFY* en el ratón: *Zfy-1* y *Zfy-2* localizados en el cromosoma Y, *Zfx* en el cromosoma X y *Zfa* en el cromosoma 10 (Koopman et al., 1990).

Sin embargo, en los años subsecuentes se acumularon una serie de evidencias que excluyeron a *ZFY* como *TDF*, y que fueron principalmente las siguientes:

- 1.- La presencia de secuencias homólogas a *ZFY* en machos y hembras de reptiles con mecanismos de determinación sexual cromosómico y ambiental (Bull et al., 1988)
- 2.- El descubrimiento de que secuencias homólogas a la clona humana de *ZFY* son autosómicas en marsupiales fue un hallazgo inesperado dada la relación filogenética entre mamíferos metaterios y euterios (Sinclair et al., 1988).
- 3.- El hallazgo de la expresión de los genes *Zfy-1* y *Zfy-2* (homólogos murinos de *ZFY*) en células germinales, normalmente no relacionadas con la diferenciación testicular (Koopman et al., 1989).

4.- La demostración de que el gen *ZFX* escapa al mecanismo de inactivación del cromosoma X (Schneider-Gädicke et al., 1989) descartando el modelo propuesto de dosis génica.

5.- La ausencia de *ZFY* en algunos varones XX con material genético del Y, lo que descarta la posibilidad de mutaciones en otros genes autosómicos o ligados al cromosoma X (Palmer et al., 1989; Verga y Erickson, 1989).

1.1.1.2 EL GEN SRY

La nueva búsqueda de *TDF* se limitó a una región de 35 kb de DNA, presente entre el límite de la región pseudoautosómica y el punto de ruptura en los varones XX, *ZFY* negativos. Las sondas generadas de esta región cromosómica fueron hibridadas con DNA proveniente de machos y hembras de bovinos, ratones, hámster y del humano. Siete de las sondas identificaron secuencias de copia única específicas del cromosoma Y en el DNA humano digerido con *EcoRI*, pero sólo una de ellas, pY53.3, fue también capaz de detectar secuencias sexo-específicas en DNA bovino y murino. Se utilizó una subclona de 0.9 kb, obtenida por la digestión de pY53.3 con *HincII*, para hibridar el DNA proveniente de machos y hembras de las especies arriba mencionadas y de chimpancé, conejo, cerdo, caballo, gato y tigre (filtros "arca de Noé"). Los resultados mostraron una banda de 2.1 kb sexo-específica en todas las especies animales analizadas, aunque a un menor rigor en el lavado se detectaron bandas adicionales tanto en machos como en hembras, señalando la posibilidad de secuencias relacionadas en autosomas. Se descartó la localización en el cromosoma X porque las bandas mencionadas no fueron observadas en DNA proveniente de células híbridas humano-roedor con cromosoma X humano (Sinclair et al., 1990).

La secuencia nucleotídica del fragmento de 2.1 kb reveló dos marcos de lectura, con dirección de transcripción de 5' a 3' de centrómero a telómero, codificando una proteína de 99 y 223 aminoácidos, respectivamente. No se encontraron secuencias de DNA relacionadas para ambos marcos de lectura; sin embargo se encontró homología del polipéptido mayor con la proteína Mc codificada por el gen *mat-3M* de *Schizosaccharomyces pombe* y además con un motivo conservado, con capacidad de unión a DNA, presente en proteínas no histónicas de las familias HMG1 y HMG2 ("high mobility group"). Este motivo conservado se conoce como caja o dominio HMG y consiste

en 80 aminoácidos con capacidad de unión a DNA, apoyando la función de regulación génica propuesta para este gen. Por último, se utilizó el fragmento *HincII* de 0.9 kb de pY53.3 como sonda para evaluar la presencia de transcritos de RNA obtenidos de pulmón y riñón masculinos, ovario y testículo, y detectándose sólo en testículo un transcrito de 1.1 kb. En base a todos los hallazgos anteriores, al gen localizado en Yp y definido por la sonda pY53.3 se le nombró *SRY* ("sex-determining region, Y-chromosome) y se postuló como *TDF* (Sinclair et al., 1990).

Utilizando la sonda pY53.3, se clonó y describió el homólogo murino de *SRY*, denominándolo *Sry*. Este gen contiene 237 pb y un marco de lectura para una proteína con un dominio HMG (Gubbay et al., 1990).

La caja HMG es un elemento de unión a DNA inicialmente reconocido al alinear la secuencia del factor de transcripción de la RNA polimerasa humana (hUBF) con la de HMG1, proteína de alta movilidad asociada a cromatina (Jantzen et al., 1990). Posteriormente, se describieron otras proteínas que poseen al menos una caja HMG y entre las que se encuentran factores de transcripción de RNA polimerasas mitocondriales y factores de regulación de transcripción. El dominio común de estas proteínas, la caja HMG, comprende aproximadamente 70 aminoácidos con una carga neta positiva y gran abundancia de residuos aromáticos y prolinas (Ferrari et al., 1992).

Se ha propuesto la existencia de dos tipos de cajas HMG, denominadas canónicas y generalizadas. Las primeras tienen aproximadamente 50% de residuos conservados, constituyen la mayor parte de la proteína a la que pertenecen, son muy abundantes y se localizan en el núcleo. Por otro lado, las cajas HMG generalizadas ocurren en un grupo muy diverso de proteínas, de las cuales representan una pequeña porción de la masa total. Están menos conservadas entre sí y con las cajas canónicas, sin embargo se caracterizan por la conservación de ocho residuos: dos son invariablemente prolinas, dos son aminoácidos con carga positiva y cuatro son residuos aromáticos. Las cajas HMG de las proteínas *SRY* y *Sry* corresponden a cajas generalizadas (Bianchi et al., 1992).

Se ha demostrado que la caja HMG de la proteína *SRY* se une a fragmentos de DNA sintéticos con la secuencia AACAAAG (Harley et al., 1992). Sin embargo, también se une a estructuras de DNA cruciforme independientemente de su secuencia. (Ferrari et al., 1992).

El tamaño del péptido de la caja de *SRY* es lo suficientemente pequeño para descartar la posibilidad de tener dos sitios de unión diferentes, uno dependiente de secuencia y otro de estructura. Esta contradicción fue aparentemente resuelta cuando por ensayos de permutación circular se

confirmó que la secuencia consenso y la estructura cruciforme pueden tener una estructura potencialmente similar. El modelo propuesto considera que la unión específica de secuencia de la proteína SRY al DNA lineal induce un doblamiento de 83°, similar al encontrado en el DNA cruciforme. Otras proteínas HMG reconocen con gran afinidad estructuras de DNA cruciformes, pero como éstas son más abundantes que la proteína SRY restringen la posibilidad de unión dependiente de estructura, favoreciendo la unión dependiente de secuencia (Ferrari et al. 1992). Es interesante señalar que la secuencia AACAAAG ha sido identificada en la posición -3 a +4 pb del sitio de iniciación de transcripción del gen *SRY*, sugiriendo un papel autoregulatorio (Vilain et al., 1992b).

Un estudio reciente reveló que el dominio de unión a DNA de la caja HMG de SRY reconoce de manera específica y con gran afinidad a los elementos promotores de los genes de la hormona antimülleriana (AMH) y de la aromatasa P450, sugiriendo que la proteína SRY controle el desarrollo masculino a través de la regulación de genes blanco (Haqq et al., 1993).

El gen humano *SRY* presenta una estructura muy sencilla, contiene un solo exón y no tiene intrones. El extremo 5' carece de cajas TATA o CCAT, es rico en GC y presenta en tandem dos sitios de reconocimiento para Sp1, una secuencia potenciadora de transcripción (Vilain et al., 1992b). La región transcrita es de 841 pb, resultando en un transcrito de 1.1 kb y la región traducida es de 612 pb produciendo una proteína de 204 aminoácidos con un peso molecular de 23.9 kDa. El gen de *SRY* está flanqueado por dos regiones ricas en AT conteniendo secuencias repetidas invertidas, sugiriendo que este gen se haya originado por la retroposición de un transcrito de otro gen durante la evolución humana. La región que codifica para la caja HMG se localiza prácticamente en la parte central del gen *SRY*, abarcando del aminoácido 57 al residuo 137 de la proteína (Su y Lau, 1993).

En el embrión de ratón, los transcritos de *Sry* aparecen principalmente en la cresta genital en el período correspondiente a la formación del testículo (Koopman et al., 1990). Sin embargo, un reporte reciente sugiere que los transcritos de *Sry* y de *Zfy*, pero no los de *Zfx* y *Zfa*, también están presentes en el estado de blastocisto (Zwingman et al., 1993).

En el ratón adulto, *Sry* se expresa en el testículo, donde el transcrito tiene una estructura circular única (Capel et al., 1993). Aparentemente, este transcrito circular no es traducido y es un componente mínimo de los transcritos de la cresta genital. La singular estructura del mRNA en el testículo

puede estar relacionada con la organización del *locus Sry* que presenta una secuencia invertida repetida flanqueando la secuencia codificante (Gubbay et al., 1992). Recientemente, se ha demostrado la presencia tanto del transcrito lineal como del circular en el estado de blastocisto, sugiriendo que ambos sean responsables del inicio de la cascada génica que conduce a la determinación sexual (Boyer y Erickson, 1994).

Todos los estudios de expresión de *SRY* en el ratón y en el humano se han realizado a nivel de transcripción y no de traducción, debido a que la proteína se encuentra en una cantidad muy baja para ser detectada por anticuerpos específicos (Hawkins, 1993).

Recientemente se postuló una hipótesis para explicar el papel de la proteína *SRY* en la cascada regulatoria de la diferenciación sexual en mamíferos. Se propuso que el dominio HMG de la proteína *SRY* se une a secuencias de DNA regulatorias de un gen hipotético *Z*, considerado un regulador negativo de la determinación sexual masculina. Esta interacción impide la expresión del gen *Z*, impidiendo su efecto regulador y resultando en un fenotipo masculino (McElreavy et al., 1993a).

Las principales evidencias a favor del gen *SRY* como *TDF* son las siguientes:

- 1.- Está localizado en la región más pequeña del cromosoma Y capaz de inducir la diferenciación testicular en el hombre (Sinclair et al., 1990) y en el ratón (Gubbay et al., 1990).
- 2.- Algunas disgenesias gonadales puras XY presentan mutaciones *de novo* en el gen *SRY* (Berta et al., 1990; Jäger et al., 1990; Hawkins et al., 1992b; Affara et al., 1993).
- 3.- En el ratón, su expresión correlaciona con el inicio de la determinación testicular (Koopman et al., 1990).
- 4.- Un fragmento de DNA de 14 kb, que incluye el gen *Sry* del cromosoma Y del ratón puede inducir el desarrollo masculino en ratones transgénicos XX (Koopman et al., 1991).
- 5.- Es un gen evolutivamente conservado en el cromosoma Y de mamíferos metaterios y euterios (Sinclair et al., 1990; Foster et al., 1992).

Los fragmentos autosómicos previamente mencionados detectados por la sonda pY53.3 en

filtros "arca de Noé" (Sinclair et al., 1990) han sido posteriormente identificados como genes autosómicos y ligados al cromosoma X relacionados a *SRY*. A la familia de genes que presentan una homología mayor al 60% en la caja HMG con *SRY* se les ha denominado genes *SOX* ("SRY box-related gene") (Denny et al., 1992; Stevanovic et al., 1993). Estos genes *SOX* están muy conservados y han sido demostrados en varios vertebrados, incluyendo a marsupiales. La relación entre el gen *SRY* y los genes *SOX* ha suscitado un gran interés desde el punto de vista del origen y evolución del gen *SRY* en los mamíferos (Foster y Marshall, 1994).

1.1.2 ETAPA GONADAL

La determinación gonadal es un evento clave en el proceso de diferenciación sexual debido a que la gónada controla la morfogénesis de los genitales internos y externos y la posterior maduración sexual (Kofman-Alfaro et al., 1984).

El desarrollo de testículo a partir de la cresta genital bipotencial es un evento activo aparentemente dirigido por el factor determinante testicular, recientemente identificado como *SRY*. Este gen constituye un "switch" que induce a la gónada indiferenciada hacia el programa de organogénesis testicular. En contraste, la determinación sexual femenina ocurre pasivamente cuando en ausencia de cromosoma Y, y por ende de *SRY*, la gónada primitiva diferencia a ovario (George, 1992).

En el humano, el primordio gonadal es bipotencial e indistinguible morfológicamente en ambos sexos hasta la etapa de 12 mm (aprox. 42 días de gestación). Las crestas gonadales se forman durante la tercera y cuarta semanas de la embriogénesis por la proliferación del epitelio celómico y la condensación del mesénquima en ambos lados de la línea media entre el mesonefros y el mesenterio dorsal. Inicialmente, las células germinales primordiales se localizan en el endodermo posterior del saco vitelino y empiezan a migrar hacia el primordio gonadal a través del mesénquima del mesenterio durante la quinta semana de gestación. Se ha reportado que en el embrión humano el número de células germinales en migración es aproximadamente de 700 a 1300, y que para la octava semana de gestación están presentes cerca de 600 000 células germinales. Posteriormente, estas células se convierten en ovogonias o espermatogonias (Grumbach y Conte, 1992). Es importante

señalar que la ausencia de células germinales es incompatible con la diferenciación ovárica pero no previene la morfogénesis testicular (Merchant, 1984).

La migración de las células germinales se completa en la sexta semana de gestación, las gónadas embrionarias femeninas o masculinas son indistinguibles y están formadas por células germinales y tres tipos de células somáticas: las células de soporte (células de Sertoli en el hombre y células foliculares en la mujer), las células esteroidogénicas (células de Leydig en el hombre y células de la teca en la mujer) y células del tejido conectivo (McLaren, 1991; Bogan y Page, 1994).

Aun no se ha dilucidado el momento en que las estirpes celulares gonadales se comprometen en el desarrollo femenino o masculino. Sin embargo, dejando a un lado los efectos pleiotrópicos de *Sry*, es razonable suponer que la determinación sexual empieza cuando *SRY* se expresa por primera vez (Bogan y Page, 1994). Inicialmente, se sugirió que la primera expresión de *Sry* en la gónada murina ocurría entre 10.5 y 12.5 dpc (Koopman et al., 1990); sin embargo, estudios recientes en embriones previos a la implantación muestran que la transcripción de *Sry* (y de *Zfy*) se realiza en el estado de blastocisto (Zwingman et al., 1993).

Tampoco se ha esclarecido el momento en que finaliza la determinación sexual. Los transcritos de *Sry* ya no son detectados por PCR en el RNA gonadal en el 13.5 dpc (Koopman et al., 1990) y se desconoce hasta cuando persiste la proteína *Sry* u otras proteínas implicadas en el proceso (Bogan y Page, 1994).

Es claro que la diferenciación gonadal no se inicia en las células germinales ya que embriones de ratón cuyas gónadas están desprovistas de ellas (por mutaciones en los loci *W* o *Sl*), llevan a cabo el proceso de manera normal (McLaren, 1991). De las tres líneas somáticas restantes, la evidencia actual sugiere que los pasos iniciales de la diferenciación gonadal se realizan en las células de soporte (pre-Sertoli o pre-folículo) (Bogan y Page, 1994) pero que las interacciones célula-célula son críticas para la función de *SRY* y, en general, para la diferenciación gonadal (Goodfellow y Lovell-Badge, 1993).

Aun cuando la evidencia a favor de *SRY* como factor determinante testicular es sólida, la observación de que algunas alteraciones de la diferenciación sexual no están ligadas al cromosoma Y ha llevado a suponer que otros genes, autosómicos y/o ligados al cromosoma X, participen en la gonadogénesis. Existen anomalías de la diferenciación sexual en las cuales ocurre desarrollo testicular en ausencia de *SRY*, tales como varones XX y hermafroditas verdaderos 46,XX. Esto ha

llevado a proponer la existencia de numerosos genes en el desarrollo gonadal como componentes de una cascada génica responsable de realizar los programas apropiados de morfogénesis y diferenciación gonadal (Bogan y Page, 1994).

1.2.1.2 DIFERENCIACION TESTICULAR

En un embrión XY, la gónada primitiva se diferencia hacia testículo. Las células de Sertoli rodean a las células germinales primordiales formando cordones testiculares primitivos (precursores de los túbulos seminíferos) e inhibiendo la meiosis de las células germinales (Gustafson y Donahoe, 1994). Una función endócrina temprana del testículo fetal es la secreción de la hormona antimulleriana (AMH) por las células de Sertoli (Blanchard y Josso, 1974). La actividad de la AMH causa la regresión de los ductos Mullerianos (estructuras precursoras del tracto genital interno femenino). Es importante señalar que las células de Sertoli en el testículo y las células de la granulosa en el ovario comparten muchas características estructurales y funcionales, incluyendo la producción de AMH. Sin embargo, la cronología es diferente: las células de la granulosa sólo producen la hormona después del nacimiento y en baja cantidad (Vigier et al., 1984), mientras que las células de Sertoli la producen en grandes cantidades desde la etapa embrionaria hasta los primeros años de vida, disminuyendo su expresión al empezar la pubertad (Baker et al., 1990).

La AMH es una glicoproteína con un peso molecular de 140 000 kDa, compuesta de dos subunidades idénticas de 70 kDa unidas por puentes disulfuro (Picard y Josso, 1984). El gen de AMH ha sido clonado en el bovino, en el humano, en el ratón y en la rata. En el humano, el gen abarca 2.75 Kb, contiene 5 exones y se localiza en el cromosoma 19 (19p13.3). El último exón es particularmente interesante ya que presenta la mayor homología entre las especies y es la única región homóloga a la familia TGB- β (factor de transformación del crecimiento) (Cate et al, 1986).

Además de AMH, las células de Sertoli producen inhibina y activina, ambos miembros de la familia TGB- β . Se ha demostrado que la inhibina suprime la producción de FSH (hormona folículo estimulante), mientras que la activina activa la liberación de FSH en la hipófisis. A nivel gonadal, existe evidencia indirecta de que la inhibina inhibe la proliferación de las espermatogonias mientras que la activina estimula su proliferación. La importancia fisiológica de estas observaciones no es

muy clara, pero el hecho de que ratones deficientes en inhibina desarrollen tumores de células somáticas en ovario y en testículo sugiere que la acción normal de la inhibina pudiera ser la supresión tumoral (Hogan, 1993).

Por otro lado, las células de Leydig se observan por primera vez en embriones de 32-35 mm (aprox. en el día 60 de la gestación) y proliferan rápidamente durante el tercer mes y la primera mitad del cuarto mes., después de la diferenciación de los cordones testiculares primitivos. Las células de Leydig secretan testosterona, la hormona reguladora de la diferenciación masculina de los conductos Wolffianos. Además, la acción de la enzima 5- α reductasa sobre la testosterona resulta en la 5- α dihidrotestosterona, que induce la virilización de los genitales externos masculinos (Gustafson y Donahoe, 1994).

1.2.2.2 DIFERENCIACION OVARICA

En ausencia de los genes testículo determinantes el primordio gonadal tiene una tendencia inherente a desarrollarse como ovario, siempre y cuando existan células germinales, ya que en caso contrario se forman estrías fibrosas incapaces de producir hormonas sexuales femeninas durante la pubertad (Merchant, 1984; Grumbach y Conte, 1992).

En la hembra, la etapa indiferenciada es más prolongada que la organogénesis testicular; sin embargo, continúa la proliferación del epitelio celómico y las células germinales crecen y se convierten en ovogonias. Entre la semana onceava y la doceava (etapa de 80 mm) las ovogonias entran en la primera profase meiótica (ovocitos primarios) pero se detienen en la etapa de dictiotene hasta la pubertad en que la acción de AMH en el folículo induce la continuación de la meiosis (George, 1992)

Durante la embriogénesis, el ovario no secreta AMH ni testosterona. La ausencia de estas dos señales ocasiona la persistencia de los ductos Mullerianos y la regresión de los conductos Wolffianos, que forman los genitales internos y externos femeninos, respectivamente (Grumbach y Conte, 1992).

1.1.2 ETAPA FENOTIPICA

En la séptima semana de la vida intrauterina el feto está equipado con ductos genitales, masculinos o femeninos, mesonéfricos (Wolff) y paramesonéfricos (Muller). La diferenciación fenotípica subsecuente es consecuencia de las diferencias anatómicas y estructurales de las gónadas (Gustafson y Donahoe, 1994). En el embrión masculino, la presencia de AMH produce la regresión de los ductos Mullerianos, mientras que en el femenino la ausencia de AMH da lugar al desarrollo de trompas de Falopio, útero y tercio superior de la vagina. Por otro lado, en el hombre la acción de la testosterona induce la diferenciación de los conductos Wolffianos en conducto deferente, epidídimo, vesícula seminal y conducto eyaculador. La testosterona actúa como prohormona y mediante la acción de la enzima extragonadal 5- α reductasa se convierte en 5- α -dihidrotestosterona que es la hormona responsable de la diferenciación de los genitales externos masculinos (pene y escroto). En ausencia de dihidrotestosterona los genitales externos dan lugar al clítoris y a los labios mayores y menores. El tercio inferior de la vagina proviene del seno urogenital (Kofman-Alfaro y cols, 1988; Grumbach y Conte, 1992).

1.2 CROMOSOMAS SEXUALES EN EL HUMANO

La diferenciación morfológica gradual de los cromosomas sexuales humanos ha permitido la especialización del cromosoma Y en la determinación sexual y el mecanismo de compensación de dosis para genes ligados al X en la mujer. Este proceso de dimorfismo constituye una innovación en los mamíferos (Affara y Ferguson-Smith, 1994).

1.2.1 CROMOSOMA Y

El cromosoma Y es uno de los cromosomas humanos más pequeños, constituido por 60 millones de pares de bases. Si se considera que el contenido de DNA del genoma humano diploide es 6×10^9 pb, este cromosoma constituye aproximadamente 1% del total. Aun cuando por su tamaño

se sitúa con los autosomas del grupo G, las técnicas de tinción de rutina ponen de manifiesto las siguientes características que distinguen al cromosoma Y de los cromosomas 21 y 22: el Y no presenta satélites; en ocasiones se observa una constricción en la mitad del brazo largo; las cromátidas del brazo largo permanecen paralelas. Además, el segmento distal del brazo largo tiene una apariencia borrosa que se tiñe intensamente con bandas Q y C (Therman y Susman, 1993).

1.2.1.1 ESTRUCTURA

El cromosoma Y humano está formado por una región heterocromática y una región eucromática. La región heterocromática está localizada en la porción distal del brazo largo (principalmente en Yq12) y está compuesta de secuencias altamente repetidas (DYZ1 y DYZ2) (Cooke et al, 1983). La familia DYZ1 es una subclase del DNA satélite humano III y consiste de subunidades de de 5 pb organizadas en una unidad de orden superior de 3.4 kb (Nakahori et al, 1986). La familia DYZ2 es una subclase del DNA satélite humano I que contiene secuencias ricas en AT, incluyendo una secuencia *Alu* por cada repetición (Frommer et al, 1984). Este DNA satélite es muy variable en cuanto a su tamaño, constituyendo más de la mitad (50-70%) del cromosoma en algunos varones normales mientras que en otros es prácticamente nulo. Se ha reportado que el cromosoma Y suele ser más largo en japoneses, chinos y kirghis que en caucásicos. Aun no se ha esclarecido la función de estas secuencias repetidas ni se ha comprobado si el tamaño del cromosoma Y tiene algún efecto sobre el fenotipo (Bernstein et al., 1986).

La región eucromática está localizada en el brazo corto (Yp), en el centrómero y en el segmento proximal del brazo largo, teniendo un tamaño casi constante en varones normales. Contiene bloques de secuencias homólogas al cromosoma X, familias de secuencias repetidas específicas y todos los genes identificados del cromosoma Y (Cuevas-Covarrubias y Kofman-Alfaro, 1990).

En la región centromérica del cromosoma Y se encuentra un bloque de DNA satélite alfoide denominado DYZ3 organizado en unidades de 5.7 ó 6.0 kb, que contienen subunidades de 170 pb (Willard, 1992). Este DNA constituye aproximadamente el 1% del cromosoma Y. La presencia de este DNA alfoide en todos los centrómeros humanos, su especificidad cromosómica y su habilidad para unir proteínas nucleares sugiere que este DNA juegue un papel importante en la actividad

centromérica (Gaff et al., 1994) .

Las restantes $20-30 \times 10^6$ pb de DNA del cromosoma Y se pueden subdividir en la región pseudoautosómica de la porción distal de Yp y en las regiones más proximales de los brazos cortos y largos del cromosoma Y (Vollrath et al., 1992)

1.2.1.2 GENES

La mayor parte del cromosoma Y, a diferencia del resto de los cromosomas humanos, no participa en la recombinación meiótica lo cual ha evitado la construcción de un mapa genético por ligamiento. Sin embargo, la presencia natural de deleciones en individuos viables ha permitido la construcción de un mapa físico de los genes en el cromosoma Y (Vollrath et al., 1992).

Los genes *ZFY*, *RPS4Y* y *AMGY* del cromosoma Y presentan homólogos en el cromosoma X , *ZFX*, *RPS4X* y *AMGX*, respectivamente. Los genes *ZFY* y *ZFX* codifican para una proteína con dedos de zinc cuyas funciones se desconocen (Page et al., 1987a). Los genes *RPS4Y* y *RPS4X* codifican isoformas de la proteína ribosómica S4 (RPS4) (Fisher et al., 1990).

La observación de que deleciones de Yp y de Yq se asocian a talla baja ha llevado a suponer la existencia de genes de crecimiento en ambos brazos del cromosoma Y (Ogata et al., 1992b y 1992c; Alvesalo et al 1981).

Se ha postulado la existencia del gene *GBY* ("gonadoblastoma locus on Y chromosome) en la región pericentromérica o en el brazo largo del cromosoma Y, responsable de la predisposición de las gónadas disgenéticas a desarrollar gonadoblastomas y con alguna función fisiológica en los varones normales (Page, 1987), sin embargo hasta la fecha no hay evidencia al respecto.

El análisis de una deleción terminal en el cromosoma Y de 6 varones infértiles, con testículos hipoplásicos, llevó a sugerir la localización de un gen controlador de la espermatogénesis (*AZF*) en la región Yq11 (Tiepolo y Zuffardi, 1976). Posteriormente, el estudio molecular en 21 pacientes con anomalías estructurales en Yq permitió localizar el factor *AZF* en el intervalo 6 (subintervalo XII-XIV) del cromosoma Y (Ma et al., 1992). Utilizando sondas de este intervalo, ausentes en varones azoospermicos y oligospermicos, recientemente, se reportó el aislamiento y caracterización de una familia génica, YRRM ("Y chromosome RNA recognition motif"). La expresión de las

secuencias YRMM es aparentemente testículo específica y constituyen buenos candidatos para el locus AZF (Ma et al., 1993).

1.2.1.3 ANORMALIDADES DEL CROMOSOMA Y

Además del polimorfismo que se observa en el cromosoma Y por el tamaño de la heterocromatina en Yq, este cromosoma puede exhibir diferentes aberraciones que no afectan el fenotipo, ni la fertilidad. La más común de ellas es una inversión que, en la mayoría de los casos, desplaza el centrómero a una posición adyacente al límite de la heterocromatina. Se ha sugerido que uno cada 200 varones presenta esta aberración, habiéndose reportado en varias familias y en comunidades donde este cromosoma Y se encontró en 30% de los varones (Bernstein et al., 1986). Una anomalía estructural más rara que la inversión es la presencia de satélites en los brazos largos del cromosoma Y (Yqs), debida a una translocación balanceada entre Yq y el brazo corto de un cromosoma acrocéntrico. Se ha descrito la transmisión hereditaria de un cromosoma Yqs en una familia canadiense durante doce generaciones, abarcando más de 300 años (Genest et al., 1977).

Otras anomalías estructurales reportadas para el cromosoma Y incluyen deleciones, i(Yq), i(Yp), cromosomas en anillo y cromosomas Y isodicéntricos con uno o ambos centrómeros activos (Therman y Susman, 1993).

1.2.2 CROMOSOMA X

Es un cromosoma grande, del tamaño y morfología del grupo C, constituyendo el 5.3% del genoma haploide. El número de bandas G observadas en el cromosoma X varía dependiendo de si la tinción fue realizada en profase, prometafase o metafase. Se han demostrado más de 100 enfermedades ligadas al cromosoma X y han sido localizado más de 160 genes, que en su mayoría codifican para funciones somáticas (Therman y Susman, 1993).

1.2.2.1 ESTRUCTURA

Si se sobrepone el patrón de bandas al mapa genético, el cromosoma X podría dividirse en regiones funcionales, la mayoría reflejo del fenómeno de inactivación-activación (Therman y Susman, 1993).

El extremo distal de Xp es parte de la región de apareamiento meiótico con el Y, reconociéndose un entrecruzamiento en esta región, denominada pseudoautosómica. Los segmentos de apareamiento de los cromosomas X y Y siempre permanecen activos y replican sincrónicamente (Burgoyne, 1982).

Una región de replicación temprana, que siempre está presente en cromosomas X anormales, es Xcen-q13. En ella se localizó un gen, *XIST* ("X-inactive specific transcript"), que siempre permanece activo en el cromosoma X inactivo (Brown et al 1991).

La región conocida como crítica se encuentra en el extremo distal de Xq13 y consiste en dos segmentos separados por una banda intercalar corta en Xq22. Se ha propuesto que ambas partes de la región crítica actúan como "super genes" que deben permanecer intactos en ambos cromosomas X para permitir un desarrollo sexual normal (Therman et al., 1990).

1.2.2.2 INACTIVACION DEL CROMOSOMA X

Como se expuso anteriormente, los mamíferos poseen cromosomas sexuales heteromórficos y un sistema de determinación sexual cromosómico con hembras XX y machos XY. El cromosoma Y es pequeño, contiene muy pocos genes y su función principal es la determinación testicular. En contraste, el cromosoma X es grande y tiene miles de genes. La equivalencia en la dosis génica entre machos y hembras se logra mediante la inactivación transcripcional de uno de los cromosomas X en el núcleo de cada célula somática femenina (Rastan, 1994).

En 1949, Barr y Bertram descubrieron un cuerpo adherido a la membrana nuclear que se teñía intensamente en neuronas de gato femeninas y estaba ausente en las masculinas. Más tarde, en 1959, Ohno y colaboradores demostraron que el cuerpo de Barr o cromatina sexual estaba formado por un cromosoma X condensado. Simultáneamente, Welshons y Russell descubrieron que la

determinación sexual en los mamíferos dependía de la presencia del cromosoma Y, ya que ratones XO eran hembras fértiles normales. Finalmente, Lyon observó en el ratón, que las hembras heterocigotas para genes ligados al cromosoma X que controlan el color del pelo mostraban mosaicos de dos colores. Esta variegación corresponde a la expresión del gen mutado y del normal (Lyon, 1992).

Estudiando cromosomas X isodicéntricos en células interfásicas y mitóticas y utilizando sondas fluorescentes para regiones centroméricas y teloméricas, se observó que el cuerpo de Barr corresponde a un cromosoma X condensado en una configuración no lineal con los telómeros muy próximos (Walker et al., 1991).

Aunque la primera evidencia de la inactivación del cromosoma X se obtuvo hace más de treinta años el mecanismo molecular del proceso aun no es bien conocido (Lyon, 1992).

En las células femeninas, la inactivación de la mayor parte de los genes de uno de los cromosomas X se inicia tempranamente en la embriogénesis (días 12 y 18 de la gestación humana) y en cada célula el cromosoma X que se inactiva es seleccionado al azar. El proceso de inactivación es heredable y el mismo cromosoma X permanece generalmente silencioso en las futuras generaciones celulares (Lyon, 1992).

En marsupiales el cromosoma X de origen paterno es preferencialmente inactivado en todas sus células. Esta preferencia fue posteriormente observada en el trofoectodermo y en líneas celulares del endodermo primitivo de embriones de rata y ratón, y, de manera menos clara, en tejidos extraembrionarios humanos (Lyon, 1994). Es interesante señalar que esta inactivación no azarosa constituyó el primer ejemplo de impronta genética en los mamíferos (Rastan, 1994). En el estadio posterior de epiblasto la impronta genética deja de operar, inactivándose al azar el cromosoma X paterno o materno en cada célula en particular. Todos los descendientes mitóticos de cada célula contienen el mismo cromosoma X inactivo que sus progenitores, indicando que el estado inactivo es heredado establemente a través de divisiones celulares y programas de diferenciación (McBurney, 1993).

En mujeres heterocigotas para variantes electroforéticas de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se observó que los oocitos formaban un heterodímero de las dos formas de la enzima, demostrando que en la línea germinal femenina se reactiva el cromosoma X inactivo antes de la meiosis (Gartler et al., 1973). La presencia de ambos cromosomas X activos es necesaria para la

formación del folículo y el subsecuente desarrollo del ovario (Lyon, 1992).

Por otro lado, en la línea germinal masculina el único cromosoma X aparentemente se vuelve transcripcionalmente inactivo durante la espermatogénesis, condensándose en paquiteno dentro de la vesícula sexual (Rastan, 1994).

Esta diferencia en la actividad de los cromosomas X en las células germinales femeninas y masculinas parece reflejar la necesidad de un estado activo que permita el apareamiento normal de ambos cromosomas homólogos en la meiosis femenina, mientras que en la espermatogénesis la inactivación del cromosoma X protege de una recombinación entre regiones no homólogas, que tendría un efecto deletéreo en la célula germinal (Jablonka y Lamb, 1988).

Los estudios genéticos en el humano (Mattei et al., 1981) y en el ratón (Rastan y Brown, 1990) han demostrado que la inactivación depende de la presencia de una región definida, el centro de inactivación (*XIC*).

Recientemente, se ha demostrado que los genes homólogos localizados en el centro de inactivación, *XIST* en humanos (Brown et al., 1991) y *Xist* en ratón (Borsani et al., 1991) se expresan en el cromosoma X inactivo (*Xi*) pero no en el activo (*Xa*). Aunque hay otros genes ligados al cromosoma X que escapan a la inactivación (Davies, 1991), particularmente los localizados en la región pseudoautosómica y que tienen homólogos en el Y, *XIST* y *Xist* son los únicos genes actualmente identificados que se expresan de *Xi*. Esta propiedad hace a estos genes candidatos para iniciar o mantener la inactivación del cromosoma X en forma cis; sin embargo, los estudios de secuencia sugieren que su función no es a través de un producto proteico (Brown et al., 1992).

1.2.2.3 ANORMALIDADES DEL CROMOSOMA X

Se han descrito anomalías estructurales del cromosoma X en mujeres con amenorrea primaria o secundaria, infertilidad, talla baja o fenotipo de Turner (Grumbach y Conte, 1992).

La monosomía del cromosoma X (45,X) o los mosaicos que incluyan una línea 45,X y otra 46,XX ó 46,XY se discutirán en el capítulo 1.4

La monosomía parcial de los cromosomas sexuales se presenta en el 30-40% de los pacientes con disgenesia gonadal. Este grupo puede presentar un cromosoma X o Y estructuralmente anormal

y mosaïcismo con una línea 45,X (Hall y Gilchrist, 1990).

En general, los cromosomas X estructuralmente anormales replican tardíamente (excepto en las translocaciones balanceadas X:autosomas) y constituyen la cromatina X o cuerpo de Barr (Grumbach y Conte, 1992).

Se ha estimado que el 28% de las pacientes con síndrome de Turner presentan alteraciones estructurales del cromosoma X, siendo la más frecuente (15%) el isocromosoma de brazos largos i(Xq). Estas pacientes presentan talla baja y estrías fibrosas, aunque ocasionalmente menstrúan espontáneamente (Palmer y Reichman, 1976).

Existe controversia respecto a los casos reportados con isocromosoma de Xp, asumiéndose que corresponden a deleciones grandes, citogenéticamente indistinguibles, de Xq (De la Chapelle y Schroeder, 1975).

Entre las deleciones del brazo corto (Xp-) aquellas que incluyen la banda Xp21 resultan en síndrome de Turner, mientras que las más distales están asociadas con talla baja y algunas características de Turner, pero con gónadas funcionales (Fraccaro et al., 1977).

Las deleciones de brazo largo (Xq-) están frecuentemente asociadas con disfunción gonadal como única característica, presentando amenorrea primaria o secundaria. Sin embargo, algunas pacientes presentan características asociadas al síndrome de Turner. Las translocaciones X/autosomas pueden estar asociadas con una gran variedad de fenotipos dependiendo de si están o no balanceadas y del patrón de inactivación presente en los pacientes. La t(X:X) es muy poco frecuente y en general se presenta como mosaico con una línea 45,X. Un anillo de cromosoma X resulta de la pérdida de ambos extremos de un cromosoma y unión posterior de éstos. Se presenta frecuentemente en forma de mosaico 45,X/46,X,r(X); la mayoría de las pacientes tienen talla baja y muchas tienen estigmas de síndrome de Turner (Miranda, 1994)..

1.3 SECUENCIAS HOMOLOGAS EN LOS CROMOSOMAS SEXUALES

Los cromosomas X y Y humanos comparten de manera significativa secuencias similares de DNA, probablemente debido a su origen evolutivo a partir de un par de cromosomas homólogos ancestrales (Ohno, 1967).

Se podría asumir que la homología de las secuencias ancestrales haya sido retenida en regiones funcionalmente importantes de los cromosomas sexuales. Por ejemplo, los cromosomas X y Y aparean en meiosis asegurando una segregación correcta durante la gametogénesis, aun cuando son muy dispares en morfología y tamaño. Esta región de apareamiento puede abarcar la mayor parte del brazo corto del cromosoma Y y hasta 27% de Xp a partir del centrómero (Chandley et al., 1984).

La mayoría de los genes humanos que se conoce que escapan al mecanismo de inactivación del cromosoma X (a excepción de *XIST* y *UBE1*) presentan un gen homólogo en el cromosoma Y (Rappold, 1993). Estos genes homólogos pueden expresarse activamente en el Y, como en el caso de *ZFX* (SchneiderGädicke et al., 1989) y *RPS4X* (Fischer et al., 1990) o constituir un pseudogene en el Y, como en los casos de los *loci* para *STS* (sulfatasa de esteroide) (Yen et al., 1988), *KALIG-1/ADML* (síndrome de Kallmann) (Legouis et al., 1991) y *GSI* (Yen et al, 1992). Por lo tanto, el hecho de que un gene escape a la inactivación del cromosoma X parecería reflejar una conducta remanente del par de cromosomas homólogos ancestrales (Rappold, 1993).

La observación de que todos los genes homólogos reconocidos en los cromosomas X y Y se localizan en Xp (a excepción de *RPS4X*) y escapan al proceso de inactivación ha llevado a formular la hipótesis de que estos genes sean de origen autosómico y hayan sido posteriormente adquiridos por los cromosomas sexuales. Esta propuesta está apoyada por el descubrimiento de que los genes en Xp están agrupados en dos autosomas diferentes en marsupiales y monotremas, los cuales evolucionaron de los euterios hace 150 y 170 millones de años, respectivamente. Estos datos han permitido postular que el brazo largo y el brazo corto del cromosoma X tienen aparentemente un origen diferente (Spencer et al., 1991).

1.3.1 REGION PSEUDOAUTOSOMICA

Se denomina región pseudoautosómica (PAR) al segmento homólogo localizado en la porción distal de los cromosomas sexuales (Burgoyne, 1982).

En la mujer los dos cromosomas X son equivalentes en tamaño y contenido génico y el apareamiento y recombinación meióticos puede ocurrir teóricamente en cualquier sitio. Sin embargo, en el varón se lleva a cabo en la regiones pseudoautosómicas que se localizan en los extremos

de los brazos cortos de los cromosomas X y Y (PARs), y que abarcan 2.6 y 0.4 Mb, respectivamente. La frecuencia de recombinación en la PAR situada en brazos cortos es 10 veces mayor en la meiosis masculina que en la femenina, probablemente debido a que en la ovogénesis la recombinación ocurre al azar mientras que en la espermatogénesis sea en un sitio obligado (Hunt y Le Maire, 1992). La región pseudoautosómica humana de 2.6 Mb se localiza en la parte distal del brazo corto del cromosoma X, Xp22.3, y en la parte distal del brazo corto del cromosoma Y, Yp11.32. Esta región en el cromosoma X escapa a la inactivación. Ambas regiones llevan a cabo un evento de recombinación obligatorio durante la meiosis masculina (Rappold, 1993).

Durante la primera profase meiótica, el contacto físico entre los cromosomas homólogos resulta en apareamiento y sinapsis, con la consecuente formación de un complejo sinaptonémico. En general, el apareamiento de los cromosomas humanos empieza en sitios muy cercanos a los telómeros. En el caso de los cromosomas sexuales este inicio y el entrecruzamiento obligatorio se realiza en la región pseudoautosómica. El evento de entrecruzamiento dentro de esta región fue primeramente observado citogenéticamente (Solari, 1974) y posteriormente fue establecido usando sondas moleculares para seguir la segregación de fragmentos de restricción polimórficos de tamaño variable (RFLP) en árboles genealógicos (Page et al., 1987b).

Se han detectado varias secuencias "minisatélites" en la región pseudoautosómica, responsables de la gran variabilidad en las secuencias de DNA de los segmentos distales de Xp y Yp. Se ha propuesto que estos minisatélites representen "sitios calientes" de recombinación relacionados con el apareamiento cromosómico y/o en la iniciación de la recombinación meiótica (Jeffreys et al., 1985).

La región de apareamiento entre Xp y Yp es variable, incluyendo la región pseudoautosómica y la mayor parte del brazo corto del Y, además de extenderse, en algunos casos, al brazo largo del Y (Chandley et al., 1984).

El apareamiento de los cromosomas sexuales no ocurre únicamente entre Xp y Yp, ya que ocasionalmente se ha observado que se lleva a cabo entre Xq y Yq (Chandley et al., 1984). Se ha demostrado la presencia de otra región pseudoautosómica pequeña con eventos de entrecruzamiento entre Xq y Yq (Freije et al., 1992). Recientemente, se determinó que esta segunda región pseudoautosómica consta de 320 kb, translocadas del cromosoma X al Y mediante un evento de recombinación mediado por secuencias *Alu* (Kvaloy et al., 1994).

El límite pseudoautosómico (*PABY* y *PABX* en los cromosomas Y y X, respectivamente) está definido por el límite proximal de recombinación en PAR y constituye una interfase entre secuencias sexo-específicas y pseudoautosómicas. En el humano, el límite pseudoautosómico en Yp/Xp está marcado por una secuencia *Alu* seguida de un segmento de 220 pb con una homología reducida de 78% (Ellis, 1989).

1.3.2 GENES PSEUDOAUTOSÓMICOS

Se han identificado 6 genes en ambos cromosomas sexuales X y Y, que se comportan como pseudoautosómicos: *MIC2* (codifica para un antígeno de superficie implicado en procesos de adhesión celular), *XE7* (proteína ubiquitina cuya función se desconoce), *ASMT* (codifica para la enzima acetilserotonina metiltransferasa o hidroxil indol-O-metiltransferasa, responsable del último paso en la síntesis de la hormona melatonina), *ANT3* (codifica para la adenina nucleótido translocasa, encargada del transporte de ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial), *IL3RA* (codifica para la subunidad alfa del receptor de interleucina) y *GM-CSF* (codifica para el receptor alfa del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) (Rappold, 1993).

Recientemente, se ha propuesto un gen para crecimiento en la porción distal de la región pseudoautosómica de Xp (Ogata et al., 1992b).

1.4 DISGENESIA GONADAL

Se conocen como disgenesias gonadales aquellos padecimientos que presentan gónadas disgenéticas y diferentes fenotipos. Entre ellas se encuentra el síndrome de Turner, la disgenesia gonadal mixta y la disgenesia gonadal pura, que se describen a continuación.

1.4.1 SÍNDROME DE TURNER

La apariencia fenotípica atribuible a la monosomía del cromosoma X o a sus variantes fue

descrita por primera vez en 1930 por Otto Ulrich (Ulrich, 1949). Posteriormente, Turner (1938) describió siete individuos con fenotipo femenino, infantilismo sexual, talla baja, cuello alado y *cubitus valgus*. En 1944, la presencia de ovarios rudimentarios como causa de infantilismo sexual fue identificada por Wilkins y Fleischmann (Grumbach y Conte, 1992). La primera evidencia del fundamento cromosómico del síndrome de Turner fue el hallazgo de Polani y cols (1954) de que estas pacientes no presentaban cromatina X. Cuando las técnicas de cultivo permitieron asignar el número correcto de cromosomas en el humano, Ford y cols (1959a) reportaron que la constitución cromosómica en una paciente de 14 años con síndrome de Turner era 45,X.

Actualmente se conocen muchas más anomalías somáticas que las observadas por Turner. Entre ellas están: baja viabilidad *in utero*, linfedema congénito en manos y pies, paladar alto y arqueado, implantación baja del cabello, implantación baja de pabellones auriculares, anomalías renales, coartación de aorta, múltiples nevos pigmentados, clinodactilia del quinto dedo, cuarto metacarpiano corto, etc. Es importante señalar que el fenotipo es muy variable y que cada paciente sólo se presenta algunos de los estigmas somáticos característicos (Zinn et al., 1993). Sin embargo, se puede considerar que el síndrome de Turner está asociado con cuatro características clínicas principales: (1) fenotipo femenino, (2) baja estatura, (3) infantilismo sexual debido a gónadas rudimentarias, y (4) diversas anomalías somáticas asociadas. Estas características pueden modificarse por la presencia de una línea celular normal, como en el caso de los mosaicos (Grumbach y Conte, 1992).

El desarrollo de las técnicas citogenéticas a partir de los años sesentas permitió reconocer diversos complementos cromosómicos en pacientes con fenotipo de Turner. En la **tabla 1.1** se muestran los porcentajes de los principales complementos cromosómicos en pacientes con síndrome de Turner.

Las deleciones de brazo corto del cromosoma X son raras y están frecuentemente asociadas a mosaicismo con una línea 45,X. La correlación cariotipo-fenotipo en 40 pacientes (sin mosaico) demostró que en presencia de una deleción terminal del brazo corto del cromosoma X (distal a Xp21) la función ovárica es normal y no se observan estigmas de Turner, con excepción de talla baja. Sin embargo, las pacientes con deleciones proximales a Xp21 presentan diversos estigmas de Turner y disfunción gonadal (Fraccaro et al., 1977).

Estudios subsecuentes en un número mayor de pacientes con fenotipo Turner demostraron

que sólo 40 a 60% eran monosómicas para el cromosoma X. El resto presenta dos cromosomas sexuales, uno de los cuales es anormal o bien un mosaico 45,X con una segunda línea celular con un cromosoma X o Y estructuralmente normal o anormal (Palmer et al., 1976; Hall, 1990). Se ha estimado que 99% de las concepciones 45,X se abortan espontáneamente, por lo que se calcula que 5-10% de los abortos espontáneos y 1-2% de de las concepciones corresponden a monosomías del X (Hook y Warburton, 1983). En efecto, un estudio de abortos espontáneos reveló una incidencia de mosaicos de 1% mediante análisis citogenético y 15% por estudios de hibridación de DNA (Hassold et al., 1988). Recientemente, el estudio ciotgenético y molecular en linfocitos y fibroblastos de 87 pacientes con síndrome de Turner demostró que 66.7% eran mosaicos y que sólo 20.7% eran 45,X (Held et al., 1992). Estos datos han llevado a sugerir que el mosaicismo ejerce un efecto fetoprotector y que los casos 45,X que sobreviven a la vida embrionaria y fetal corresponden a mosaicos crípticos con pérdida gradual de la segunda línea cromosómica (Hook y Warburton, 1983; Held et al., 1992). Apoyando esta hipótesis, se describió el caso de un cariotipo 45,X(65%)/46,X,r(X)(35%) obtenido del diagnóstico prenatal por cultivo de vellosidades coriónicas en una mujer con nueve semanas de gestación. El embarazo fue interrumpido a las 14 semanas. El cariotipo encontrado al cultivar células del pericardio y del músculo del producto fue 45,X en el 95% de las células y 46,X,r(X) en el resto. Los autores concluyeron que todos los casos 45,X correspondan en la vida embrionaria a mosaicos cromosómicos para un X ó Y estructuralmente anormales, con pérdida de esta línea por inestabilidad de los cromosomas anormales durante las divisiones celulares (Kelly et al., 1992).

Las pacientes con síndrome de Turner y mosaico con cromosoma Y o con un marcador derivado del Y, constituyen un subgrupo clínicamente importante ya que presentan un riesgo 15 a 20% mayor que la población general de desarrollar gonadoblastoma o disgerminoma (Scully, 1970). Estas observaciones resaltan la importancia de caracterizar inequívocamente el origen (X o Y) del cromosoma marcador en el síndrome de Turner, lo cual en ocasiones resulta difícil utilizando sólo las técnicas citogenéticas convencionales (Crolla et al., 1988; López-López et al., 1993).

La diferenciación normal del ovario requiere la presencia de dos cromosomas X activos. En los embriones 45,X (que carecen de un segundo cromosoma sexual) el desarrollo del ovario es aparentemente normal durante el primer trimestre de gestación, después del cual hay una pérdida progresiva de células germinales y folículos y un aumento del tejido conectivo (Grumbach y Conte,

1992).

Actualmente se piensa que el fenotipo de Turner es debido a una haploinsuficiencia de uno o más genes en el cromosoma X y no a la monosomía del cromosoma X *per se*. De acuerdo a este modelo, el *locus* responsable debe tener un homólogo en el cromosoma Y, debe escapar el mecanismo de inactivación del cromosoma X y transcribirse activamente durante el desarrollo. La identificación de estos genes anti-Turner ha sido complicada por la variabilidad fenotípica entre individuos con un mismo cariotipo. Sin embargo, se ha intentado su localización correlacionando características fenotípicas con deleciones parciales del cromosoma X. La evidencia citogenética sugiere que tres regiones del cromosoma X no se inactivan: las regiones pericentroméricas de los brazos cortos y largos, y la porción distal del brazo corto incluyendo a la región pseudoautosómica. Varios genes candidatos han sido sugeridos en los últimos años, en especial *ZFX/ZFY* (Page et al., 1987a) y *RPS4X/RPS4Y* (Fisher et al., 1990); sin embargo, evidencias posteriores no apoyan a estos genes como responsables del fenotipo Turner. En una mujer X,t(Y:22) que carecía de *ZFY* no se observaron características de Turner (Page et al., 1990). Por otro lado, se han reportado pacientes con cariotipo 46,X,i(Xq) y fenotipo Turner que expresan *RPS4X* en dosis mayores al doble (Just et al., 1992) y una mujer 46,XYp- (incluyendo *RPS4Y*) sin estigmas de Turner (Müller et al., 1992a).

TABLA 1.1 Porcentajes de los principales complementos cromosómicos en síndrome de Turner

Cariotipo	Palmer y Reichman, (1976)	Armendares y Salamanca (1977)	Hall et al., (1982)	Park et al., (1983)	Held et al., (1992)	Miranda, (1994)
45,X	58.2	68.9	55.0	61.2	20.7	53.1
46,Xi(Xq)	7.3	10.8	5.5	6.0	5.7	3.5
45,X/46,XX	8.2	6.7	13.4	11.2	17.2	23.5
45,X/46,Xi(Xq)	11.8	10.8	4.7	7.8	12.6	4.7
45,X/46,Xr(X)	5.5	1.3	3.9	1.7	3.5	1.2
45,X/46,XY	5.4	2.7	3.1	2.6	2.3	2.3
45,X/46,Xdel(Xp)	0.9	4.05	0.8	2.6	2.3	2.3
45,X/46,Xdel(Xq)	0	0	1.6	1.7	3.5	1.2
45,X/47,XXX 6	1.8	4.0	0.8	0.9	6.9	4.6
45,X/46,XX/47,XXX						
45,X/46,X+mar	0	0	0.8	0	18.4	0

1.4.2 DISGENESIA GONADAL MIXTA

En 1961, Bergadá y cols. describieron por primera vez el síndrome de diferenciación gonadal asimétrica en pacientes con genitales externos ambiguos, conductos femeninos o masculinos, vagina normal y asimetría gonadal caracterizada por el desarrollo de un testículo en un lado y una estría fibrosa del otro. En 1964, Sohval denominó a este padecimiento disgenesia gonadal mixta.

Las disgenesias gonadales con cariotipo 45,X/46,XY exhiben un espectro fenotípico amplio que va desde un fenotipo masculino con testículos disgenéticos, hasta un fenotipo femenino con estrías gonadales bilaterales y estigmas somáticos de Turner. Sin embargo, la forma más estudiada ha sido la intermedia, disgenesia gonadal mixta o asimétrica (DGM), en la que los pacientes presentan asimetría gonadal (testículo de un lado y estría fibrosa o ausencia de gónada en el otro), persistencia de estructuras Mullerianas y grado variable de ambigüedad genital. Más de la mitad de estos individuos tienen baja estatura y la tercera parte presenta muchas características dismórficas similares a las encontradas en pacientes con síndrome de Turner clásico (Berkovitz, 1992; Méndez et al., 1993).

Es difícil entender el desarrollo de una gónada masculina sólo en un lado y no en el otro. De acuerdo a las teorías de diferenciación sexual el predominio de células germinales primordiales XY ó XO que migran a cada cresta genital influiría en la diferenciación gonadal hacia testículo o hacia una estría fibrosa, respectivamente. Consecuentemente, la diferenciación testicular y su capacidad funcional durante la vida fetal y postnatal, así como las características clínicas de los pacientes con DGM dependerían del predominio de la línea celular XY ó XO. La prevalencia de la línea XO resultaría en varias de las características clínicas del síndrome de Turner: estatura baja, cuello alado, implantación baja de pabellones auriculares, paladar arqueado, etc. El grado de masculinización dependería de la cantidad de tejido testicular presente (Bergadá et al., 1994). Sin embargo, en un estudio reciente de 16 individuos con disgenesia gonadal mixta, se observó que no existía una correlación entre el cariotipo y el fenotipo (Méndez et al., 1993).

Dado que los gonadoblastomas ocurren muy frecuentemente en una población muy selecta -individuos con gónadas disgenéticas y cromosoma Y- las disgenesias gonadales mixtas también presentan una alta frecuencia de estos tumores. Se ha estimado que la tercera parte de los pacientes con disgenesia gonadal mixta desarrollan gonadoblastoma y que 40% de las neoplasias son

bilaterales (afectan la estría fibrosa y el testículo). Aun cuando el gonadoblastoma es un tumor benigno, 30% desarrolla un tumor invasivo de células germinales, en general un disgerminoma, por lo que se considera mandatorio la excisión preventiva de ambas gónadas a edad temprana. Además, cuando el sexo de asignación es femenino la extirpación temprana de la gónada previene la posibilidad de la función androgénica de las células de Leydig del testículo durante la pubertad, lo cual resultaría en masculinización del individuo (Robboy et al., 1982). Por otro lado, cuando el sexo es masculino se recomienda la extirpación preventiva de las gónadas (estría fibrosa y testículo intraabdominal) y de las estructuras mullerianas, debiendo vigilarse en forma periódica los testículos intraescrotales (Berkovitz, 1992).

1.4.3 DISGENESIA GONADAL PURA

Descrito por Swyer (1955), este síndrome se caracteriza por un fenotipo femenino, estatura normal o alta, estrías fibrosas bilaterales, infantilismo sexual con amenorrea primaria, hábito eunucoide y cariotipo 46,XY. Las estructuras internas son femeninas con trompas bilaterales, útero y vagina hipoplásicos. Los genitales externos son femeninos e hipoplásicos (Grumbach y Conte, 1992).

La prevalencia de neoplasias gonadales, especialmente gonadoblastoma y germinoma (seminoma y disgerminoma) es elevada por lo que se practica gonadectomía bilateral preventiva (Verp y Simpson, 1987). La presencia de desarrollo mamario posterior a la edad normal de pubertad sugiere la presencia de un tumor gonadal secretor de andrógenos, aunque no se ha encontrado una correlación estricta entre la oncogénesis y el desarrollo mamario (Grumbach y Conte, 1992).

Aunque la mayoría de los casos son esporádicos y presentan un cariotipo 46,XY, se han reportado casos familiares con herencia ligada al cromosoma X (Berkovitz et al., 1991) y casos esporádicos en individuos con duplicaciones del brazo corto del cromosoma X. El análisis de esta duplicación en individuos XY normales y en XY con reversión sexual ha sugerido la existencia de uno o más genes en la porción distal de Xp, sujetos al proceso de inactivación e implicados en la diferenciación testicular (Ogata et al., 1992a).

El análisis molecular del gen *SRY* en pacientes con disgenesia gonadal pura XY ha demostrado que aproximadamente 80% tienen el gen *SRY* normal, mientras que el resto presenta mutaciones en este gen (Ver **tabla 1.2**). Todas las mutaciones reportadas a la fecha se localizan en la caja HMG del gen *SRY*, a excepción de una delección de 25 a 50 kb identificada a 1.8 kb del inicio del marco de lectura hacia el extremo 5' del gen. El resto de la secuencia génica es normal por lo que se atribuyó la reversión sexual a elementos reguladores de *SRY* (McElreavy et al., 1992).

En algunos casos, la mutación en el gen *SRY* se ha detectado tanto en mujeres XY como en familiares masculinos normales (Berta et al., 1990; Harley et al., 1992; Hawkins et al., 1992; Jäger et al., 1991; Jäger et al., 1992a; McElreavy et al., 1991, Vilain et al., 1992a). Para explicar estos casos heredados se ha propuesto que la variante de *SRY* interaccione con cualquiera de dos alelos de un segundo gen implicado en la determinación sexual. El desarrollo de dos individuos masculinos normales en esta familia resultaría de la interacción de la variante de *SRY* con el alelo normal del segundo gen, mientras que la interacción con el alelo mutado ocasionaría la reversión sexual (Vilain et al., 1992a).

TABLA 1.2 Principales mutaciones reportadas en la caja HMG del gen *SRY*.

PACIENTE	MUTACION en DNA	PROTEINA		ORIGEN	REFERENCIA
		Localización	Cambio		
AA	ATG → ATA	64	Met → Ile	<i>de novo</i>	Berta et al., 1990
JN ^a	GTG → CTG	60	Val → Leu	HP	Berta et al., 1990
JS	del ATTC	122	CM	<i>de novo</i>	Jäger et al., 1990
ML	TTC → TCC	109	Ser → Phe	HP	Jäger et al., 1992
N1 y N2 ^a	GTG → CTG	60	Val → Leu	HP	Vilain et al., 1992
ZB	CAG → TAG	93	Gln → *	<i>de novo</i>	McElreavy et al., 1992
Ca	GGA → CGA	95	Gly → Arg	<i>de novo</i>	Hawkins et al., 1992a
CHMO39	TGG → TAG	70	Trp → *	<i>de novo</i>	Hawkins et al., 1992a
207	AAA → ATA	106	Lys → Ile	?	Hawkins et al., 1992b
208	del A	109	CM	<i>de novo</i>	Hawkins et al., 1992b
213	ATC → ATG	90	Ile → Met	HP	Hawkins et al., 1992b
XYF	AAG → TAG	92	Lys → *	?	Müller et al., 1992b
SHM60	CGA → GGA	61	Arg → Gly	<i>de novo</i>	Affara et al., 1993
WY57 ^b	CAG → TAG	73	Gln → *	HP	Affara et al., 1993
WC58 ^b	CAG → TAG	73	Gln → *	HP	Affara et al., 1993
HN31	ATG → ACG	77	Met → Thr	<i>de novo</i>	Affara et al., 1993
GA55	CGG → TGG	132	Arg → Trp	?	Affara et al., 1993
?	G → A	113	Ala → Thr	<i>de novo</i>	Zeng et al., 1993

Abreviaturas: del = deleción; * = codón de terminación; CM = cambio de marco de lectura; HP = herencia paterna.

^a, ^b = hermanas

2.0 OBJETIVOS

- (1) Crear un banco de DNA de pacientes con síndrome de Turner con diferentes cariotipos, de disgenesias gonadales mixtas 45,X/46,XY y de disgenesias gonadales puras 46,XY.
- (2) Reconocer la presencia de secuencias centroméricas derivadas del cromosoma Y en DNA aislado de sangre periférica de pacientes con síndrome de Turner, para detectar mosaicos crípticos con cromosoma Y.
- (3) Esclarecer el origen de cromosomas marcadores en pacientes con síndrome de Turner.
- (4) Detectar la presencia de los genes *ZFY* y *SRY* en DNA aislado de sangre periférica de pacientes con síndrome de Turner (en las que se haya detectado secuencias centroméricas del cromosoma Y) y otras disgenesias gonadales (mixtas y puras).
- (5) Correlacionar los hallazgos moleculares con la expresión fenotípica de estos pacientes.
- (6) Desarrollar la tecnología de DNA recombinante para su aplicación en problemas de la diferenciación sexual y en otros padecimientos genéticos.

3.0 MATERIALES Y METODOS

3.1 PACIENTES

Se estudiaron 40 pacientes con diagnóstico de síndrome de Turner, 5 con disgenesia gonadal mixta y 2 con disgenesia gonadal pura 46,XY.

3.2 ESTUDIOS CITOGENETICOS

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

3.3 ESTUDIOS MOLECULARES

3.3.1 Aislamiento de DNA genómico

Se llevó a cabo mediante una técnica previamente descrita (Escobar y Zamora, 1992), tomando como base 5ml de sangre periférica para las cantidades requeridas en cada paso. Se colocó la sangre en tubos Vacutainer conteniendo EDTA y se centrifugó durante 25min a 3000rpm. Se desechó el plasma y los glóbulos rojos. Se transfirió la capa de glóbulos blancos a un tubo y se añadió 1.6ml de solución de lisis de glóbulos rojos (BLGR: 10mM Tris pH 7.6, 5mM MgCl₂, 10mM NaCl). Se agitó suavemente y se centrifugó a 3000 rpm durante 10min. Se decantó el sobrenadante. Al botón de glóbulos blancos restante se le agregó nuevamente BLGR, se homogenizó y se centrifugó a 3000 rpm durante 10min. Este último tratamiento se efectuó tantas veces como fuera necesario para que la muestra perdiera su color rojo. Finalmente, se resuspendió el botón de glóbulos blancos en 165ml de BLGR y se añadió 1ml de solución de lisis de glóbulos blancos (BLGB: 10mM Tris pH 7.6, 10mM EDTA pH 8, 50mM NaCl, 0.2% SDS, 200µg/ml de proteinasa K). Se incubó en baño María a 42°C toda la noche. Se extrajo dos veces con 1 volumen de fenol-cloroformo (1:1) y una vez con 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se le

añadió NaCl 5M hasta una concentración final de 100mM y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C. Se colectó el DNA precipitado con una pipeta pasteur de punta curvada. Se lavó el DNA sumergiéndolo varias veces en etanol al 70%. Se dejó secar al aire. Se resuspendió en 200-400µl de TE (10mM Tris-Cl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). Se conservó a -20°C, manteniendo una alícuota de 100 µl a 4°C.

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

(a) Se asignó una clave de identificación por padecimiento (T: síndrome de Turner, DG: disgenesia gonadal mixta y DP: disgenesia gonadal pura) seguida de un número progresivo y del año en curso. En cuanto a los controles, los masculinos tuvieron la clave CM y los femeninos la CF. Además, los microtubos que contienen las muestras de DNA se etiquetaron con diferente color para facilitar su localización.

(b) Se realizó un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm. Se calculó la concentración de la muestra de DNA mediante la fórmula $1D.O. 260 = 50 \text{ mg/ml}$ de DNA. Una relación 260/280 cercana a 1.8 se consideró óptima (Sambrook et al., 1989).

(c) Se analizaron alícuotas de 1-2µg de DNA en electroforesis en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio 0.0002%.

3.3.2 Sondas moleculares

Se utilizaron las sondas de DNA pY97 y pDP1007. La primera corresponde a una familia de secuencias alfoides repetidas de la región centromérica del cromosoma Y humano. Contiene un fragmento genómico de 5.3 kb en el sitio *EcoRI* de pUC13 y detecta por hibridación DNA-DNA una banda de 5.5 kb, al digerir el DNA genómico con *EcoRI* (Wolfe et al., 1985). La sonda pDP1007 contiene un fragmento genómico de 1.3 kb derivado del cromosoma Y humano insertado en el sitio *HindIII* de pUC13 y detecta por hibridación DNA-DNA, en DNA genómico digerido con *EcoRI*, una banda de 3.5 kb en Yp11.3 que corresponde al gen *ZFY*. Esta sonda hibrida en forma cruzada con el gen homólogo *ZFX* en Xp21.3 observándose una banda de 1.8 kb (Page et al., 1987a). Las sondas fueron proporcionadas por el Dr. R. P. Erickson de la Universidad de Arizona en Tucson.

3.3.3 Transformación bacteriana

Para la introducción de los plásmidos en la cepa JM101 (*supE thi Δ [lac pro AB/F' traD proAB lacI]*) de *Escherichia coli* se utilizó la técnica de cloruro de calcio (Sambrook et al., 1989). Esta consistió en cultivar a la cepa bacteriana en 30 ml de caldo cerebro corazón (CCC) a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase logarítmica, concentrarla, resuspenderla en 10 ml solución de cloruro de calcio (50 mM CaCl₂, 10 mM Tris, pH 8.0) e incubarla a 4°C durante 12-16 h. Posteriormente, a estas células competentes se les agregó el DNA del plásmido (10-20 ng/10ml) y se expusieron a un choque térmico de 42° C por 2 min. Se suplementó la suspensión con CCC y se incubó a 37° C durante 1 h. Se sembraron alícuotas de 0.1ml en medio de cultivo selectivo (agar cerebro corazón + 200mg/ml de ampicilina). Se incubaron a 37°C durante 24 h.

3.3.4 Purificación de plásmido

Se utilizó el método de ebullición (Ausubel et al., 1987). Se inocularon 5 ml. de medio de cultivo infusión cerebro corazón con una colonia bacteriana transformada con el plásmido correspondiente y se incubaron toda la noche a 37° C. Se inocularon 500 ml. de medio de cultivo infusión cerebro corazón, conteniendo el antibiótico correspondiente, con el cultivo anterior y se incubaron a 37° C durante 8 h. con agitación vigorosa. Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 5000 rpm/ 30 min. y se resuspendieron en 20 ml. de STET (sacarosa 8%, 0.5% Tritón X-100, 50 mM Tris, 50mM EDTA, pH 8.0) más 2 ml. de lisozima (10 mg/ ml en 25 mM Tris-Cl, pH 8). Se mezcló suavemente, se llevó a ebullición en una flama abierta y se colocó en baño de agua hirviendo por 1 min. Se enfrió en baño de hielo y se centrifugó a 12 000 rpm/ 20 min. Se decantó el sobrenadante a un tubo limpio y se le agregó 0.6 vol. de isopropanol. Se mezcló por inversión y se dejó reposar 10-20 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10 000 rpm/30 min. El precipitado se suspendió en TE y se trató con RNAsa (100 µg/ ml) a temperatura ambiente durante 1 h.

Se extrajo 1 vez con 1 volumen de fenol, 1 vez con 1 volumen de fenol -cloroformo 1:1 y 1 vez con 1 volumen de cloroformo - alcohol isoamílico 24:1. La fase acuosa se precipitó con 2 volúmenes de etanol a -20°C. Se centrifugó y se resuspendió en un volumen adecuado de TE. La pureza e integridad del plásmido se analizó en gel de agarosa 0.8% en TBE (0.089 mM Tris base, 0.089mM ácido bórico, 0.002 mM EDTA pH 8.0) con 0.5 µg /ml de bromuro de etidio.

3.3.5 Purificación de insertos

Se digirieron los plásmidos con las enzimas apropiadas (pY97 con *EcoRI* y pDP1007 con *Hind III*). Se separaron los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%. El aislamiento del fragmento de DNA correspondiente al inserto de interés se realizó utilizando nitrógeno líquido (Koenen, 1989). Brevemente, la banda del DNA de interés se cortó del gel, se colocó en una punta de micropipeta con tapón de algodón y se incubó por 5 min. en nitrógeno líquido. La punta de micropipeta se colocó en un microtubo agujerado en la base, que a su vez se puso en otro microtubo. Se centrifugó durante 5 min a velocidad máxima en una microfuga. La solución acuosa conteniendo el DNA se colectó en el segundo tubo, mientras que la matriz de agarosa se queda en la punta de micropipeta. Se añadió 1/ 10 vol. de 4M LiCl y se extrajo con un volumen de fenol. El DNA se precipitó de la fase acuosa con 3 vol. de etanol a -20°C. Se centrifugó a 12000rpm/15 min, se dejó secar al aire y se resuspendió en un volumen adecuado de TE. Se conservó a 4° C. Se calculó su concentración mediante lectura espectrofotométrica a 260 nm. Se verificó su peso molecular mediante corrimiento electroforético.

3.3.6 Marcaje de sondas

El inserto de DNA que se utilizó como sonda molecular se marcó radiactivamente mediante la técnica de hexanucleótidos al azar, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Amersham, Aylesbury, England). Brevemente, en un microtubo se colocaron 100 ng del inserto de DNA y 1.25 µl de la mezcla de hexanucleótidos al azar (1.8 mg/ml con BSA 4 mg/ml), en un volumen final de 7 µl. Se hirvió durante 2 min y se colocó en hielo. Se le agregaron 2.5 µl de solución de dNTPs (dCTP, dTTP y dGTP 1mM 10X en 250 mM Tris-HCl pH 7.8 , 25 mM MgCl₂, y 50 mM 2-mercaptoetanol) 10 µl de solución RH 2.5X, 1 µl del fragmento Klenow de la DNA polimerasa (3-8 U) y 50 µCi de dATP α ³² P. Se aforó a 25 µl con H₂O y se incubó a temperatura ambiente 12-18 h. Se paró la reacción añadiendo 2 µl de 0.5M EDTA pH 8.0. Se agregaron 100 µl de TE y se separó el DNA marcado de la marca libre mediante cromatografía en columna de Sephadex G-50 en TE (Sambrook et al., 1989). Se calculó el porcentaje de incorporación midiendo con un contador Geiger manual la radiactividad en el tubo y en la columna.

3.3.7 Digestión del DNA genómico

En todos los casos se digirieron 10µg de DNA genómico con 30U de *EcoRI* (3U/µg) a 37°C durante 18-24 h. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, incluyéndose un marcador de peso molecular (DNA de fago λ digerido con *Hind III*). La electroforesis se realizó durante 18 h a 2 volts/cm para una mejor resolución de los fragmentos de alto peso molecular (Sambrook et al., 1989).

3.3.8 Transferencia a filtros de nitrocelulosa e hibridación DNA-DNA

El DNA fue desnaturalizado *in situ* sumergiéndolo el gel en solución desnaturalizante (1.5M NaCl, 0.25M NaOH) durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se neutralizó colocando el gel en una solución neutralizante (1.5M NaCl, 1M Tris-Cl pH 8.0) durante 1h a temperatura ambiente. El DNA del gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa reforzada con nylon (Duralose UV, Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo al procedimiento descrito por Southern (1975). Los filtros se prehibridaron a 42° C durante 24 h en 75 µl/cm² de solución de prehibridación (50% formamida desionizada, 6X SSC [20X es 3M NaCl, 0.3M citrato trisódico, pH 7.0] 0.5% SDS, 5X sol. Denhart [50X es 1% albúmina sérica bovina, 1% Ficoll 400, 1% polivinilpirrolidona] 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón). Se hibridaron con el inserto de DNA radiactivo a 42° C durante 24 h en 50 µl/cm² de solución de hibridación (igual fórmula que para prehibridación). Los filtros se lavaron dos veces con 2X SSC/0.1% SDS a temperatura ambiente y una vez con 0.2X SSC/0.1% SDS a 55° C durante 30 min. Se expusieron a película X-OMAT K (Kodak, Guadalajara, Jalisco) con pantalla intensificadora durante 3-5 días a -70° C (Sambrook et al., 1989).

3.3.9 Reacción en cadena de la polimerasa

Se utilizaron 4 pares de oligonucleótidos que se describen a continuación:

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

Y1: 5'-ATG ATA GAA ACG GAA ATA TG-3'

Y2: 5'-AGT AGA ATG CAA AGG GCT CC-3'

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

X1: 5'-AATCATCAAATGGAGATTTG-3'

X2: 5'-GTTCAGCTCTGTGAGTGAAA-3'

Para el gen *ZFY* se utilizó el par TDF4 y TDF5 que limita una región de 400 pb (Schneider-Gädicke et al., 1989; Bailey et al 1992).

TDF4: 5'-ATG TGG CTG TCC ACA AAG GT-3'

TDF5: 5'-AAG CTT GTA GAC ACA CTG TT -3'

(3) Se amplificó una región de 609 pb del gen *SRY* mediante el par SRY1 y SRY2 (Sinclair et al., 1990; Bailey et al,1992).

SRY1: 5'-CGA CAA TGC AAT CAT ATG C-3'

SRY2: 5'-TAG CGG TCC CGT TGC TGC-3'

La amplificación se realizó en todos los casos a partir de 0.5-1 µg de DNA genómico. Los oligonucleótidos fueron adquiridos de Bio-Synthesis, Inc., Denton, TX. y los reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa de Perkin Elmer. Los programas de amplificación se realizaron en equipo Techne PHC-1y fueron, respectivamente :

(a) 30 ciclos de 94°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min y 1 ciclo de 72°C durante 9.9 min para los pares Y1,Y2 y X1,X2;

(b) 30 ciclos de 95°C/1min, 55°C/1.3min, 72°C/1.3min y un ciclo de 72°C durante 9.9 min para el par TDF4 y TDF5; y

(c) 33 ciclos de 95°C/1min, 53°C/1min, 72°C/1min y un ciclo de 72°C durante 9.9 min para el par SRY1 y SRY2.

Los productos de cada reacción de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio 0.0002%, incluyéndose un marcador de peso molecular (escalera de 100pb ó pBluescript digerido con *HpaI*).

4.0 RESULTADOS

Se estudiaron 47 pacientes con diferentes tipos de disgenesia gonadal: 40 con síndrome de Turner, 5 con disgenesia gonadal mixta y 2 con disgenesia gonadal pura 46,XY.

Las características clínicas y citogenéticas de 40 pacientes con fenotipo Turner se muestran en la **Tabla 4.1** El cariotipo inicial fue 45,X en 26 casos, 45,X/46,XX en 4 casos, 45,X/46,X+mar en 4 casos, 45,X/46,Xi(Xq) en 4 casos, 45,X/46,Xdel(Xp) en 1 caso y 45,X/46,XY en 1 caso.

La **Figura 4.1** muestra los cariotipos parciales en sangre periférica de las 8 pacientes informativas con síndrome de Turner (T1, T3, T9, T13, T22, T31, T32 y T35). En las pacientes T1, T9, T13 y T35 se reconoció la presencia de un mosaico con dos líneas celulares, una monosómica para el cromosoma X (45,X) y la segunda con un cromosoma marcador (46,X + mar). El cromosoma anormal era un anillo pequeño en las pacientes T1 y T9, y de tamaño intermedio en las pacientes T13 y T35. Todos los marcadores presentaban la región centromérica teñida cuando se utilizaron bandas CBG, y sólo se observó la presencia de una pequeña región heterocromática en el cromosoma marcador de la paciente T1. Sin embargo, las técnicas citogenéticas no permitieron identificar con certeza el origen de los marcadores. La paciente T3 presentaba un mosaico 45,X/46,XY. El cromosoma Y tenía características morfológicas y bandas CBG sin anomalías.

La **Tabla 4.2** resume los hallazgos moleculares en las 40 pacientes con síndrome de Turner estudiadas.

Las **Figuras 4.2 a 4.6** muestran los resultados moleculares de las 8 pacientes: 4 casos con un cromosoma marcador (T1, T9, T13, y T35), 3 pacientes 45,X en las que se detectaron secuencias del Y (T22, T31 y 32), la paciente T3 con cariotipo 45,X/46,XY y los controles masculinos y femeninos. El resto de las pacientes no presentó marcadores citogenéticos y además fueron negativas para secuencias del cromosoma Y. En estas pacientes se amplificó en forma paralela y como control positivo la región centromérica del cromosoma X mediante PCR. La presencia de una banda de 130 pb en todas ellas demostró que la ausencia de secuencias del Y no es debida a problemas metodológicos (resultados no mostrados).

La hibridación DNA-DNA con la sonda centromérica Y97 en las 40 pacientes con fenotipo

Turner reveló la presencia de una banda de 5.5 kb sólo en las pacientes T1, T3, T22, T31, T32 y en el control masculino (**Figura 4.2**). El análisis por PCR con los oligonucleótidos Y1 y Y2 demostró la presencia de una banda de 170 pb en las mismas pacientes y en el control masculino, confirmando la presencia de regiones alfoides centroméricas del cromosoma Y (**Figura 4.3**). Estos resultados indican que el marcador de la paciente T1 corresponde a un cromosoma Y y que la paciente T3 presenta un cromosoma Y aparentemente normal. Los casos T22, T31 y T32 con cariotipo 45,X presentan secuencias centroméricas del Y. En las pacientes T9, T13 y T35 la ausencia de secuencias centroméricas del Y permite proponer que los marcadores citogenéticos correspondan a anillos del X.

La hibridación DNA-DNA con la sonda pDP1007 demostró la banda de 3.5 kb correspondiente al gen *ZFY* sólo en las pacientes T3, T31, T32 y en el control masculino. Las 8 pacientes y ambos controles muestran la banda de 1.8 kb correspondiente al gen *ZFX* (**Figura 4.4**). La electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados mediante PCR y los oligonucleótidos TDF4 y TDF5 en el DNA de estas pacientes y en los controles se observa en la **Figura 4.5**. Sólo se observa la banda específica de 400 pb en las pacientes T3, T31 y T32 y en el control masculino, confirmando los hallazgos de la hibridación DNA-DNA con pDP1007. En el caso T3 con cariotipo 45,X/46,XY se confirma la presencia de esta región del cromosoma Y. En los casos T31 y T32 se identifica el gen *ZFY* en el genoma de estas pacientes, citogenéticamente 45,X. La ausencia de *ZFY* en la paciente T1 indica que el punto de ruptura en la formación del anillo está por debajo de la región Yp11.3. En las pacientes T9, T13 y T22 no se observó la banda correspondiente a *ZFY*.

El gen *SRY* sólo fue analizado por PCR. La **Figura 4.6** muestra los resultados de esta amplificación en las 8 pacientes Turner antes señaladas y en los controles. Sólo se observó la presencia de una banda de 609 pb correspondiente a *SRY* en las pacientes T3, T31 y T32. En el primer caso, T3, con cariotipo 45,X/46,XY indica la presencia de *SRY* en el cromosoma Y, mientras que en T31 y T32 demuestra la existencia de esta región de Yp en el genoma. La ausencia de *SRY* en T1 es congruente con la ruptura de Yp por debajo de *ZFY*. Tres de las pacientes 45,X presentan secuencias del Y (**Tabla 4.2**): T22 (Ycen+), T31 y T32 (Ycen+, *ZFY*+, *SRY*+), lo que condujo a la revisión de los cariotipos originales y al análisis de 500 metafases en cada caso. En 2 pacientes (T22 y T31) el cariotipo fue 45,X en todas las células analizadas, en cambio en la paciente T32 se

reconoció un cromosoma marcador en 2 de 500 metafases.

La **Tabla 4.3** muestra las características clínicas e histopatológicas de 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta. En la **Tabla 4.4** se muestran los hallazgos citogenéticos en estos pacientes. Todos los casos mostraron un cariotipo 45,X/46,XY (datos no mostrados).

Los hallazgos clínicos de 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY se observan en la **Tabla 4.5**.

La **Figura 4.7** muestra la hibridación DNA-DNA con la sonda Y97 en los 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta, en las 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY y en controles masculinos y femeninos. Con excepción del control femenino, todos los casos son positivos para la región centromérica del cromosoma Y. Estos datos se confirmaron por PCR utilizando los oligonucleótidos Y1 y Y2 (**Figura 4.8**).

Las **Figura 4.9** muestra la hibridación DNA-DNA utilizando la sonda pDP1007 en los 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta (**4.9a**) y en las 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY (**4.9b**) y en controles masculinos y femeninos. En todos los casos, con excepción del control femenino, se observó la banda de 3.5 kb correspondiente a *ZFY*. La banda de 1.8 kb del gen *ZFX* estuvo presente en todos los pacientes y en ambos controles. El análisis del gen *ZFY* mediante PCR confirmó los resultados observados con la sonda pDP1007 (**Figura 4.10**).

La electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos SRY1 y SRY2 en el DNA de los 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta, en las 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY y en los controles normales se observa en la **Figura 4.11**. La banda de 609 pb correspondiente al gen *SRY* estuvo presente en todos los pacientes y en el control masculino, no observándose en el control femenino.

Las **Tablas 4.6 y 4.7** resumen los hallazgos moleculares de los 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta y de las 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY, respectivamente.

TABLA 4.1 Características clínicas y citogenéticas de 40 pacientes con fenotipo de Turner.

Paciente	Edad (años)	Motivo de consulta.	Talla (m)	Estigmas de Turner*						Cariotipo inicial
				PC	CV	NP	MC	C	CC	
T1	26	Infertilidad	1.42	+	+	+	-	-	+	45,X/46,X+mar
T2	22	Amenorrea p.	1.31	+	+	+	+	+	+	45,X
T3	26	Amenorrea p.	1.31	+	+	+	+	+	+	45,X/46,XY
T4	18	Amenorrea p.	1.29	+	+	+	-	-	+	45,X
T5	15	Talla baja	1.26	+	+	+	-	+	+	45,X
T6	27	Amenorrea p.	1.33	+	+	+	+	-	+	45,X
T7	20	Amenorrea p.	1.34	+	+	+	-	-	+	45,X
T8	16	Talla baja	1.27	+	+	+	+	+	+	45,X
T9	9	Obesidad	1.13	+	+	+	-	-	+	45,X/46,X+mar
T10	17	Talla baja	1.28	+	+	+	-	-	+	45,X
T11	33	Infertilidad	1.32	-	+	+	-	-	+	45,X
T12	11	Talla baja	1.07	+	+	+	-	+	+	45,X
T13	11	Talla baja	1.08	-	+	+	+	-	+	45,X/46,X+mar
T14	32	Infertilidad	1.37	-	+	+	-	-	+	45,X/46,Xi(Xq)
T15	13	Talla baja	1.18	+	+	-	-	-	+	45,X
T16	16	Amenorrea p.	1.30	+	+	+	-	-	+	45,X
T17	25	Cardiopatía	1.31	-	+	-	+	+	-	45,X
T18	11	Talla baja	1.06	+	+	+	-	+	+	45,X
T19	24	Amenorrea p.	1.26	+	+	-	-	-	+	45,X
T20	18	Cardiopatía	1.25	+	+	+	-	+	+	45,X
T21	22	Obesidad/ talla baja	1.28	+	+	+	+	-	+	45,X
T22	13	Talla baja	1.38	-	+	+	-	-	+	45,X
T23	37	Abdomen agudo	1.34	-	+	+	-	-	+	45,X/46,Xdel(Xp)
T24	17	Talla baja	1.27	+	+	+	+	-	+	45,X
T25	19	Amenorrea p.	1.39	-	-	+	-	-	+	45,X/46,XX
T26	20	Amenorrea p.	1.29	+	+	+	+	-	+	45,X/46,XX
T27	17	Talla baja/ amenorrea p.	1.23	-	+	+	-	-	+	45,X/46,Xi(Xq)
T28	10	Talla baja	1.12	+	-	-	-	+	+	45,X
T29	20	Amenorrea p.	1.27	+	+	+	+	+	+	45,X
T30	6	Talla baja	0.98	-	+	-	-	-	+	45,X
T31	14	Talla baja	1.26	-	+	-	+	+	+	45,X
T32	15	Talla baja	1.30	+	-	-	+	-	+	45,X
T33	21	Amenorrea p.	1.32	+	+	+	-	-	+	45,X
T34	14	Talla baja	1.23	+	+	-	-	-	+	45,X
T35	14	Cardiopatía	1.32	-	-	+	-	+	+	45,X/46,X+mar
T36	18	Talla baja / amenorrea p.	1.31	-	+	+	-	+	+	45,X/46,Xi(Xq)
T37	18	Megacolon	1.31	+	+	+	-	-	+	45,X/46,Xi(Xq)
T38	26	Esterilidad	1.36	-	-	+	-	-	+	45,X/46,XX
T39	24	Amenorrea p.	1.40	-	-	+	+	+	-	45,X/46,XX
T40	19	Amenorrea p.	1.29	-	-	+	+	+	+	45,X

* Abreviaturas: PC: *pterygium coli*; CV: *cubitus valgus*; NP: nevos pigmentados; MC: 4o metatarsiano y metacarpiano cortos; C: clinodactilia bilateral del 5º dedo; CC: cuello corto.

TABLA 4.2 Hallazgos moleculares y cariotipos definitivos en 40 pacientes con síndrome de Turner.

Paciente	Hibridación DNA-DNA			PCR			Cariotipo definitivo	% de líneas mosaico
	Y97	ZFY	ZFX	Y1	Y2	ZFY		
T1	+	-	+	+	-	-	45,X/46,Xr(Y)	10/90
T2	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T3	+	+	+	+	+	+	45,X/46,XY	60/40
T4	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T5	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T6	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T7	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T8	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T9	-	-	+	-	-	-	45,X/46,Xr(X)	84/16
T10	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T11	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T12	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T13	-	-	+	-	-	-	45,X/46,Xr(X)	88/12
T14	-	-	+	-	-	-	45,X/46,Xi(Xq)	70/30
T15	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T16	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T17	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T18	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T19	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T20	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T21	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T22	+	-	+	+	-	-	45,X	100
T23	-	-	+	-	-	-	45,X/46,Xdel(Xp)	65/35
T24	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T25	-	-	+	-	-	-	45,X/46,XX	52/48
T26	-	-	+	-	-	-	45,X/46,XX	40/60
T27	-	-	+	-	-	-	45,X/46,Xi(Xq)	38/72
T28	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T29	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T30	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T31	+	+	+	+	+	+	45,X	100
T32	+	+	+	+	+	+	45,X/46,Xr(Y)	99.6/0.4
T33	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T34	-	-	+	-	-	-	45,X*	100
T35	-	-	+	-	-	-	45,X/46,Xr(X)	62/38
T36	-	-	+	-	-	-	45,X/46,Xi(Xq)	57/43
T37	-	-	+	-	-	-	45,X/46,Xi(Xq)	80/20
T38	-	-	+	-	-	-	45,X/46,XX	72/28
T39	-	-	+	-	-	-	45,X/46,XX	45/55
T40	-	-	+	-	-	-	45,X*	100

*Sólo se descartó mosaicismo XY, pero no la presencia de una línea XX.

TABLA 4.3 Hallazgos citogenéticos en 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta.

Paciente	Cariotipo	% de células XO		% de células XY	
		Sangre	Gónadas *	Sangre	Gónadas *
DG1	45,X/46,XY	54	ND	46	ND
DG2	45,X/46,XY	46	ND	54	ND
DG3	45,X/46,XY	90	100	10	0
DG4	45,X/46,XY	86	ND	14	ND
DG5	45,X/46,XY	80	80	20	20

*Los estudios citogenéticos en las gónadas fueron realizados en el Depto. Biología de la Reproducción, INNSZ

ND: no determinado

TABLA 4.4 Características clínicas de 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY.

Paciente	Edad (años)	Sexo de asignación	Talla (m)	Genitales externos	Gónadas	Desarrollo mamario
DP1	18	Femenino	1.70	Femeninos hipoplásicos	Estrías fibrosas intrabdominales	Negativo
DP2	24	Femenino	1.74	Femeninos hipoplásicos	Estrías fibrosas intrabdominales	Negativo

TABLA 4.5 Características clínicas e histopatológicas de 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta.

Paciente	Edad (años/meses)	Fenotipo	Estigmas de Turner	Genitales externos	Gónada		Genitales internos	
					derecha	izquierda	derecha	izquierda
DG1	1/8	Masculino	Metacarpiano bilateral corto. Manchas " <i>café au lait</i> "	Falo 3.0 cm Hipospadias peneoescrotal	Estría	Testículo intraescrotal	Trompa de Falopio	Epidídimo
DG2	0/1	Masculino	Cuello corto y alado	Falo 2.5 cm Hipospadias peneoescrotal	Estría	Testículo inguinal	Trompa de Falopio	Epidídimo
DG3	27/0	Masculino	Implantación baja de cabello Cuello corto Múltiples nevos	Falo 4.0 cm Hipospadias perineoescrotal Vello púbico escaso	Estría	Testículo intraescrotal	Trompa de Falopio	Epidídimo
DG4	1/10	Masculino	Implantación baja de cabello Cuello corto y alado	Falo 3.0 cm Hipospadias peneoescrotal	Testículo inguinal	Estría	Epidídimo	Trompa de Falopio
DG5	7/0	Masculino	Asimetría facial Paladar alto	Falo 3.0 cm Hipospadias perineoescrotal	Estría	Testículo inguinal	Trompa de Falopio	Epidídimo

TABLA 4.6 Hallazgos moleculares en 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta.

Paciente	Hibridación DNA-DNA			Y1Y2	PCR	
	Y97	ZFY	ZFX		ZFY	SRY
DG1	+	+	+	+	+	+
DG2	+	+	+	+	+	+
DG3	+	+	+	+	+	+
DG4	+	+	+	+	+	+
DG5	+	+	+	+	+	+

TABLA 4.7 Hallazgos moleculares en 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY.

Paciente	Hibridación DNA-DNA			Y1Y2	PCR	
	Y97	ZFY	ZFX		ZFY	SRY
DP1	+	+	+	+	+	+
DP2	+	+	+	+	+	+

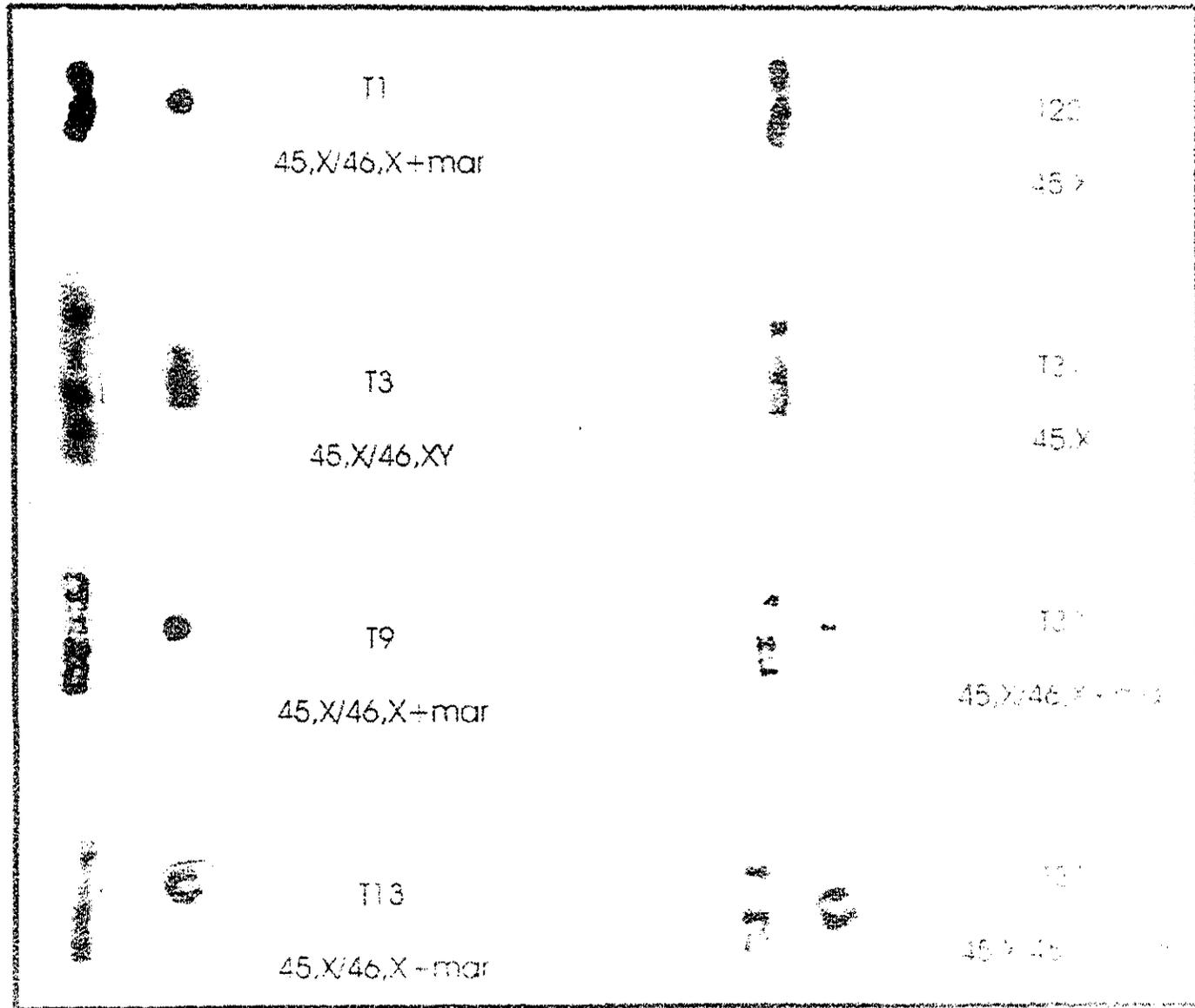


Figura 4.1. Cariotipos parciales de las ocho pacientes informativas con síndrome de Turner (T1, T3, T9, T13, T22, T31, T32 Y T35).



Figura 4.2. Hibridación DNA-DNA utilizando la sonda Y97. CF: control femenino; CM: control masculino; T1, T3, T9, T13, T22, T31, T32 y T35: pacientes con síndrome de Turner. Los números corresponden al peso molecular (kb) de fragmentos de DNA del fago lamda digerido con *HindIII*. Los carriles CM, T1, T3, T22, T31 y T32 muestran una banda de 5.5kb (◄) correspondiente a la región centromérica del cromosoma Y.

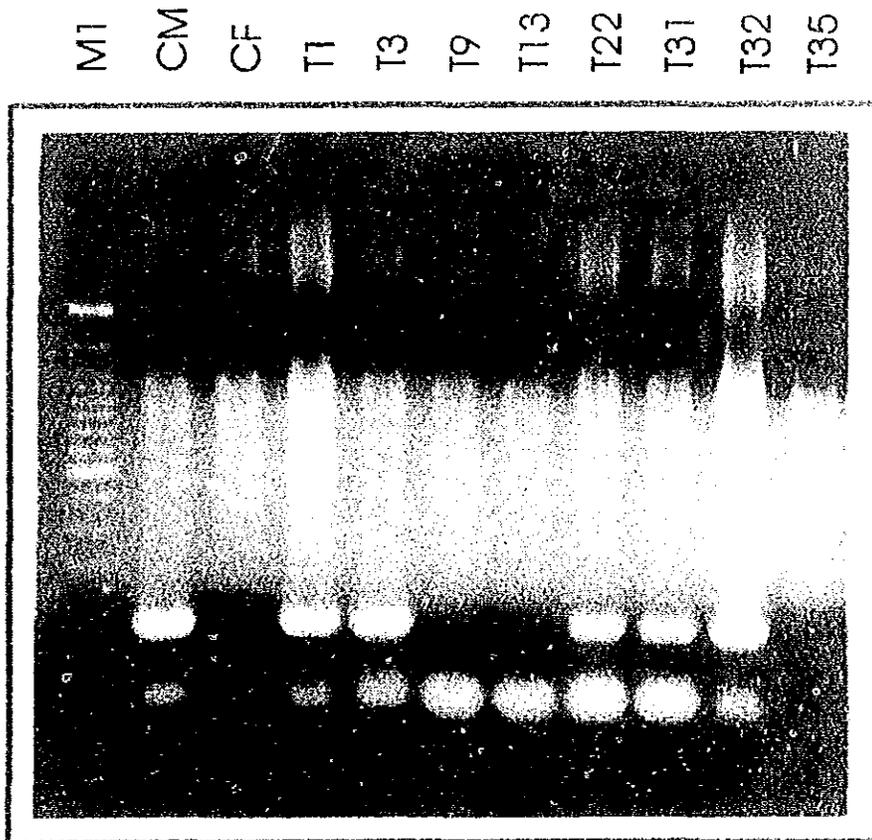


Figura 4.3. Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Y1 y Y2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. M1: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb); CM: control masculino; CF: control femenino; T1, T3, T9, T13, T22, T31, T32, T35: pacientes con síndrome de Turner. Los carriles CM, T1, T3, T22, T31 Y T32 muestran una banda de 170 pb(◄) correspondiente a la región centromérica del cromosoma Y.

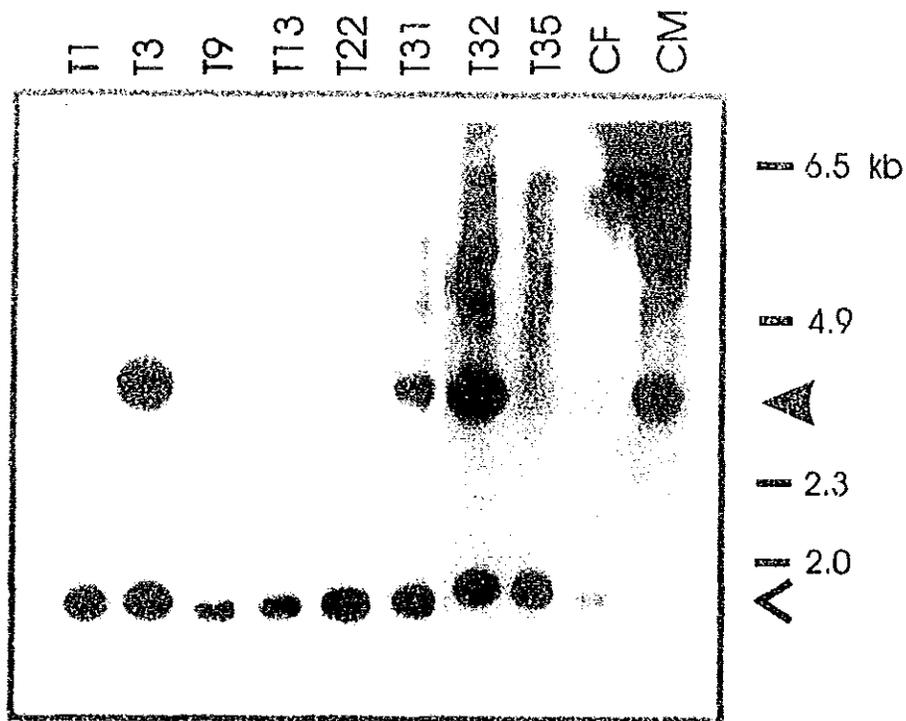


Figura 4.4 Hibridación DNA-DNA utilizando la sonda pDP1007. T1, T3, T9, T13, T22, T31, T32 y T35: pacientes con síndrome de Turner; CF: control femenino; CM: control masculino. Los números corresponden al peso molecular (kb) de fragmentos de DNA del fago lamda digerido con *HindIII*. Los carriles T3, T31, T32 y CM muestran una banda de 3.5 kb (▲) correspondiente al gen *ZFY* (Yp11.3). En todos los carriles se reconoce una banda de 1.8 kb (←) correspondiente al gen *ZFX* (Xp21.3).

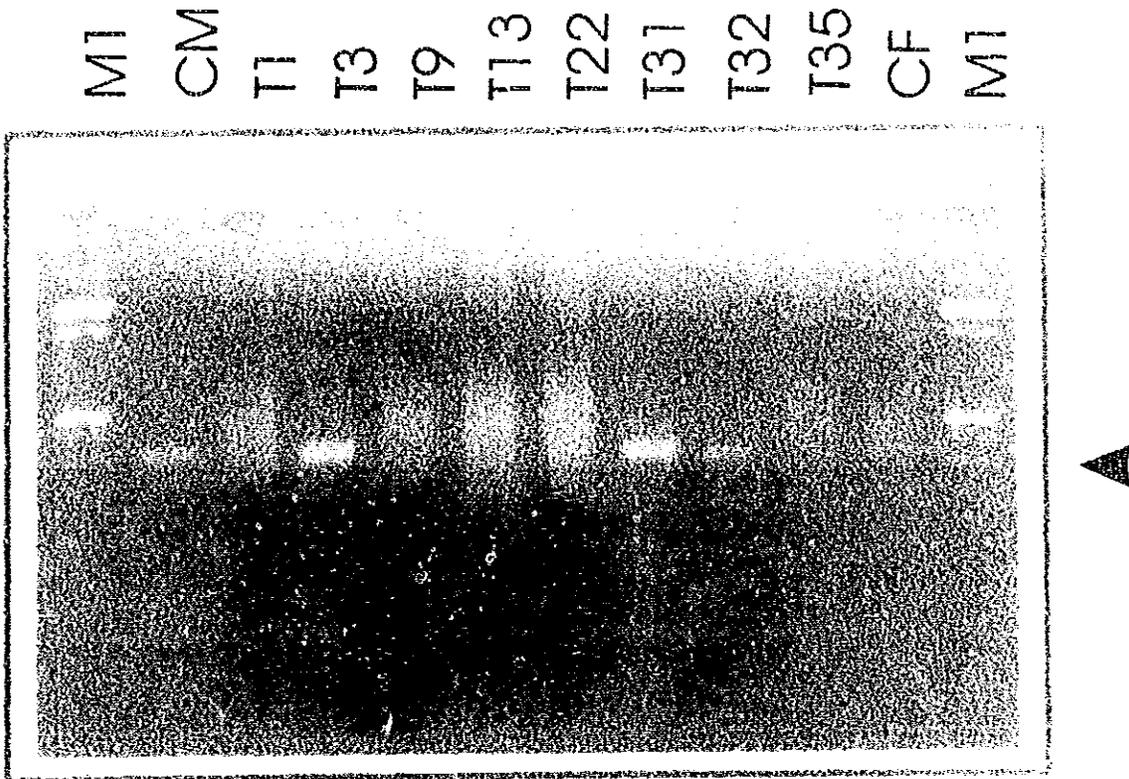


Figura 4.5 Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos TDF4 y TDF5 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. M1: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb); CM: control masculino; T1, T3, T9, T13, T33, T31, T32 y T35: pacientes con síndrome de Turner; CF: control femenino ; M1: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Los carriles CM, T3, T31 y T32 muestran una banda de 400 pb correspondiente a *ZFY* (◄).

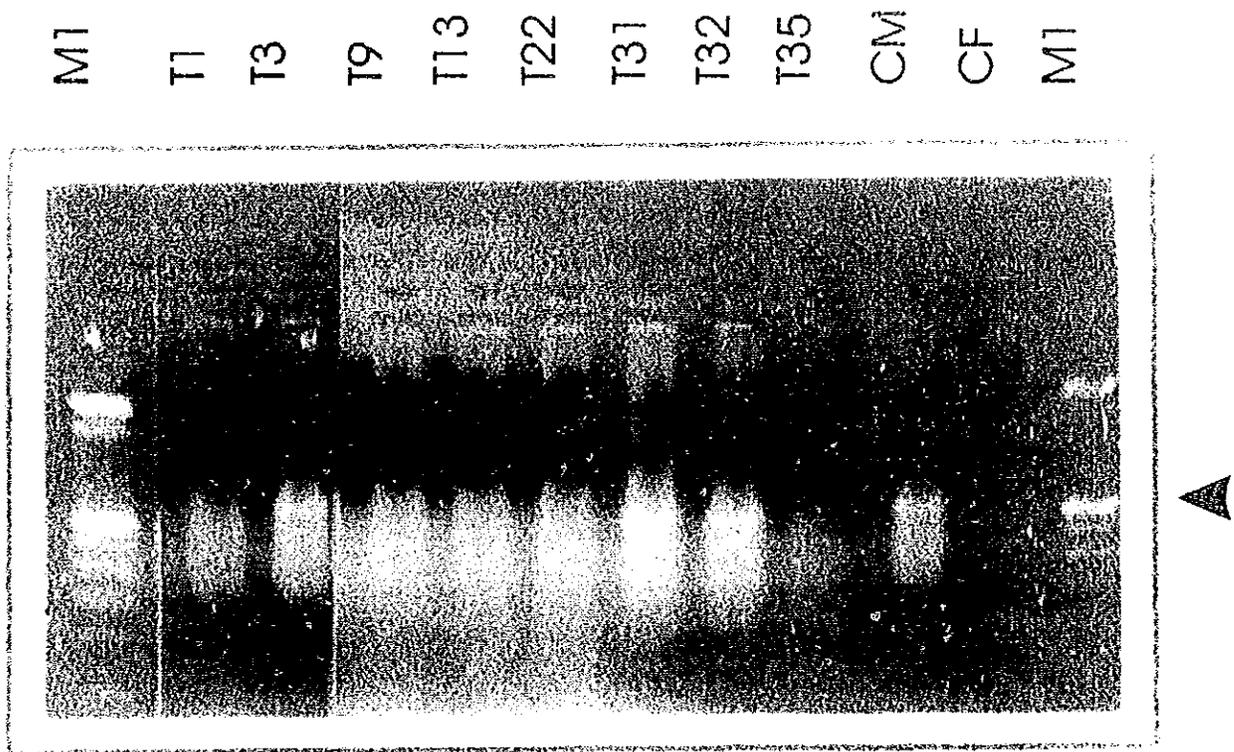


Figura 4.6. Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos SRY1 y SRY2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. M1: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb); T1, T3, T9, T13, T22, T31, T32 y T35: pacientes con síndrome de Turner; CM: control masculino; CF: control femenino; M1: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb) . Los carriles T3, T31, T32 y CM muestran una banda de 609 pb correspondiente a *SRY* (◄).

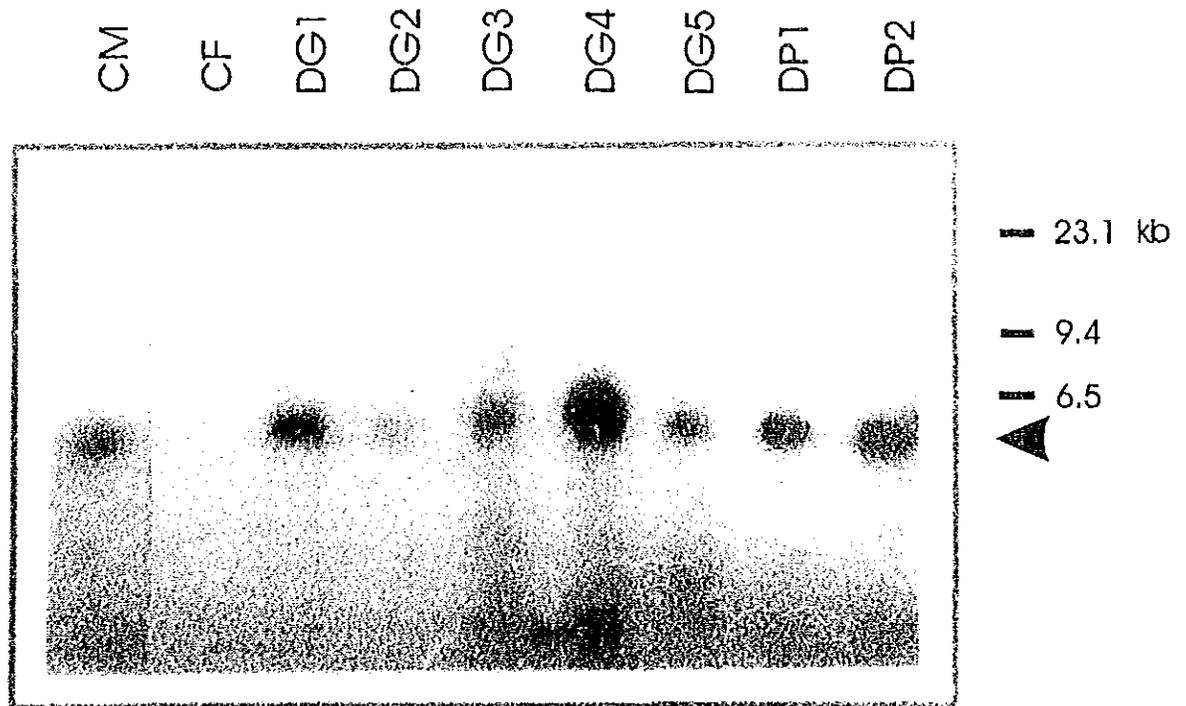


Figura 4.7. Hibridación DNA-DNA utilizando la sonda Y97. CM: control masculino; CF: control femenino; DG1-DG5: pacientes con disgenesia gonadal mixta; DP1, DP2: pacientes con disgenesia gonadal pura 46, XY. Los números corresponden al peso molecular (kb) de fragmentos de DNA del fago lamda digerido con *HindIII*. Los carriles CM, DG1, DG2, DG3, DG4, DG5, DP1 y DP2 muestran una banda de 5.5 kb (▲) correspondiente a la región centromérica del cromosoma Y.

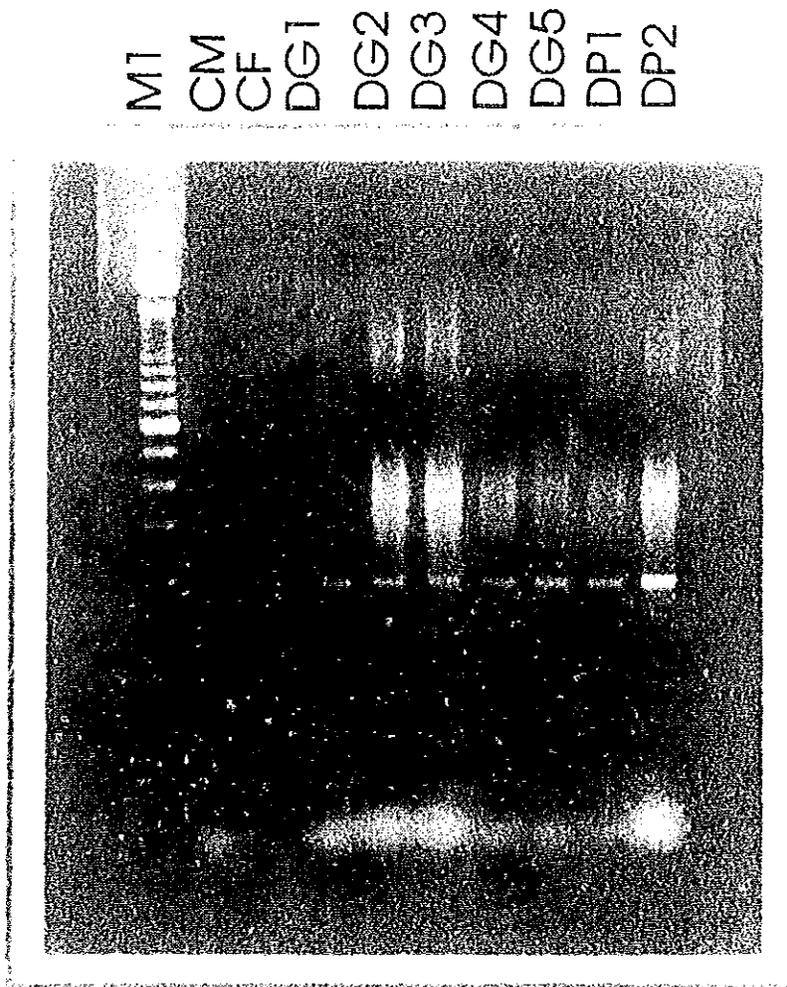


Figura 4.8. Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Y1 y Y2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. M1: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb); CM: control masculino; CF: control femenino; DG1-DG5: pacientes con disgenesia gonadal mixta; DP1, DP2: pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY. Los carriles CM, DG1, DG2, DG3, DG4, DG5, DP1 y DP2 muestran una banda de 170 pb (◄) correspondiente a la región centromérica del cromosoma Y.

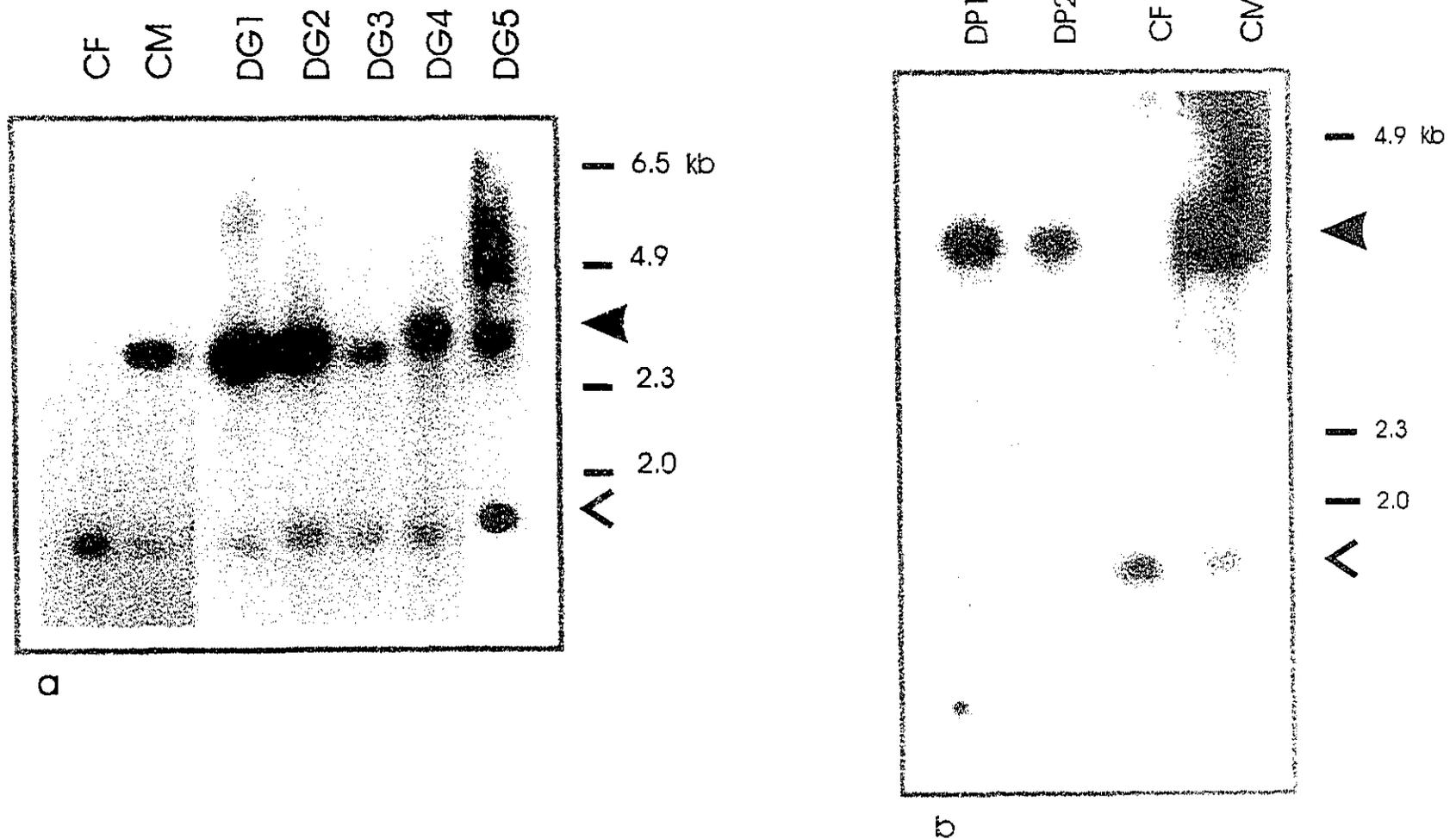


Figura 4.9. Hibridación DNA-DNA utilizando la sonda pDP1007.

(a) CF: control femenino; CM: control masculino; DG1-DG5: pacientes con disgenesia gonadal mixta; **(b)** DP1, DP2: pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY; CF: control femenino; CM: control masculino. Los números corresponden al peso molecular (kb) de fragmentos de DNA del fago lambda digerido con *HindIII*. Los carriles CM, DP1, DP2, DG1, DG2, DG3, DG4 y DG5 muestran una banda de 3.5 kb (▲) correspondiente al gen *ZFY* (Yp11.3). En todos los carriles se reconoce una banda de 1.8 kb (←) correspondiente al gen *ZFX* (Xp21.3).

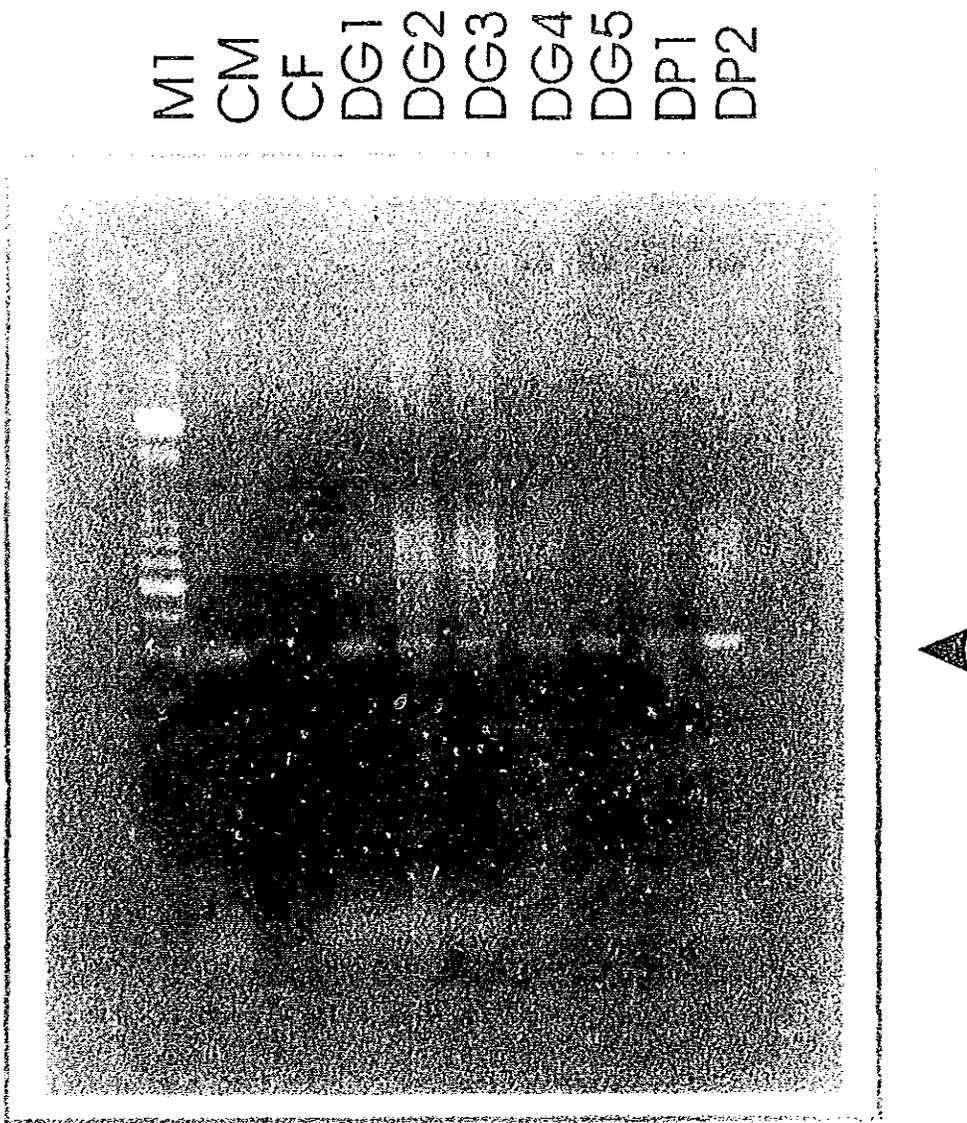


Figura 4.10. Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos TDF4 y TDF5 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. M1: marcador de peso molecular (escala de 100 pb); CM: control masculino; CF: control femenino; DG1-DG5: pacientes con disgenesia gonadal mixta; DP1, DP2: pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY. Los carriles CM, DG1, DG2, DG3, DG4, DG5, DP1 y DP2 muestran una banda de 400 pb correspondiente a *ZFY* (◄).

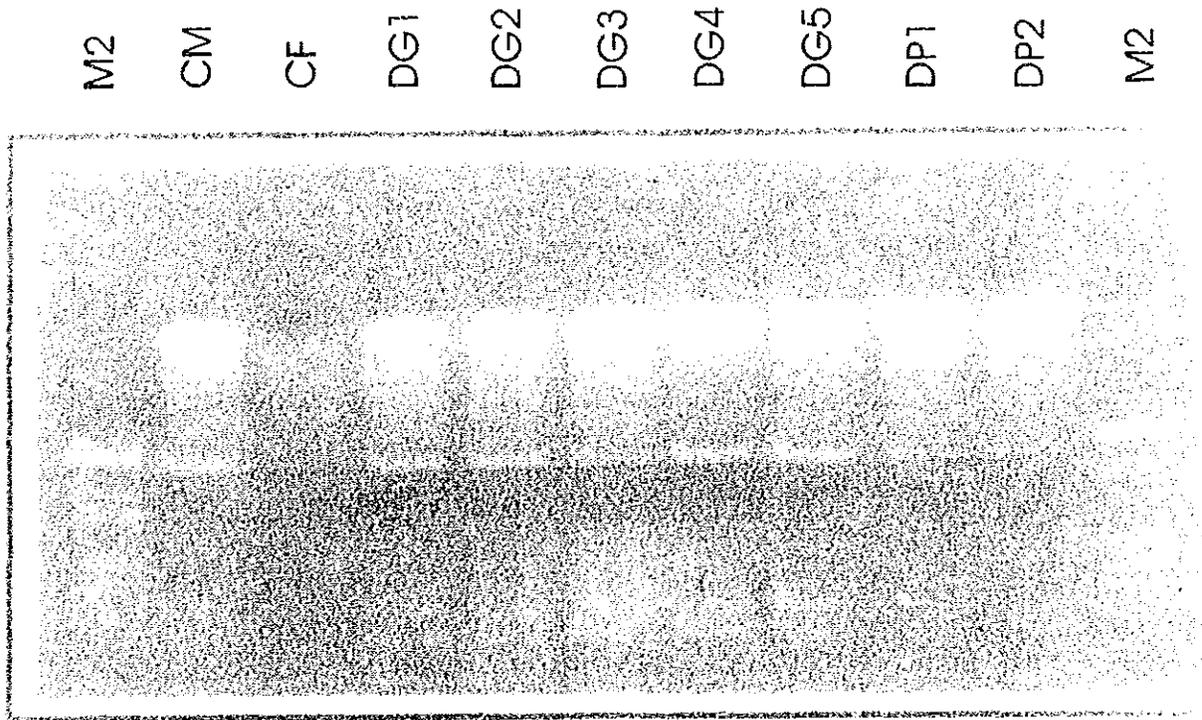


Figura 4.11. Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos SRY1 y SRY2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. M2: marcador de peso molecular (pBluescript digerido con *HpaI*: 713, 489, 404, 367, 242, 190, 147, 118 pb); CM: control masculino; CF: control femenino; DG1-DG5: pacientes con disgenesia gonadal mixta; DP1, DP2: pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY; M2: marcador de peso molecular (pBluescript digerido con *HpaI*:713, 489, 404, 367, 242, 190, 147, 118 pb). Los carriles CM, DG1, DG2, DG3, DG4, DG5, DP1 y DP2 muestran una banda de 609 pb correspondiente *SRY* (◄).

5.0 DISCUSION

En los mamíferos, el papel crucial del cromosoma Y en la determinación sexual masculina está bien establecido debido a la presencia en Yp del factor determinante testicular *TDF* (McLaren, 1988). En la búsqueda de *TDF*, originalmente se reconoció al gen *ZFY* que codifica para una proteína con dedos de zinc, un motivo de unión a DNA presente en algunos factores de transcripción (Page et al., 1987a). Este gen se descartó como *TDF* (Bull et al., 1988; Sinclair et al., 1988; Koopman et al., 1989; Schneider-Gädicke et al., 1989; Palmer et al., 1989; Verga y Erickson, 1989) y aun cuando su función no es clara, su expresión ha sido demostrada en todas las células. Esto sugiere una función celular general y no una participación en un evento específico del desarrollo (Lau y Chan, 1989; Schneider-Gädicke et al., 1989; Erickson et al, 1993). Por otra parte, la presión selectiva para mantener este gen en el cromosoma Y durante la evolución de los mamíferos sugiere que tenga una función específica en el sexo masculino. La observación de que la expresión de los homólogos murinos *Zfy-1* y *Zfy-2* es dependiente de la presencia de las células germinales, permite proponer que estos genes estén relacionados con el proceso de espermatogénesis (Koopman et al., 1990).

Considerando que el síndrome de Turner pudiera ser resultado de la haploinsuficiencia de uno o más genes del cromosoma X, que escapen al mecanismo de inactivación y que presenten un homólogo funcional en el Y, los genes *ZFY* y *RPS4Y*, han sido sugeridos como genes anti Turner (Fisher et al., 1990; Ogata et al., 1993). Sin embargo, las evidencias no son concluyentes (Page et al., 1990; Just et al., 1992).

En 1990, se localizó al gen *SRY* en una región de 35 kb próxima al límite pseudoautosómico en la porción distal de Yp en pacientes con reversión sexual (varones XX y mujeres XY). El gen *SRY* codifica para una proteína con capacidad de unión a DNA por lo que se asume actúa como un factor de transcripción específico de secuencia (Sinclair et al., 1990). La evidencia actual indica que el gen *SRY* es equivalente a *TDF*: en ratones XX transgénicos para *Sry* el desarrollo es masculino (Koopman et al., 1991), y en algunas disgenesias gonadales puras 46,XY se presentan mutaciones *de novo* en el gen *SRY* (Berta et al., 1990; Jäger et al., 1990; Hawkins et al., 1992a y 1992b; Affara et al., 1993).

El hallazgo de estos genes específicos del cromosoma Y ha permitido el estudio molecular en pacientes con diferentes tipos de disgenesia gonadal. El término " disgenesia gonadal" fue utilizado antes de que se realizaran análisis citogenéticos para definir a individuos con genitales femeninos, estructuras Mülllerianas normales y estrías fibrosas. De estos pacientes, algunos tenían estigmas de Turner y otros carecían de ellos (Berkovitz, 1992).

Con el propósito de reconocer la presencia de secuencias del cromosoma Y en individuos mexicanos con diferentes tipos de disgenesia gonadal , en el presente trabajo se analizaron 40 pacientes con síndrome de Turner, 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta y 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY.

El síndrome de Turner es una de las anormalidades cromosómicas más comunes con una incidencia aproximada de 1 en 2500 recién nacidas vivas. El cariotipo 45,X analizado en sangre periférica, se observa en aproximadamente 50% de estas pacientes, el resto presenta dos cromosomas X, uno de los cuales es anormal o bien un mosaico con una segunda línea celular con un cromosoma X ó Y estructuralmente normal o anormal (Hall y Gilchrist, 1990).

En la presente investigación, los estudios citogenéticos en sangre periférica de las 40 pacientes con fenotipo Turner mostraron un complemento cromosómico 45,X en 25 de los casos (62.5%) . Las 15 pacientes restantes (37.5%) presentaron un mosaico 45,X/46,XX (4 casos), 45,X/46,Xi(Xq) (4 casos), 45,X/46,X+mar (5 casos), 45,X/46,Xdel(Xp) (1 caso) y 45,X/46,XY (1 caso).

Es importante señalar que en este estudio no se analizó la frecuencia de mosaicos con cromosoma X, por lo que la frecuencia del cariotipo 45,X (62.5%) debe tomarse con cierta cautela. Además, si se considera el efecto fetoprotector del mosaicismo (Held et al., 1992; Kelly et al., 1992) es de suponerse que varias de las pacientes estudiadas presenten una segunda línea celular con cromosoma X normal o anormal.

Diversos estudios han demostrado que el tamaño citogenético del cromosoma marcador no es un factor suficiente para su identificación (Johnson et al., 1991; Cooper et al., 1991; Lindgren et al., 1992). No obstante, los estudios moleculares en pacientes con síndrome de Turner han permitido reconocer el origen de cromosomas marcadores y la presencia de mosaicos crípticos no detectados mediante técnicas citogenéticas convencionales (Gemmill et al., 1987; Stalvey et al., 1988; López

et al., 1993). Además, debido al elevado riesgo (15-20%) que tienen estas pacientes de desarrollar gonadoblastoma o disgerminoma cuando presentan mosaico con cromosoma Y o con un marcador derivado del Y, es importante la caracterización de cromosomas marcadores y la detección de mosaicos ocultos (Verp y Simpson, 1987; Page, 1987; Scully, 1970).

Los estudios moleculares utilizando las sondas Y97 y pDP1007 en hibridación DNA-DNA y oligonucleótidos para la región centromérica del cromosoma Y y para los genes ZFY y SRY mediante PCR, revelaron que 5 pacientes con síndrome de Turner (T1, T3, T22, T31 y T32) presentaban secuencias del Y. Los casos T1 (45,X/46,X + mar) y T22 (45,X) sólo fueron positivos para la región centromérica (Ycen), tanto por hibridación DNA-DNA con la sonda Y97 como mediante PCR con los oligonucleótidos Y1 y Y2. En cambio, las pacientes T3 (45,X/46,XY), T31 y T32 (45,X) fueron positivas tanto para la región centromérica como para los genes ZFY y SRY. Estos datos permiten concluir que el marcador de la paciente T1 (Ycen+, ZFY-, SRY-) corresponde a un anillo del cromosoma Y, cuyo punto de ruptura está por debajo de Yp11.3. La paciente T22, citogenéticamente 45,X, también fue positiva para Ycen y negativa para los genes ZFY y SRY. Estos resultados sugieren la presencia de un mosaico críptico con una segunda línea celular con cromosoma Y anormal, posiblemente similar al de T1. Los casos T3 (45,X/46,XY), T31 (45,X) y T32 (45,X) fueron positivas para la región centromérica y para los genes ZFY y SRY. En T3 se confirmó la normalidad de Yp, mientras que las pacientes T31 y T32 fueron consideradas como mosaicos ocultos con una segunda línea celular con cromosoma Y normal o anormal.

El hallazgo de secuencias del cromosoma Y en las pacientes T22, T31 y T32, citogenéticamente 45,X, condujo a una segunda revisión citogenética en sangre periférica. Se identificó un cromosoma marcador en 2 de 500 células analizadas en el caso T32, mientras que en los casos T22 y T31 sólo se observaron 500 metafases 45,X. En éstas dos últimas pacientes, el análisis citogenético en otros tejidos podría revelar una segunda línea celular con un cromosoma Y normal o anormal.

Aún cuando el número de pacientes analizadas es pequeño (n=40) el hallazgo de 5 casos con secuencias del cromosoma Y (12.5%) es elevado.

Los estudios comparativos de la frecuencia de gonadoblastomas en pacientes con síndrome de Turner que presentan mosaicismo con cromosomas Y han sugerido que la integridad del cromosoma, particularmente la presencia de la región distal heterocromática Yqh, es un requisito para la

aparición del tumor (Lukusa et al., 1986). Se ha postulado la existencia de un gen *GBY* en el brazo largo o en la región pericentromérica del cromosoma Y, responsable de la predisposición de las gónadas disgenéticas a desarrollar gonadoblastomas y con alguna función fisiológica en los varones normales (Page, 1987). Además, se ha sugerido que en estas pacientes el gonadoblastoma se origine por un proceso de dos eventos, el primero sería la existencia de una gónada disgenética y el segundo, la actividad de un gene (*GBY*) localizado en o cerca de Yqh (De Arce et al., 1991). De acuerdo a la evidencia citogenética se asume que las pacientes T1 y T3 presentan la región Yqh, mientras que en la paciente T32 el tamaño del marcador es tan pequeño que no permite la detección citogenética de esta región. En los casos T22 y T31 el análisis citogenético no permitió la identificación del cromosoma Y, por lo que se desconoce su estructura. Sin embargo, como las evidencias respecto a la asociación de Yqh con el desarrollo tumoral no son concluyentes, en todas las pacientes positivas para el cromosoma Y (T1, T3, T22, T31, T32 y T35) se sugirió la extirpación preventiva de las estrías fibrosas para evitar el riesgo de malignización.

Las demás pacientes con síndrome de Turner (n=35) fueron negativas para todas las secuencias del cromosoma Y analizadas. Este hallazgo permitió descartar que los cromosomas marcadores de las pacientes T9, T13 y T35 se originaran a partir del cromosoma Y, concluyéndose que son derivados del cromosoma X. En ausencia de material genético derivado del cromosoma Y en el genoma de estas pacientes, el manejo clínico no incluyó la extirpación de las gónadas.

Es interesante señalar que cuando los anillos provenientes del cromosoma X son pequeños las pacientes con síndrome de Turner tienen un riesgo elevado de presentar retraso mental, convulsiones, estrabismo, infecciones óticas y displasia pigmentaria. Además, tienen talla más baja y cabeza más pequeña que el promedio de pacientes con fenotipo Turner. Se ha propuesto que este fenotipo severo sea debido a la pérdida de la región del centro de inactivación (gen *XIST*) localizada en Xq13. Esta delección ocasionaría la falta de inactivación en los r(X) pequeños (van Dyke et al., 1992). Sin embargo, también se ha observado retraso mental en casos con r(Y) pequeños y con r(X) grandes y se ha demostrado la replicación tardía de r(X) pequeños y la expresión de *XIST* en algunos pacientes afectados (Dennis et al., 1993). En nuestra población, ni las pacientes T1 y T22 con r(Y) ni las pacientes T9, T13 y T35 con r(X) presentaron retraso mental aún cuando el tamaño del r(X) en T9 es pequeño.

Se ha sugerido la presencia de un gen (es) responsable del crecimiento en la región pseudoau-

tosómica distal de Yp (Ogata et al., 1992c). La estatura (1.42 m) de la paciente T1 (45,X/46,X+mar) llama la atención por ser más elevada que la habitualmente observada para este padecimiento en nuestra población (1.32 ± 0.06 m) (Arenas, 1989). Es posible que este gen se haya perdido en la formación del anillo, pero probablemente se haya conservado la región que controla la estatura en Yq11 (Alvesalo et al., 1981). No obstante, las demás pacientes con secuencias del Y (T3, T22, T31 y T32) presentan una estatura dentro del rango para síndrome de Turner en nuestra población.

Este estudio demuestra la importancia de los estudios moleculares en pacientes con fenotipo Turner. Para propósitos prácticos, la utilización de la sonda Y97 en hibridación DNA-DNA o el uso de los oligonucleótidos Y1 y Y2 por PCR es probablemente suficiente para verificar la naturaleza del cromosoma sexual marcador o para identificar mosaicos crípticos con cromosoma Y en pacientes con fenotipo de Turner. Sin embargo, el estudio molecular de otras regiones génicas del cromosoma Y permite analizar su posible implicación en la etiología del padecimiento. La presencia del gen *ZFY* en las pacientes T3, T31 y T32 contradice la propuesta de que *ZFY* sea un gen antiTurner, aunque con la metodología utilizada no se puede descartar una mutación. Es importante señalar la presencia del gen *SRY* en estas mismas pacientes. Este gen, equivalente de TDF, determina el desarrollo testicular en la gónada indiferenciada; sin embargo, las pacientes T3, T31 y T32 presentan estrías fibrosas bilaterales. Esto podría deberse a la presencia de la línea celular 45,X y/o a una mutación en el gen *SRY*.

En 1962, Bergadá y cols. describieron un tipo de disgenesia gonadal caracterizada por ambigüedad de genitales externos y la presencia de testículo de un lado y estría fibrosa contralateral, denominándola disgenesia gonadal asimétrica. Del lado del testículo se observaron derivados Wolffianos y del lado de la estría derivados Mülllerianos. La mayor parte de estos pacientes presenta estigmas de Turner, incluyendo talla baja (Méndez et al., 1993). En 1964, Sohval denomina a este padecimiento disgenesia gonadal mixta. La mayor parte de estos pacientes exhiben un cariotipo 45,X/46,XY, aunque también pueden presentar otros complementos cromosómicos tales como 46,XY; 45,X/47,XXY ó 45,X/47,XYY. El cromosoma Y de estos pacientes puede ser normal o presentar alguna alteración estructural (Berkovitz, 1992). Sin embargo, se ha demostrado que en presencia de un cariotipo 45,X/46,XY se observa un amplio espectro fenotípico que va desde masculino con testículos disgenéticos bilaterales, pasando por la disgenesia gonadal mixta, hasta

pacientes con fenotipo Turner y estrías gonadales bilaterales (Kofman-Alfaro et al., 1981).

En los 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta, el análisis citogenético en sangre periférica reveló un cariotipo 45,X/46,XY. El estudio citogenético en gónada sólo se realizó en los casos DG3 y DG5. No obstante, no fue posible correlacionar los hallazgos citogenéticos con el fenotipo en ninguno de los casos.

El análisis molecular en el DNA aislado de sangre periférica de los 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta reveló la presencia de la región centromérica y de los genes *ZFY* y *SRY* del cromosoma Y en todos los casos. Estos datos confirman la presencia de un cromosoma Y con un brazo corto aparentemente normal. Estos pacientes presentan una frecuencia elevada de gonadoblastomas y disgerminomas, por lo que debe realizarse extirpación preventiva de las gónadas (Kofman-Alfaro et al., 1981; Robboy et al., 1982; Berkovitz, 1992).

En los casos de disgenesia gonadal mixta 45,X/46,XY positivos para los genes *ZFY* y *SRY* es difícil explicar la existencia de tejido testicular en un lado y estría fibrosa contralateral. Se ha sugerido que en presencia de un mosaico 45,X/46,XY ambas líneas de células germinales migren a cualquiera de los lados y que la predominancia de una sobre otra influya en la diferenciación hacia testículo o hacia estría fibrosa. Además, la prevalencia de la línea 45,X resultaría en características clínicas del síndrome de Turner (Bergadá et al., 1994). Sin embargo, se ha demostrado que la ausencia de células germinales primordiales es incompatible con la diferenciación ovárica pero no con la testicular (Merchant, 1984). Por otro lado, el estudio de las características clínicas, citogenéticas, endocrinológicas e histopatológicas en 16 pacientes con disgenesia gonadal mixta demostró la dificultad de establecer una correlación apropiada entre estos parámetros. El cariotipo 45,X/46,XY fue el más frecuente con predominio de las células 45,X tanto en sangre periférica como en gónada; no obstante, todos los pacientes presentaron asimetría gonadal y estigmas de Turner (Méndez et al., 1993).

La presencia de *SRY* hace suponer un desarrollo testicular normal, sin embargo en estos pacientes sólo hay testículo de un lado. En estos casos, *ZFY* +, los estigmas de Turner no pueden explicarse por la haploinsuficiencia de este gen. La investigación del gen *RPS4Y* en estos pacientes sería importante ya que ha sido propuesto también como gen anti Turner (Fisher et al., 1990). Es importante señalar que no se realizaron estudios de secuencia que permitieran descartar o identificar mutaciones en los genes *ZFY* y *SRY*.

Es interesante el hallazgo de pacientes 45,X/46,XY con presencia de los genes *ZFY* y *SRY* pero con dos fenotipos diferentes, uno de Turner con estrías bilaterales (T3, T31 y T32) y otro de disgenesia gonadal mixta con testículo de un lado y estría fibrosa contralateral (DG1-DG5). La explicación al respecto es compleja y en este momento meramente especulativa. En estos pacientes la secuenciación de los genes *ZFY* y *SRY*, la detección del gen *RPS4Y* y la identificación de mutaciones en el cromosoma X o en autosomas podrían ayudar a resolver esta aparente paradoja.

Otro tipo de disgenesia gonadal es la que fuera originalmente descrita por Swyer (1955) con el nombre de disgenesia gonadal pura XY. La mayoría de estos pacientes presenta un cariotipo 46,XY y se caracteriza por genitales externos femeninos, desarrollo de estructuras Mülllerianas y estrías fibrosas bilaterales (Grumbach y Conte, 1992)

Los estudios moleculares en pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY con fenotipo femenino han evidenciado que en la mayoría de ellas el gen *SRY* está presente y con características normales (Behzadian et al., 1991; Pivnick et al, 1992; Pao et al, 1992). Sólo en algunos casos se han identificado mutaciones en el dominio de unión a DNA, la caja HMG del gen *SRY* (Tabla 1.2). Esto ha llevado a sugerir que las causas más probables de reversión sexual XY sean mutaciones en segmentos aún no caracterizados del gen *SRY* o mutaciones en otros *loci*, localizados en el cromosoma X o en autosomas, que actúan en la vía de la diferenciación sexual (Pivnick et al., 1992).

Los resultados del estudio molecular en las 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY mostraron la presencia de la región centromérica y de los genes *ZFY* y *SRY*. En ambos casos, los genes presentan el tamaño molecular esperado aunque no se realizaron estudios de secuenciación que permitieran demostrar o descartar la presencia de mutaciones.

Recientemente, se ha propuesto la existencia de dos tipos de mujeres XY. En el primer grupo estarían aquellas que presentan un cromosoma Y prácticamente intacto y estrías fibrosas bilaterales, pero que no exhiben estigmas de Turner. La causa de la reversión sexual en la mayoría de estas pacientes es desconocida y sólo algunas tienen mutaciones puntuales en *SRY*. El segundo grupo es mucho más raro y abarca a aquellas mujeres XY con reversión sexual debida a deleciones de Yp que incluyan *SRY*. La mayor parte de los casos presenta uno o más estigmas de Turner (Zinn et al., 1993). Las pacientes DP1 y DP2 no presentan cromosomas Y estructuralmente anormales ni estigmas de Turner, por lo que se asume pertenezcan al primer grupo.

Se ha sugerido que la morfología de la gónada pueda servir para reconocer la existencia o ausencia de mutaciones en el gen *SRY*. Las estrías fibrosas compuestas exclusivamente por estroma ovárico, sin túbulos y con nódulos esclerohialinos representarían reminiscencias de la gónada de una disgenesia gonadal pura 46,XY debida a mutaciones de *SRY*. Por otro lado, si la estría presenta túbulos y estroma indiferenciado correspondería a una reversión sexual XY como consecuencia de mutaciones en la vía de la diferenciación testicular y con un gen *SRY* normal (Vilain et al., 1993). Todas las pacientes con 46,XY con reversión sexual deben ser sometidas a laparotomía para extirpación preventiva de las gónadas, debido al elevado riesgo de malignización (Verp y Simpson, 1987). Los hallazgos en las gónadas de las pacientes DP1 y DP2 permiten asumir que corresponden al primer tipo de pacientes, ya que el estudio histológico reveló estrías fibrosas bilaterales desprovistas de túbulos y células germinales. No se reconoció la presencia de gonadoblastomas.

Se ha propuesto que en la disgenesia gonadal pura 46,XY la cantidad de proteína *SRY* mutada sea normal, mientras que en la disgenesia gonadal mixta 45,X/46,XY haya una disminución de la cantidad de proteína *SRY* normal (Berkovitz, 1992). No obstante, esta hipótesis no ha sido probada debido a que en individuos normales la proteína *SRY* se encuentra en cantidades muy bajas que no pueden ser detectadas por anticuerpos específicos (Hawkins, 1993).

En el humano existen varias anomalías de la determinación testicular que no están ligadas al cromosoma Y, y por lo tanto no se deben a defectos en *SRY*. Estas enfermedades incluyen el síndrome de tumor de Wilms, aniridia, retardo genitourinario y mental (WAGR), síndrome de Denys-Drash, enanismo camptomélico (todas autosómicas), la disgenesia gonadal XY ligada al X y autosómica, y la reversión sexual XY por duplicación de Xp (Moore y Grumbach, 1992). Además, la mayoría de los hermafroditas verdaderos 46,XX y algunos varones 46,XX presentan desarrollo testicular en ausencia de *SRY* (Ramsay et al., 1988; Palmer et al., 1989; Abbas et al., 1990; Ferguson-Smith et al., 1990; Pereira et al., 1991).

El análisis de las diferentes alteraciones de la diferenciación testicular, ligadas o no al cromosoma Y, permitirán resolver las preguntas claves de la función de *SRY*: ¿qué regula la expresión de *SRY* en la etapa crítica del desarrollo?, ¿qué genes son a su vez regulados por *SRY* y necesarios para llevar a cabo el programa de diferenciación testicular?, y ¿qué otros genes ligados al X o autosómicos participan en la determinación y la diferenciación gonadal cuya función es independiente de *SRY*?

6.0 CONCLUSIONES

- (1) Se creó un banco de DNA de 40 pacientes con síndrome de Turner con diferentes cariotipos, de 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta 45,X/46,XY y de 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY.
- (2) Se identificaron los cromosomas marcadores en 5 pacientes con síndrome de Turner
- (3) Se reconoció la presencia de secuencias centroméricas del cromosoma Y en 5 casos de síndrome de Turner (T1, T3, T22, T31 y T32).
- (4) El 12.5% de las pacientes con síndrome de Turner analizadas (n=40) presenta secuencias del cromosoma Y en su genoma.
- (5) Se identificó la presencia de los genes *ZFY* y *SRY* en las pacientes T3, T31 y T32. En T3 se confirmó la normalidad de Yp, mientras que los casos T31 y T32 fueron consideradas como mosaicos crípticos con una segunda línea celular con cromosoma Y normal o anormal.
- (6) Los hallazgos moleculares fueron importantes para el manejo clínico de las pacientes con síndrome de Turner. En los casos positivos para el cromosoma Y se sugirió la extirpación preventiva de las estrías fibrosas para evitar el riesgo de malignización.
- (7) Se demostró la presencia de los genes *ZFY* y *SRY* en los 5 pacientes con disgenesia gonadal mixta 45,X/46,XY y en las 2 pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY. En todos los casos, ambos genes presentaron el tamaño molecular esperado aunque no se realizaron estudios de secuenciación que permitieran demostrar o descartar la presencia de mutaciones.
- (8) No se pudo establecer una correlación entre los hallazgos moleculares y el fenotipo de los pacientes con síndrome de Turner y con disgenesia gonadal mixta .
- (9) Se desarrollaron métodos de DNA recombinante para aplicarse a anomalías de la diferenciación sexual y a otros padecimientos genéticos.
- (10) Este estudio demuestra la importancia de realizar estudios moleculares en pacientes con diferentes tipos de disgenesia gonadal.

7.0 BIBLIOGRAFIA

1. Abbas NE, Toublanc JE, Boucekkine C, Toublanc M, Affara NA, Job JC, Fellous M. (1990). A possible common origin of "Y-negative" human XX males and XX true hermaphrodites. *Hum Genet* **84**: 356-360.
2. Affara NA, Cham IJ, Ferguson-Smith MA. (1993). Analysis of the SRY in 22 sex-reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. *Hum Mol Genet* **2**: 785-789.
3. Affara NA, Ferguson-Smith MA. (1994). DNA sequences homology between the human sex chromosomes. En: "Molecular genetics of sex determination". SS Wachtel (ed). Academic Press, Inc. USA. pp:225-266.
4. Alvesalo K, de la Chapelle A. (1981). Tooth sizes in two males with deletions of the long arm of the Y chromosome. *Ann Hum Genet* **45**: 49-54.
5. Arenas S. (1989). Correlación fenotipo-cariotipo en mujeres con alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X. Tesis profesional. Facultad de Ciencias UNAM. México.
6. Armendares S, Salamanca F. (1977). Hallazgos clínicos y cromosómicos en 74 pacientes con síndrome de Turner atendidas en un hospital de Pediatría. *Rev Inv Clín* **29**: 295-304.
7. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DE, Seidman JG, Smith JA, Kevin S (editores). Current Protocols in Molecular Biology. Vol 1. John Wiley and Sons, USA 1987.
8. Bailey WA, Zwingman TA, Reznik VA, Griswold WR, Mendoza SA, Jones KL, Freidenberg GR. (1992). End-stage renal disease and primary hypogonadism associated with a 46,XX karyotype. *AJDC* **146**: 1218-1223.
9. Baker ML, Metcalfe SA, Hutson MJ. (1990). Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years, as determined by enzyme immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* **70**: 11-15.
10. Barr ML, Bertram EG. (1949). A morphological distinction between neurones of the male and the female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* **163**: 676-677.
11. Behzadian MA, Tho SPT, McDonough PG. (1991). The presence of the testicular determining sequence, SRY, in 46,XY females with gonadal dysgenesis. *Am J Obstet Gynecol* **165**: 1887-1890.
12. Bergadá C, Cleveland WW, Jones HW, Wilkins L. (1962). Gonadal histology in patients with male pseudohermaphroditism and atypical gonadal dysgenesis: Relation to theories of sex differentiation. *Acta Endocrinol* **40**: 493-520.
13. Bergadá C, Chemes H, Coco R. (1994). Dysgenetic male pseudohermaphroditism. En: Intersexual states. Disorders of sex differentiation. Ediciones Doyma, S.A. Barcelona. pp: 291-293.
14. Berkovitz GD. (1992). Abnormalities of gonadal determination and differentiation. *Sem Perinatol* **16**: 289-298.

15. Berkovitz GD, Fechner PY, Zacur HW. (1991). Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine* **70**: 375-383.
16. Bernstein R, Wade A, Rosendorf J, et al. (1986). Inverted Y chromosome polymorphism in the Gujerati Muslim Indian Population of South Africa. *Hum Genet* **74**: 223-229.
17. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* **348**: 448-450.
18. Bianchi ME, Falciola L, Ferrari S, Lilley DMJ. (1992). The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins. *EMBO J* **11**: 1055-1063.
19. Blanchard M, Josso N. (1974). Source of anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediatr Res* **8**: 968-971.
20. Bogan JS, Page DC. (1994). Ovary? Testis?-A mammalian dilemma. *Cell* **76**: 603-607.
21. Borsani G, Tonlorenzi R, Simmler MC, Dandolo L, Arnaud D, Capra V, Grompe M, Pizzuti A, Muzny D, Lawrence C, Willard HF, Avner P, Ballabio A. (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* **351**: 325-329.
22. Boyer TR, Erickson RP. (1994). Detection of circular and linear transcripts of *Sry* in pre-implantation mouse embryos: differences in requirements for reverse transcriptase. *Biochem Biophys Res Comm* **198**: 492-496.
23. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* **349**: 38-44.
24. Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafrenière RG, Xing Y, Lawrence J, Willard HF. (1992). The human *XIST* gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* **71**: 527-542.
25. Bull JJ, Hillis DM, O'Steen S.(1988). Mammalian ZFY sequences exist in reptiles regardless of sex-determining mechanism. *Science* **242**: 567-569.
26. Burgoyne PS. (1982). Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. *Hum Genet* **61**: 85-90.
27. Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1993). Circular transcripts of the testis-determining gene *Sry* in adult mouse testis. *Cell* **73**: 1019-1030.
28. Cate LR, Mattaliano RJ, Heisson C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, Fisher RA, Bertonis JM, Torres G, Wallner BP, Ramachandran KL, Ragin RC, Manganaro TF, MacLaughlin DT, Donahoe PK. (1986). Isolation of the bovine and human genes for Müllerian Inhibiting Substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* **45**: 685-698.

29. Chandley AC, Goetz P, Hargreave TB, Joseph AM, Speed, RM. (1984) On the nature and extent of XY pairing in meiotic prophase in man. *Cytogenet Cell Genet* **38**: 241-247.
30. Cooke HJ, Fantes J, Greene D. (1983). Structure and evolution of human Y chromosome DNA. *Differentiation* **23**: S48-S55.
31. Cooper C, Crolla JA, Laister C, Johnston DI, Cooke P. (1991). An investigation of ring and dicentric chromosomes found in three Turner's syndrome patients using DNA analysis and in situ hybridisation with X and Y chromosome specific probes. *J Med Genet* **28**: 6-9.
32. Crolla JA, Llerena JC. (1988). A mosaic 45,X/46,X,r(?) karyotype investigated with X and Y centromere-specific probes using a non-autoradiographic in-situ hybridisation technique. *Hum Genet* **81**: 81-84.
33. Cuevas-Covarrubias SA, Kofman-Alfaro SH. (1990). El cromosoma Y humano. *Rev Invest Clin* **42**: 290-297.
34. Davies K. (1991). The essence of inactivity. *Nature* **349**: 15-16.
35. De Arce MA, Costigan C, Gosden JR, Lawler M, Humphries P. (1992). Further evidence consistent with Yqh as an indicator of risk of gonadal blastoma in Y-bearing mosaic Turner syndrome. *Clin Genet* **41**: 28-32.
36. De la Chapelle A, Schoeder J. (1975). Reappraisal of a 46,X,i(Xq) karyotype as 46,X,del(Xq). *Hereditas* **80**: 137-140.
37. Dennis NR, Collins AL, Crolla JA, Cockwell AE, Fisher AM, Jacobs PA. (1993). Three patients with ring (X) chromosomes and a severe phenotype. *J Med Genet* **30**: 482-486.
38. Denny P, Swift S, Brand N, Dabhade N, Barton P, Ashworth A (1992). A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res* **20**: 2887.
39. Eicher EM, Wasburn LL. (1986). Genetic control of primary sex determination in mice. *Ann Rev Genet* **20**: 327-360.
40. Ellis NA, Goodfellow PN, Pym B, Smith M, Palmer M, et. al. (1989). The pseudoautosomal boundary in man is defined by an *Alu* repeat sequence inserted on the Y chromosome. *Nature* **337**: 81-84.
41. Erickson RP, Zwingman T, Asangla A. (1993). Gene expression, X-inactivation, and methylation during spermatogenesis: the cases of *Zfa*, *Zfx*, and *Zfy* in mice. *Mol Repr Dev* **35**: 114-120.
42. Escobar MLM, Zamora FA. (1992). Elaboración de un banco de DNA de pacientes con anomalías de la diferenciación sexual. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM.
43. Ferguson-Smith MA, Cooke A, Affara NA, Boyd E, Tolmie JL. (1990). Genotype-phenotype correlations in XX males and their bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet* **84**: 198-202.
44. Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. (1992). SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J* **11**: 4497-4506.
45. Fisher EMC, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Bentley L, Willard HF, Bieber FR, Page DC. (1990). Homologous ribosomal protein genes on the

- human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* **63**:1205-1218.
46. Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. (1959a). A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *Lancet* **1**: 711-713.
 47. Ford CE, Jones KW, Miller OJ, Mittwoch U, Peurose LS, Ridler M, Shapiro A. (1959b). The chromosomes in a patient showing both mongolism and the Klinefelter syndrome. *Lancet* **1**: 709-710.
 48. Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves JAM. (1992). Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature* **359**: 531-533.
 49. Foster JW, Marshall GJA. (1994). An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: Implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1927-1931.
 50. Fraccaro M, Maraschio P, Pasquali F, Scappaticci S. (1977). Women heterozygous for deficiency of the (p21-pter) region of the X chromosome are fertile. *Hum Genet* **39**:283-292.
 51. Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. (1992). Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* **258**: 1784-1787.
 52. Frommer M, Prosser J, Vincent PC. (1984). Human satellite I sequences include a male specific 2.47 kb tandemly repeated unit containing one *Alu* family member per repeat. *Nucleic Acids Res* **12**: 2887-2900.
 53. Gaff C, du Start D, Kalitsis P, Iannello, R, Nagy A, Choo KHA. (1994). A novel nuclear protein binds centromeric alpha satellite DNA. *Hum Mol Genet* **3** No5: 711-716.
 54. Gartler SM, Liskay RM, Gant N. (1973). Two functional X-chromosomes in human fetal oocytes. *Exp Cell Res* **82**: 464-466.
 55. Gemmill RM, Pearce-Birge L, Bixenman H, Hecht BK, Allanson JE. (1987). Y chromosome-specific DNA sequences in Turner-syndrome mosaicism. *Am J Hum Genet* **41**: 157-167.
 56. Genest, P.(1973). Transmission héréditaire, depuis 300 ans, d'un chromosome Y à satellites dans une lignée familiale. *Ann. Génét* **16**: 35-38.
 57. George FW.(1992). Sexual differentiation. En: "Textbook of endocrine physiology". Griffin MD y Ojeda SR (eds). 2nd Ed. Oxford University Press. USA. pp: 117-132.
 58. Goodfellow PN, Lovell-Badge R. (1993). SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* **27**: 71-92.
 59. Grumbach MM, Conte FA.(1992). Disorders of sex differentiation. En: "Williams Textbook of Endocrinology". Jean D. Wilson y Daniel W Foster (eds). 8th Ed.W.B. Saunders Co.Philadelphia. pp 853-951.
 60. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, et. al. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**: 245-250.

61. Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1992). Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7953-7957.
62. Guellaen G, Casanova M, Bishop C, Geldwerth D, Audre G, Fellous M, Weissenbach J (1984). Human XX males with Y single copy DNA fragments. *Nature* **307**: 172-173.
63. Gustafson ML, Donahoe PK. (1994). Male sex determination: current concepts of male sexual differentiation. *Annu Rev Med* **45**: 505-524.
64. Hall J, Gilchrist D. (1990). Turner syndrome and its variants. *Pediatric Clinics of North America* **37**: 1421-1440.
65. Hall JG, Sybert VP, Williamson RA, Fisher NL, Reed SD. (1982). Turner's syndrome. *West J Med* **137**: 32-44.
66. Haqq CM, King CY, Donahoe PK, Weiss MA. (1993). SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1097-1101.
67. Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1992). DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* **255**: 453-456.
68. Hassold T, Benham F, Leppert M. (1988). Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am J Hum Genet* **42**: 534-541.
69. Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow PN. (1992a). Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet* **88**: 471-474.
70. Hawkins JR. (1993). The SRY gene. *Trends Endocrinol Metab* **4**: 328-332.
71. Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD. (1992b). Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet* **51**: 979-984.
72. Held KR, Keber S, Kaminsky E, Singh S, Goetz P, Seemanova E, et. al. (1992). Mosaicism in 45, X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet* **88**: 288-294.
73. Hook EB, Warburton D. (1983). The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: live birth prevalence and evidence of diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet* **64**: 24-27.
74. Hogan B. (1993). Inhibiting inhibin. *Current Biology* **3**:170-172.
75. Hunt PA, Le Marie R. (1992). Sex-chromosome pairing: evidence that the behavior of the pseudoautosomal region differs during male and female meiosis. *Am J Hum Genet* **50**: 1162-1170.
76. Jablonka E, Lamb MJ. (1988). Meiotic pairing constraints and the activity of sex chromosomes. *J Theor Biol* **133**: 23-36.
77. Jacobs PA, Shrong JA. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* **183**: 302-303.
78. Jäger RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. (1990). A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* **348**: 452-454.
79. Jäger RJ, Pfeiffer RA, Scherer G. (1992a). A familial amino acid substitution in SRY can lead to conditional XY inversion. *Am J Hum Genet (Suppl)* **49**: 219

80. Jäger RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G. (1992b). A familial mutation in the testis-determining gene SRY. *Hum Genet* 90: 350-355.
81. Jantzen HM, Admon A, Bell PB, Tjian R. (1990). Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 334: 830-836.
82. Jeffreys AJ, Wilson V; Thein SL (1985) Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.
83. Johnson VP, McDonough PG, Cheung SW, Sun L. (1991). Sex chromosome marker: Clinical significance and DNA characterization. *Am J Hum Genet* 39: 97-101.
84. Jones KW, Singh L. (1981). Conserved repeated DNA sequences in vertebrate sex chromosomes. *Hum Genet* 58: 46-53.
85. Jost A. (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 8: 379-418.
86. Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP. (1973). Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* 29: 1-41.
87. Just W, Geerkens C, Held K, Vogel W. (1992). Expression of RPS4X in fibroblasts from patients with structural aberrations of the X-chromosome. *Hum Genet* 89: 240-242.
88. Kelly TE, Ferguson JE, Golden W. (1992). Survival of fetuses with 45,X: an instructive case and an hypothesis. *J Med Genet* 42: 825-826.
89. Kiel-Metzger K, Warren G, Wilson GN, Erickson RP. (1985). Evidence that the human Y chromosome does not contain clustered DNA sequences (Bkm) associated with heterogametic sex determination in other vertebrates. *N Engl J Med* 313: 242-245.
90. Koenen M.(1989).Recovery of DNA from agarose gels using liquid nitrogen.*TIG* 5: 137.
91. Kofman-Alfaro S, Pérez- Palacios G, Medina M, Escobar N, García M, Ruz L, Mutchinick O, Lisker R. (1981). Clinical and endocrine spectrum in patients with the 45,X/46,XY karyotype. *Hum Genet* 58: 373-376.
92. Kofman-Alfaro S, Mutchinick O, Valdés E, Pérez-Palacios G. (1984). Diferenciación sexual II. Anomalías de los cromosomas sexuales y alteraciones de la diferenciación gonadal. *Rev Inv Clin* 44: 229-234.
93. Koopman P, Gubbay J, Collignon J, Lovell-Badge R. (1989). Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* 342: 940-942.
94. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348: 450-452.
95. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 351: 117-121.
96. Kvaloy K, Galvagni F, Brown WRA (1994). The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum Mol Genet* 3: 771-778.

97. Lau Y-FC, Chan K. (1989). The putative testis-determining factor and related genes are expressed as discrete-sized transcripts in adult gonadal and somatic tissues. *Am J Hum Genet* **45**: 942-952.
98. Legouis R, Hardelin J-P, Levilliers J, Claverie J-M, Compain S, Wunderle V, Millasseau P, Le Paslier D, Cohen D, Ceterina D, Bougueleret L, Delemarre-Van de Waal H, Lutfalla G, Weissenbach J, Petit C. (1991). The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* **67**: 423-435.
99. Lindgren V, Chen C, Bryke CR, Lichter P, Page DC, Yang-Feng TL. (1992). Cytogenetic and molecular characterization of marker chromosomes in patients with mosaic 45,X karyotypes. *Hum Genet* **88**: 393-398.
100. López-López M, Torres Maldonado LC, Méndez JP, Cervantes Peredo A, Canto Cetina P, Pérez-Palacios G, Kofman-Alfaro S. (1993). Detección molecular de secuencias de ADN derivadas del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner. *Rev Inv Clín* **45**: 233-239.
101. Lukusa T, Fryns JP, van der Berghe H. (1986). Gonadoblastoma and Y chromosome fluorescence. *Clin Genet* **29**: 311-316.
102. Lyon MF (1992). Some milestones in the history of X-chromosome inactivation. *Annu Rev Genet* **26**: 17-28.
103. Lyon MF (1994). X-chromosome inactivation. En: "Molecular genetics of sex determination". SS Wachtel (ed). Academic Press, Inc. USA. pp:123-142.
104. Ma K, Sharkey A, Kirsch S, Vogt P, Keil R, Hargreave TB, McBeath S, Chandley A. (1992). Towards the molecular localisation of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 intervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Gen* **1**: 29-33.
105. Ma K, Inglis JD, Shrkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K, Wolfe J, Cooke HJ, Hargreave TB, Chandley AC. (1993). A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* **75**: 1287-1295.
106. Mattei MG, Mattei JF, Vidal I, Giraud F.(1981). Structural anomalies of the X chromosome and inactivation center. *Hum Genet* **56**: 401-408.
107. McBurney MW. (1993). X chromosome inactivation: the feminine mystique continues. *BioEssays* **15**: 825-826.
108. McElreavey K, Vilain E, Abbas NA, Costa JM, Souleyreau N, Kucheria K, Boucekkine C, Thibaud E, Brauner R, Flamant F, Fellous M. (1992). XY sex reversal associated with the deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11016-11020.
109. McElreavy K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M.(1993a).A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3368-3372.
110. McElreavy K, Vilain E, Boucekkine C, Vidaud M, Jaubert F, Richaud F, Fellous M. (1993b). XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. *Genomics* **13**: 838-840.
111. McLaren A. (1988). Sex determination in mammals. *TIG* **4**:63-72.

112. McLaren A. (1991). Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *Bioessays* **13**: 151-156.
113. McLaren A, Simpson E, Tomonari K, Chandler P, Hogg H. (1984). Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* **312**: 552-555.
114. Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mutchinick O, Fernández del Castillo C, Reyes E, Pérez-Palacios G. (1993). Mixed gonadal dysgenesis: clinical, cytogenetic, endocrinological, and histopathological findings in 16 patients. *Am J Med Genet* **46**: 263-267.
115. Merchant-Larios H. (1984). Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: "Ultrastructure of reproduction". Van Blerkom J and Motta PM (eds). Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands. pp 19-30.
116. Miranda A. (1994). Estudio clínico citogenético de pacientes con alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X. Tesis de posgrado. Facultad de Medicina, UNAM. México.
117. Moore CCD, Grumbach MM. (1992). Sex determination and gonadogenesis: a transcription cascade of sex chromosomes and autosome genes. *Sem Perinatol* **16**: 266-278.
118. Müller U, Kirkels VGHJ, Schleres JMJ. (1992a). Absence of Turner stigmata in a 46,XYp- female. *Hum Genet* **90**:239-242.
119. Müller J, Schwartz M, Skakkebaek NE. (1992b). Analysis of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in sex reversed patients: point-mutation in SRY causing sex reversion in a 46,XY female. *J Clin Endocrinol Metab* **75**: 331-33.
120. Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, Nakagome Y. (1986). A human Y chromosome-specific DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res* **14**: 7569-7580.
121. Ogata T, Hawkins JR, Taylor A, Matsuo N, Hata J, Goodfellow PN. (1992a) Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype: support for the existence of a gene (s), located in distal Xp, involved in testis formation. *J Med Genet* **29**: 226-230.
122. Ogata T, Goodfellow P, Petit C, Aya M, Matsuo N. (1992b). Short stature in a girl with a terminal Xp deletion distal to DXYS15: localisation of a growth gene(s) in the pseudoautosomal region. *J Med Genet* **29**: 455-459.
123. Ogata T, Matsuo N.(1992c).Comparison of adult height between patients with XX and XY gonadal dysgenesis: support for a Y specific growth gene(s). *J Med Genet* **29**: 539-541.
124. Ogata T, Tyler-Smith C, Purvis-Smith S, Turner G. (1993). Chromosomal localisation of a gene (s) for Turner stigmata on Yp. *J Med Genet* **30**: 918-922.
125. Ohno S. (1967). "Sex chromosomes and sex-linked genes". Springer-Verlag. Berlin. p:192.
126. Olsen MM, Caldamone AA, Jackson CL. (1988). Gonadoblastoma in infancy: indications for early gonadectomy in 46,XY gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg* **23**: 270-271.
127. Page DC. (1987). Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development (Suppl)* **101**: 151-155.

128. Page DC, Mosher E, Simpson E, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown L. (1987a). The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091-1104.
129. Page DC, Bieker K, Brown LG, Hinton S, Leppert M, Lalouel JM, Lathrop M, Nyström-Lahti M, Chapelle A de la, White R. (1987b) Linkage, physical mapping and DNA sequence analysis of pseudoautosomal loci on the human X and Y chromosomes. *Genomics* 1: 243-256.
130. Page DC, Fisher EMC, McGillivray B, Brown LG. (1990). Additional deletion in sex determining region of human Y chromosome resolves paradox of X,(Y;22) female. *Nature* 346: 279-281.
131. Painter TS.(1923).Mammalian spermatogenesis. *J Exp Zool* 137: 291-335.
132. Palmer CG, Reichman A. (1976). Chromosomal and clinical findings in 110 females with Turner syndrome. *Hum Genet* 35: 35-49.
133. Palmer M, Sinclair A, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, et. al. (1989). Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342: 937-939.
134. Pao CC, Kao SM, Hor JJ, Chang SY. (1993). Lack of mutational alteration in the conserved regions of ZFY and SRY genes of 46,XX females with gonadal dysgenesis. *Hum Reprod* 8: 224-228.
135. Park E, Bailey JD, Cowell CA. (1983). Growth and maturation of patients with Turner's syndrome. *Pediatr Res* 17: 1-7.
136. Pereira ET, Cabral de Almeida JC, Guhna ACYRG, Patton M, Taylor R, Jeffrey S.(1991). Use of probes for ZFY, SRY and the Y pseudoautosomal boundary in XX males, XX true hermaphrodites and an XY female. *J Med Genet* 28: 591-595.
137. Picard JY, Josso, N. (1984). Purification of testicular anti-Mullerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Endocrinol* 34: 23-29.
138. Pivnick EK, Wachtel S, Woods D. (1992). Mutations in the conserved domain of SRY are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet* 90: 308- 310.
139. Polani PE, Hunter WF, Lennox B. (1954). Chromosomal sex in Turner's syndrome with coarctation of the aorta. *Lancet* 2: 120
140. Ramsay M, Bernstein R, Zwane E, Page DC. (1988). XX true hermaphroditism in Southern African blacks: an enigma of primary sex differentiation. *Am J Hum Genet* 42: 4-13.
141. Rappold GA. (1993). The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 92: 315-324.
142. Rastan S. (1994). X chromosome inactivation and the *XIST* gene. *Curr Op Genet Dev* 4: 292-297.
143. Rastan S, Brown SDM. (1990). The search for the mouse X-chromosome inactivation centre. *Genet Res Camb* 56: 99-106.
144. Robboy SJ, Miller T, Donahoe PK, Jahre C, Welch WR, Haseltine FP, Miller WA, Atkins L, Crawford JD. (1982). Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis: perspective derived from a clinicopathologic analysis of twenty-one cases. *Hum Pathol* 13: 700-716.
145. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". 2nd edition .Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY.

146. Schneider-Gädicke A, Beer-Romero P, Brown LG, Nussbaum R, Page DC. (1989). ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* **57**: 1247-1258.
147. Scully RE. (1970). Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* **25**: 1340-1355.
148. Sinclair AH, Foster JW, Spencer JA, Page DC, Palmer M, Goodfellow PN, Graves JAM. (1988). Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature* **336**: 780-783.
149. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**: 240-244.
150. Sohval AR. (1964). Hermaphroditism with atypical or "mixed" gonadal dysgenesis. Relationship to gonadal neoplasm. *Amer J Med* **36**: 281-292.
151. Solari A. (1974). The behaviour of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol* **38**: 273-317.
152. Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
153. Spencer JA, Sinclair AH, Watson JM, Graves JAM. (1991). Genes on the short arm of the human Y chromosome are not shared with the marsupial X. *Genomics*. **11**:339-345.
154. Stalvey JRD, Erickson RP, Dasouki M, Glover T, Shokir M. (1988). Clarification of chromosomal abnormalities associated with sexual ambiguity by studies with Y-chromosomal DNA sequences. *Cytogenet Cell Genet* **47**: 140-143.
155. Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow PN. (1993). SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum Mol Genet* **2**: 2013-2018.
156. Su H, Lau YC. (1993). Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet* **52**: 24-38.
157. Swyer GIM. (1955). Male pseudohermaphroditism: a hitherto undescribed form. *Br Med J* **2**: 709-712.
158. Tiepolo L, Zuffardi O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome. *Hum Genet* **34**: 119-121.
159. Therman E, Susman M. (1993). "Human chromosomes. Structure, behavior and effects". Springer-Verlag New York Inc. USA. p 376.
160. Therman E, Laxova R, Susman B. (1990). The critical region on the human Xq. *Hum Genet* **85**: 455-461.
161. Turner HH. (1938). A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology* **23**: 566-574.
162. Ulrich P. (1949). Turners syndrome and status Bonnevie-Ulrich. *Am J Hum Genet* **I**: 179-202.
163. Van Dyke DL, Wiktor A, Palmer CG. (1992). Ullrich-Turner syndrome with a small ring X chromosome and presence of mental retardation. *Am J Med Genet* **43**: 996-1005.

164. Verga V, Erickson RP. (1989). An extended long-range restriction map of the human sex-determining region on Xp, including ZFY, finds marked homology and no detectable Y sequences in an XX male. *Am J Hum Genet* **44**: 756-765.
165. Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, de la Chapelle A, Weissenbach J.(1986). A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* **38**: 109-124.
166. Verp MS, Simpson JL. (1987). Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* **25**:191-218.
167. Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N.(1984). Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* (Baltimore) **114**: 1315-1320.
168. Vilain E, McElreavey K, Jaubert F, Raymond JP, Richaud F, Fellous M. (1992a). Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. *Am J Hum Genet* **50**: 1008-1011.
169. Vilain E, Fellous M, McElreavey. (1992b). Characterization and sequence of the 5' flanking region of the human testis-determining factor SRY. *Meth Mol Cell Biol* **3**: 128-134.
170. Vilain E, Jaubert F, Fellous M, McElreavey K. (1993). Pathology of 46,XY pure gonadal dysgenesis: absence of testis differentiation associated with mutations in the testis-determining factor. *Differentiation* **52**: 151-159.
171. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC. (1992). The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* **258**: 52-59.
172. Wachtel SS, Ohno S, Koo GC, Boyse EA. (1975). Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* **257**: 235-236.
173. Walker CL, Cargile CB, Foy KM, Delannoy M, Migeon RB. (1991). The Barr body is a looped X chromosome formed by telomere association. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6191-6195.
174. Welshons WJ, Russell LB (1959). The Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **45**: 560-566.
175. Willard HF. (1992). Centromeres-primary constrictions are primarily complicated. *Hum Mol Genet* **1**: 667-668.
176. Witt N, Erickson RP. (1989). A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by polymerase chain reaction. *Hum Genet* **82**: 271-274.
177. Witt N, Erickson RP. (1991). A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by polymerase chain reaction (*erratum*). *Hum Genet* **86**: 540.
173. Wolfe J, Darling SM, Erickson RP, Craig J, Buckle V, et. al. (1985). Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y-chromosome. *J Mol Biol* **182**: 477-485.
179. Yen PH, Marsh B, Allen E, Tsai SP, Ellison J, Connolly L, Neiswanger K, Shapiro LJ. (1988). The human X-linked steroid sulfatase gene and Y-encode pseudogene: evidence for an inversion of the Y-chromosome during primate evolution. *Cell* **55**: 1123-1135.

180. Yen PH, Ellison J, Salido EC, Mohandas T, Shapiro L. (1992). Isolation of a new gene from the distal short arm of the human X chromosome that escapes X-inactivation. *Hum Mol Genet* **1**: 47-52.
181. Zeng Y, Ren Z, Zhang M, Huang Y, Zeng F, Huang S. (1993). A new de novo mutation (A113T) in HMG box of the SRY gene leads to XY gonadal dysgenesis. *J Med Genet* **30**: 655-657.
182. Zinn AR, Page DC, Fisher EMC. (1993). Turner syndrome, the case of the missing sex chromosome. *TIG* **9**: 90-93.
183. Zwingmann T, Erickson RP, Boyer T, Ao A.(1993).Transcription of the sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo.*Proc Natl Acad Sci USA* **90**:814-817.

Detección molecular de secuencias de ADN derivadas del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner

^{ab}Marisol López López

^aLeda Carolina Torres Maldonado

^cJuan Pablo Méndez

^aAlicia Cervantes Peredo

^cPatricia Canto Cetina

^cGregorio Pérez-Palacios

^aSusana Kofman-Alfaro

Resumen

La presencia de material genético derivado del cromosoma Y en el genoma de individuos fenotípicamente femeninos ha sido asociada con un elevado riesgo de desarrollar neoplasias gonadales. Para investigar la existencia de secuencias de ADN del cromosoma Y en el genoma de pacientes con disgenesia gonadal y características clínicas de síndrome de Turner, se estudiaron tres pacientes con un complemento cromosómico 45, X/46, X, + mar, una paciente con cariotipo 45, X/46, XY, y otra 45,X. Las dos últimas sirvieron como controles positivo y negativo, respectivamente. El análisis molecular de secuencias derivadas de Y se realizó mediante hibridación ADN-ADN con las sondas específicas pY97 y pDP1007, así como por la reacción en cadena de la polimerasa.

Los resultados revelan que el cromosoma en anillo de una de las pacientes mostraba secuencias de ADN correspondientes a la región centromérica del cromosoma Y, de manera similar a la paciente control 45, X/46, XY y al control masculino; en esta paciente no se detectó el gen ZFY, que probablemente se perdió al formarse el anillo. En contraste, los cromosomas marcadores de las otras dos pacientes no presentaban material derivado del cromosoma Y. Los resultados demuestran que en

una paciente el marcador se originó a partir del cromosoma Y mientras que en los otros dos casos era probablemente derivado del X. Estos datos enfatizan la necesidad de realizar estudios moleculares en este tipo de enfermedades para desarrollar estrategias terapéuticas adecuadas.

Palabras clave: *Síndrome de Turner, Disgenesia gonadal, Cromosoma marcador, Cromosoma Y, Análisis de ADN.*

Abstract

Molecular detection of Y-DNA sequences in patients with Turner's syndrome.

The presence of Y-chromosome material in the genome of phenotypic females has been associated with an increased risk of developing gonadal tumors. To assess whether DNA sequences of the Y-chromosome are present in the genome of individuals with gonadal dysgenesis and clinical features of Turner's syndrome, we have studied three patients with 45, X/46, X, + mar chromosome complement, and two Turner patients with 45, X/46, XY and 45, X karyotypes who served as positive and negative controls, respectively. Molecular detection of Y-DNA sequences was done by DNA-DNA hybridization using the specific probes pY97 and

^a Servicio de Genética, Hospital General de México, SS. Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F.

^b Departamento de Sistemas Biológicos, División Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-X, México, D.F.

^c Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.

Responsable y sobretiros: Susana Kofman-Alfaro, Servicio de Genética, Hospital General de México, SS. Facultad de Medicina, UNAM, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, 06720. México, D.F.

Recibido el 22 de enero de 1993. Aceptado para publicación el 6 de abril de 1993.

pDP1007 as well as by polimerase chain reaction. The results revealed that the marker chromosome of one of the patients contained DNA sequences from the centromeric region of the Y-chromosome in a manner similar to that found in the 45, X/46, XY patient and in the male control; the gene ZFY was negative in this patient, and was probably lost when the ring chromosome was formed. In contrast, the ring chromosomes of the other two patients did not exhibit the presence of Y-chromosome material. The results were interpreted as demonstrating the Y-chromosome origin of the ring marker in one patient with gonadal dysgenesis, and suggest an X-chromosome origin of the ring markers in the other two patients. These data further underline the relevance of practicing molecular studies in these disorders which may help to determine appropriate therapeutic strategies.

Key words: *Turner syndrome, Gonadal dysgenesis, Marker chromosome, Y chromosome, DNA analysis.*

Introducción

El síndrome de Turner se caracteriza por corta estatura, defectos somáticos y disgenesia gonadal. En 1959, Ford y cols.¹ demostraron que estas pacientes presentaban un cariotipo 45, X; sin embargo estudios subsecuentes indicaron que sólo 40 a 60% de las pacientes con síndrome de Turner son monosómicas para el cromosoma X. El resto de los casos presenta dos cromosomas sexuales, uno de los cuales es anormal o bien un mosaico 45, X y una segunda línea celular con un cromosoma X o Y de características normales o anormales.^{2,3} En efecto, los resultados de un estudio reciente indican claramente que la mayoría de los casos corresponde a diferentes mosaicos cromosómicos para el X y el Y (66.7%). Es interesante el hallazgo de que un número importante de estas pacientes con mosaicos cromosómicos (18.4%) presentan un cromosoma marcador.⁴

Las pacientes con síndrome de Turner y mosaico con cromosoma Y o con un marcador derivado del Y constituyen un sub-grupo clínicamente importante ya que presentan un riesgo 15 a 20% mayor que la población general de desarrollar gonadoblastoma o disgerminoma.⁵ Estas observaciones resaltan la importancia de caracterizar inequívocamente el origen (X o Y) del cromosoma marcador en el síndrome de Turner, lo cual en ocasiones es difícil

realizar utilizando sólo las técnicas citogenéticas convencionales.⁶ La disponibilidad de sondas para el cromosoma Y, y de oligonucleóticos específicos para regiones centroméricas de los cromosomas sexuales, ha hecho posible la identificación de secuencias características del X y el Y en el genoma de pacientes con anomalías de los cromosomas sexuales.⁷⁻¹⁰

Con el objetivo de identificar la presencia de secuencias específicas del cromosoma Y en el genoma de pacientes con síndrome de Turner, estudiamos cinco individuos con diferente constitución cromosómica: tres con cariotipo 45, X/46, X, + mar, una con un mosaico 45, X/46, XY, y la última con 45, X. Estas 2 últimas sirvieron como controles positivo y negativo, respectivamente. Se utilizó una combinación de técnicas citogenéticas convencionales, análisis por hibridación ADN-ADN con dos sondas específicas del Y y reacción en cadena de la polimerasa para los cromosomas X y Y.

Material y métodos

PACIENTES

Se estudiaron cinco pacientes con fenotipo de Turner no relacionadas entre sí. En ningún caso había antecedentes familiares del padecimiento. El motivo de la consulta y los datos clínicos se muestran en la tabla 1.

ESTUDIOS CITOGENETICOS

Se realizó cariotipo en linfocitos de sangre periférica en las cinco pacientes, utilizando técnicas estándar y bandas GTG y CBG.

Para el estudio citogenético se analizaron 100 células de cada caso con técnica estándar y 20 con bandas GTG y CBG.

ESTUDIOS MOLECULARES

Aislamiento de ADN e hibridación ADN-ADN. El ADN genómico de las pacientes y de los controles femeninos y masculinos normales fue obtenido de sangre periférica mediante técnicas estándar.¹¹ En todos los casos se digirieron 10 µg de ADN genómico con Eco RI, bajo las condiciones recomendadas por Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa

Tabla 1. Características clínicas de las cinco pacientes con síndrome de Turner.

Paciente	Edad (años)	Talla (m)	Motivo de consulta	Estigmas de Turner*
T1	20	1.42	Amenorrea primaria	PC, CV, NP, IC, PS.
T2	9	1.13	Obesidad	PC, IC, PA, CV, CB, NP.
T3	26	1.34	Amenorrea primaria	PC, PS, CV, MC, NP.
T4	26	1.31	Amenorrea primaria	PC, IC, DU, CV.
T5	19	1.30	Amenorrea primaria	PC, IC, PA, CV, MC.

* Abreviaturas: PC pterigium colli; CV cubitus valgus; NP nevos pigmentados; IC implantación baja del cabello; PS pezones separados; PA pabellones auriculares mal conformados; CB clinodactilia bilateral del 5o. dedo; MC 4o. metacarpiano y metatarsiano cortos; DU displasia ungueal.

0.8%. El ADN fue desnaturalizado *in situ* y transferido a una membrana de nitrocelulosa reforzada con nylon (Duralose UV, Stratagene, La Jolla CA) de acuerdo al procedimiento descrito por Southern.¹² La prehibridación y la hibridación se realizaron por técnicas estándar;¹¹ el marcaje de las sondas moleculares se realizó por hexanucleótidos al azar bajo las condiciones indicadas por el fabricante (Amersham, Aylesbury, England). El rigor final de lavado fue 0.2X SSC/0.1% SDS/50°C. Los filtros se expusieron a película X-OMAT K (Kodak, Guadalajara, Jalisco) con pantalla intensificadora durante cinco días a -70°C.

Sondas moleculares. Se utilizaron las sondas de ADN pY97 y pDP1007. La primera corresponde a una familia de secuencias alfoides repetidas de la región centromérica del cromosoma Y humano. Contiene un fragmento genómico de 5.3 kb en el sitio Eco RI de pUC13 y detecta por hibridación ADN-ADN una banda de 5.5 kb.⁷ La sonda pDP1007 contiene un fragmento genómico de 1.3 kb derivado del cromosoma Y humano insertado en el sitio Hind III de pUC13 y detecta por hibridación ADN-ADN una banda de 3.5 kb en Yp11.3 que corresponde al gen ZFY.⁸ Esta sonda hibrida en forma cruzada con el gen homólogo ZFX en Xp21.3 observándose una banda de 1.8 kb.¹³ Las sondas fueron proporcionadas por el Dr. R.P. Erickson de la Universidad de Arizona.

Reacción en cadena de la polimerasa. Los oligonucleótidos y las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron descritos por Witt y Erickson.⁹ El par Y1, Y2 flanquea un

fragmento de 170 pb de secuencias alfoides repetidas de la región centromérica del cromosoma Y humano. Y1: 5'-ATGATAGAAACGGAAATATG-3'; Y2: 5'-AGTAGAATGCAAAGGGCTCC-3'.

El par X1, X2 flanquea un fragmento de 130 pb de secuencias alfoides repetidas de la región centromérica del cromosoma X humano. X1: 5'-AATCATCAAATGGAGATTTG-3'; X2: 5'-GTCAGCTCTGTGAGTGAAA-3'.

La amplificación se realizó a partir de 1 µg de ADN genómico en todos los casos. Los oligonucleótidos y los reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa fueron adquiridos a Bio-Synthesis, Inc, Denton, TX. El programa de amplificación fue realizado en equipo Techne PHC-1 mediante 30 ciclos (94°/1 min; 55°/1 min; 72°/1 min) y un ciclo de extensión a 72°C durante 10 min. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio 0.0002%.

Resultados

En las pacientes 1, 2 y 3 se reconoció la presencia de un mosaico con dos líneas celulares, una monosómica para el cromosoma X (45,X) y la segunda con un cromosoma marcador (46, X, + mar). La frecuencia de cada línea celular se observa en la tabla 2. El cromosoma anormal era un anillo pequeño en las pacientes 1 y 2, y de tamaño intermedio en la paciente 3 (figura 1). Todos los marcadores presentaban la región centromérica teñida cuando se utilizaron bandas CBG, y sólo se observó la presencia de una pequeña región

Tabla 2. Hallazgos citogenéticos en las cinco pacientes con síndrome de Turner.

Paciente	Cariotipo inicial (% líneas mosaico)	Cariotipo definitivo
T1	45, X/46, X, + mar (10/90)	45, X/46, Xr (Y) (p11.2 q12.1)
T2	45, X/46, X, + mar (84/16)	45, X/46, Xr (X) (p11.3 q21.3)
T3	45, X/46, X, + mar (88/12)	45, X/46, Xr (X) (p11.4 q22.2)
T4	45, X/46, XY (60/40)	45, X/46, XY
T5	45, X (100)	45, X

heterocromática en el cromosoma marcador de la paciente 1. Sin embargo, las técnicas citogenéticas no permitieron identificar con certeza el origen de los marcadores.

La paciente 4 presentaba un mosaico 45, X/46, XY; la proporción de cada línea celular se muestra en la tabla 2. El cromosoma Y tenía características morfológicas y bandas CBG normales (figura 1).

El estudio citogenético de la paciente 5 reveló un cariotipo 45, X en todas las células analizadas (figura 1).

La hibridación ADN-ADN de acuerdo al método descrito por Southern, utilizando la sonda centromérica pY97, reveló la presencia de esta región en las pacientes 1, 4 y en el control masculino (figura 2).

La hibridación con la sonda pDP1007 demostró la banda correspondiente a ZFY sólo en la paciente 4 y en el control masculino. La banda correspondiente al gen ZFX estuvo presente en todos los casos (figura 3).

La electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados mediante PCR en el ADN genómico de las pacientes y los controles normales se observa en las figuras 4 y 5. En todos los casos se observó la banda de 130 pb característica de la región centromérica del cromosoma X (figura 4). Las pacientes 1 y 4 así como el control masculino mostraron un fragmento de ADN de 170 pb correspondiente a la región centromérica del cromosoma Y (figura 5).

Discusión

La identificación del origen de cromosomas marcadores, de una línea celular con cromosoma Y, o de secuencias derivadas de éste en el genoma de

pacientes con disgenesia gonadal es de valor diagnóstico debido a que presentan un riesgo elevado de desarrollar neoplasias gonadales.^{5,14} Las diferentes técnicas citogenéticas son útiles para distinguir marcadores provenientes del X o del Y.¹⁵ Sin embargo, éstas no siempre resuelven el problema, especialmente en el caso de anillos

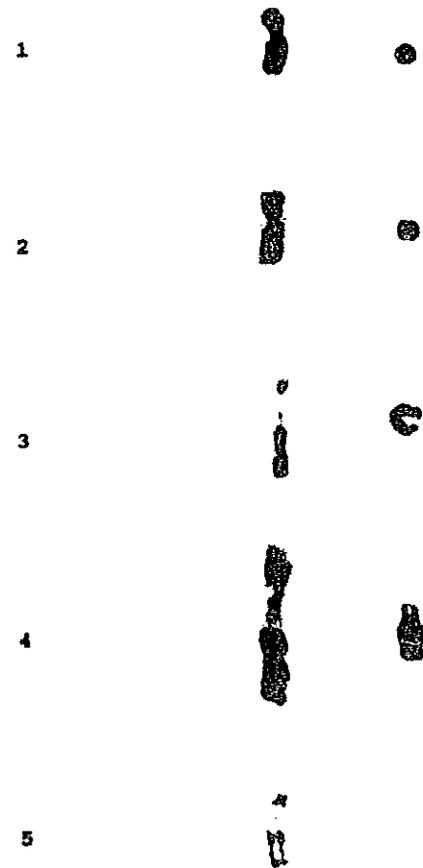


Figura 1. Cariotipos parciales de las cinco pacientes con síndrome de Turner.

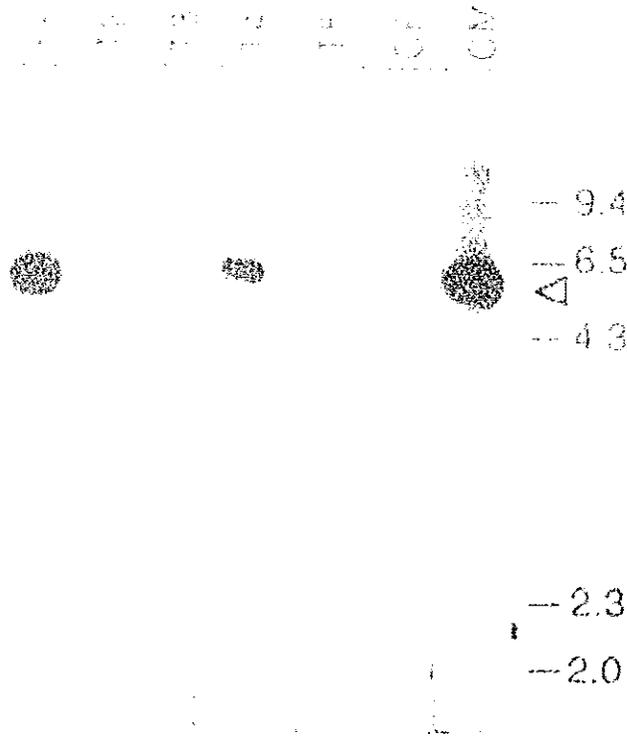


Figura 2. Hibridación ADN-ADN utilizando la sonda pY97. T1-T5: pacientes con síndrome de Turner; CF: control femenino; CM: control masculino. Los números corresponden al peso molecular (kb) de fragmentos de ADN del fago λ digerido con Hind III: los carriles T1, T4 y CM muestran una banda de 5.5 kb (\blacktriangle) correspondiente a secuencias aloides centroméricas del cromosoma Y.

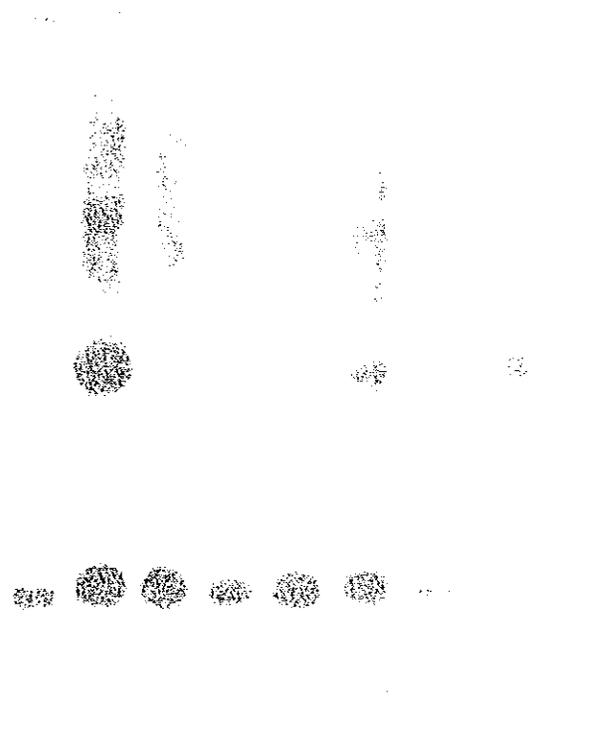


Figura 3. Hibridación ADN-ADN utilizando la sonda pDP1007. T1-T5: pacientes con síndrome de Turner; CF: control femenino; CM: control masculino. Los números corresponden al peso molecular (kb) de fragmentos de DNA del fago λ digerido con Hind III. Los carriles T4 y CM muestran una banda de 3.5 kb (\bullet) correspondiente al gen ZFY (Yp11.3); en todos los carriles se reconoce la banda de 1.8 kb (O) correspondiente a ZFX (Xp21.3).

pequeños donde el centrómero no puede observarse por razones topológicas. En cambio, el análisis molecular permite una caracterización definitiva.

En la paciente 1 (45, X/46, X, + mar) se observó, por técnicas citogenéticas, un marcador que presentaba una región heterocromática pequeña. Mediante la utilización de la sonda pY97 y oligonucleótidos específicos para la región centromérica del cromosoma Y, se confirmó que el marcador correspondía a un anillo derivado del Y. No se detectó la región correspondiente a ZFY (Yp 11.3) con la sonda pDP1007, por lo que podemos asumir que el punto de ruptura está por debajo de esta región. La disgenesia gonadal y el fenotipo de Turner en esta paciente pueden explicarse por la línea 45, X y por la pérdida de la región terminal de Yp donde se encuentran los genes SRY (sex determining region on Y chromosome) identificado como el factor determinante testicular¹⁶ y RPS4Y.¹⁷

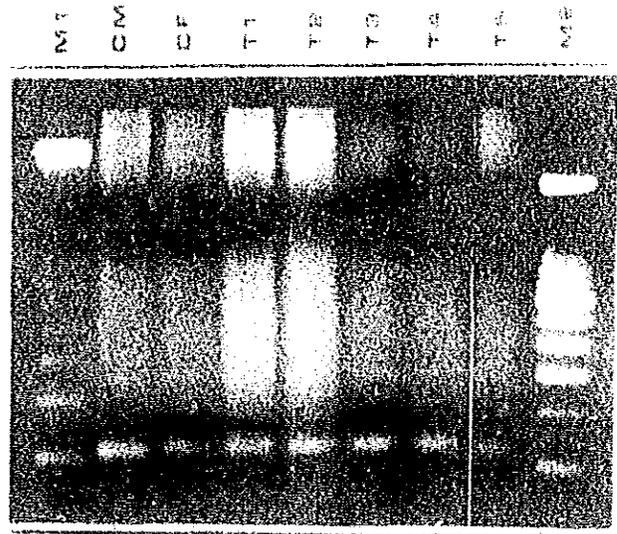


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa para región centromérica del X. M1: marcador de peso molecular (escalera de 123 pb); CF: control femenino; CM: control masculino; T1-T5: pacientes con síndrome de Turner; M2: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Todos los carriles muestran una banda de 130 pb (\blacktriangle) correspondiente a la región centromérica de X.

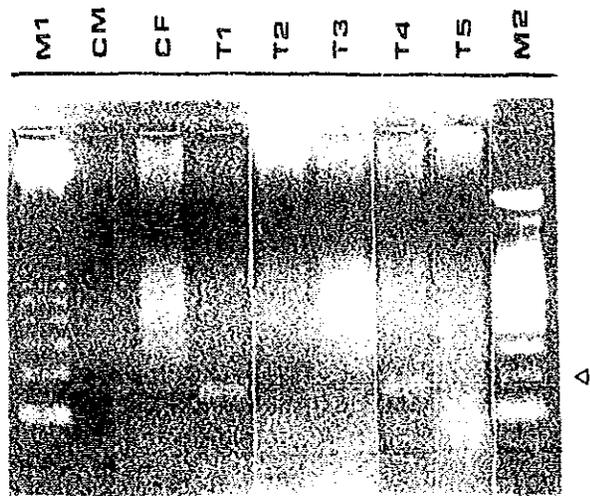


Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa para región centromérica del Y. M1: marcador de peso molecular (escala de 123 pb); CF: control femenino; CM: control masculino, T1-T5: pacientes con síndrome de Turner; M2: marcador de peso molecular (escala de 100 pb). Los carriles CM, T1 y T4 muestran una banda de 170 pb (\triangle) correspondiente a la región centromérica de Y.

Este último gen y su homólogo, RPS4X, codifican para isoformas de la proteína ribosómica S4. Se ha propuesto que la haploinsuficiencia de los genes RPS4 contribuye a la etiología del fenotipo de Turner.¹⁷ Llama la atención que la estatura de la paciente 1 (1.42 m) es más elevada que la habitualmente observada para este padecimiento en nuestra población (1.32 ± 0.06 m).¹⁸ Recientemente, se ha descrito un gen(es) responsable del crecimiento en la región pseudoautosómica distal de Yp.¹⁹ Es posible que este gen se haya perdido al formarse el anillo, pero probablemente se haya preservado la región que controla la estatura en Yq11.²⁰ Se ha postulado la existencia de un gen próximo o incluido en Yqh responsable de las neoplasias gonadales.^{14,21} Aún cuando no fue posible analizar el cariotipo paterno para identificar el tamaño de la región heterocromática del cromosoma Y, la presencia de esta región en la paciente 1 sugiere un alto riesgo de malignización gonadal. De acuerdo con los resultados obtenidos, la paciente fue sometida a gonadectomía bilateral, y substituída hormonalmente con una asociación de estrógenos y progestinas.

En las pacientes 2 y 3 con cariotipo 45, X/46, X, +mar, los estudios moleculares revelaron ausencia de secuencias centroméricas del cromosoma Y y de la

región ZFY. Podemos concluir que el marcador no se originó a partir del cromosoma Y sino probablemente del cromosoma X. El fenotipo de Turner en estas pacientes puede explicarse por la línea 45, X y por la posible inactivación del gen RPS4X en el cromosoma X anormal.¹⁷ En ausencia de material derivado del Y en el genoma de estas pacientes, el manejo clínico no incluyó la extirpación de las gónadas.

En la paciente 4 con cariotipo 45, X/46, XY se comprobó, por técnicas citogenéticas, la existencia de un cromosoma Y aparentemente normal. Las técnicas moleculares confirmaron la presencia de la región centromérica del cromosoma Y y del gen ZFY. De acuerdo a lo mencionado previamente, las estrías fibrosas de esta paciente poseen un alto riesgo de malignización por lo que se realizó gonadectomía bilateral.

El caso 5 con cariotipo 45,X no presentó cromosoma Y por métodos citogenéticos, o secuencias derivadas del Y por técnicas moleculares. Held y cols.⁴ han sugerido que muchas pacientes monosómicas para el X son en realidad mosaicos crípticos que provienen de un error mitótico en el cigoto temprano con pérdida gradual de la segunda línea celular *in vivo*.²² Este mosaicismo parecería ejercer un efecto protector que permite la sobrevivencia del feto por la presencia de algunos *loci* en un segundo cromosoma sexual, ya sea X o Y.^{4,22}

Los resultados obtenidos demuestran que la combinación de técnicas citogenéticas convencionales y el análisis por hibridación ADN-ADN y por PCR son de valor diagnóstico en todas las pacientes con fenotipo de Turner. En base a lo anterior, proponemos que en todas las pacientes con marcadores se realice análisis citogenético en varios tejidos así como estudios moleculares con el fin de detectar la presencia de un cromosoma Y o secuencias derivadas de éste.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración y apoyo técnico del Dr. Guillermo Alfaro Martínez y del M en IBB Gabriel Nava Pinto del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Este trabajo fue apoyado por el Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA).

Agradecemos al Dr. Robert P. Erickson de la Universidad de Arizona, las sondas moleculares utilizadas.

Referencias

1. Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. A sex chromosomal anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1959; 1:711-3.
2. Palmer CG, Reichmann A. Chromosomal and clinical findings in 110 females with Turner syndrome. *Hum Genet* 1976; 35:35-49.
3. Hall J, Gilchrist D. Turner syndrome and its variants. *Pediatr Clin N Amer* 1990; 37:1421-40.
4. Held KR, Keber S, Kaminsky E, Singh S, Goetz P, Seemanova E, et al. Mosaicism in 45, X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes?. *Hum Genet* 1992; 88:288-94.
5. Scully RE. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 1970; 25:1340-55.
6. Crolla JA, Llerena JC. A mosaic 45, X/46, X, r(?) karyotype investigated with X and Y centromere-specific probes using a non-autoradiographic in-situ hybridisation technique. *Hum Genet* 1988; 81:81-4.
7. Wolfe J, Darling SM, Erickson RP, Craig I, Buckle V, Rigby P, et al. Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome. *J Mol Biol* 1985; 182:477-85.
8. Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollak J, et al. The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 1987; 51:1091-104.
9. Witt M, Erickson RP. A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1989; 82:271-4.
10. Cooper C, Crolla JA, Laister C, Johnston DI, Cooke P. An investigation of ring and dicentric chromosomes found in three Turner's syndrome patients using DNA analysis and in situ hybridisation with X and Y chromosome specific probes. *J Med Genet* 1991; 28:6-9.
11. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98:503-17.
13. Schneider-Gadicke A, Beer-Romero P, Brown LG, Nusbaum R, Page DC. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 1989; 57:1247-58.
14. Page DC. Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development* 1987; 101(suppl):151-5.
15. Magenis E, Donlon T. Nonfluorescent Y chromosome: a cytologic evicence of origin. *Hum Genet* 1982; 60:133-8.
16. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature* 1990; 346:240-4.
17. Fisher EMC, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Lawrence JB, et al. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner's syndrome. *Cell* 1990; 63:1205-18.
18. Arenas S. *Correlación fenotipo-cariotipo en mujeres con alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X*. Tesis profesional. México: Facultad de Ciencias UNAM, 1989.
19. Ogata T, Petit C, Rappold G, Matsuo N, Matsumoto T, Goodfellow P. Chromosomal localization of a pseudoautosomal growth gene(s). *J Med Genet* 1992; 29:624-8.
20. Alvesalo K, de la Chapelle A. Tooth sizes in two males with deletions of the long arm of the Y chromosome. *Ann Hum Genet* 1981; 45:49-54.
21. De Arce M, Costigan C, Gosden JR, Lawler M, Humphries P. Further evidence consistent with Yqh as an indicator of risk of gonadal blastoma in Y-bearing mosaic Turner's syndrome. *Clin Genet* 1992; 41:28-32.
22. Hook EB, Warburton D. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: live birth prevalence and evidence of diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet* 1983; 64:24-7.