

0346 11  
leje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ESTUDIO GENETICO Y MOLECULAR  
EN HERMAFRODITAS VERDADEROS  
Y VARONES XX.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)

**P R E S E N T A .**

**LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO**

DIRECTORA DE TESIS:  
MED. CIR. SUSANA HELENA KOFMAN EPSTEIN

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## DEDICATORIAS

A mis padres: Gloria y Pedro, por su apoyo.

A mis hermanos: Iván, Ligia y Cynthia,  
por todo lo que son para mí.

A mis amigos: Aurora, Ricardo, Jorge Alberto,  
Blanca, Edgar, Jesús, Vero, Jorge, Víctor,  
Mónica, Renato, Fernando y Pedro, por estar  
siempre presentes.

A mis compañeros y amigos del IIB/INCan: Memo,  
Suitpy, Roxana, Emmy, Carlos, Raquel, Gabriel,  
Venancio, Dairo, Ema y Román,  
por todo lo compartido.

A todo el personal del Servicio de Genética  
del Hospital General de México.

A los QFB's 89-93: Euclides, Omar, Claudia,  
Lupita y Vero, por ser como son.

A la Memoria de Oswaldo y Guillermo.

## A G R A D E C I M I E N T O S

Este trabajo se realizó en el Servicio de Genética del Hospital General de México bajo la dirección de la Dra. Susana Kofman Epstein.

A los Dres. Juan Pablo Méndez y Patricia Canto del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición S.Z. por su colaboración en el estudio de los pacientes.

La metodología molecular fue asesorada por Dr. Guillermo Alfaro, M en IBB. Gabriel Nava y M en IBB. Venancio Ortega del Departamento de Inmunología, IIB UNAM/INCan.

Las sondas fueron proporcionadas por el Dr. Robert P. Erickson de la Universidad de Arizona, Tucson, AZ.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Sara Frias Vázquez y Dra. Laura Camarena Mejia, por sus comentarios a lo largo de la realización del trabajo experimental y al presente manuscrito.

A los demás miembros del jurado: Dr. Horacio Merchant, M en IBB. Hiram Olivera y Dr. Fabio Salamanca por revisar y comentar la presente tesis.

Al Dr. Sergio Cuevas por sus comentarios.

Este trabajo fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. Proyecto: IN-206792, por el Hospital General de México y el Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM.

El CONACYT otorgó una beca de maestría por el período: enero 1992 - abril 1993.

## INDICE

Resumen .....	1
Abstract .....	3
Introducción .....	5
Origen y evolución del sexo .....	5
Diferenciación sexual animal .....	7
Factores ambientales .....	7
Factores cromosómicos .....	10
Factores génicos .....	12
Evolución de los cromosomas sexuales .....	13
Diferenciación sexual en el humano .....	15
Cromosómica .....	15
Antígeno H-Y .....	16
Secuencias Bkm .....	16
ZFY .....	16
SRY .....	18
Gonadal .....	23
Fenotípica .....	26
Diferenciación gonadal patológica .....	29
Hermafroditismo verdadero .....	30
Síndrome de varón XX .....	33
Etiología de los varones y hermafroditas 46,XX .....	35
Reversión sexual en otras especies .....	37
Etiología de los hermafroditas verdaderos 46,XX/46,XY ...	38
Objetivos .....	39
Material y método .....	40
Pacientes .....	40
Estudios moleculares .....	45
Aislamiento de DNA .....	45
Sondas moleculares .....	47
Transformación bacteriana .....	47
Purificación del plásmido .....	48
Purificación del inserto .....	48
Hibridación DNA-DNA .....	49
Reacción en cadena de la polimerasa .....	50
Preparación de reactivos y soluciones .....	51
Resultados .....	54
Discusión .....	72
Conclusiones .....	80
Bibliografía .....	83

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Diferenciación sexual animal ..... 9

Figura 2. Determinación sexual en *D melanogaster* y *C elegans* 12

Figura 3a. Diferenciación sexual masculina ..... 28

Figura 3b. Diferenciación sexual femenina ..... 29

Tabla I. Varones XX. Características clínicas ..... 41

Tabla II. Varones XX. Características endocrinológicas ..... 42

Tabla III. Hermafroditas verdaderos. Características clínicas. 43

Tabla IV. Hermafroditas verdaderos. Cariotipo, histopatología 44

Tabla V. Hermafroditas verdaderos. Endocrinología ..... 45

Tabla VI. Varones XX. Análisis molecular ..... 55

Tabla VII. Hermafroditas verdaderos 46,XX. Análisis molecular 56

Tabla VIII.H. verdaderos 46,XX/46,XY. Análisis molecular ..... 56

Figura 4. Varones XX. Hibridación DNA-DNA. Sonda py97 ..... 57

Figura 5. Varones XX. PCR. Oligonucleótidos Y1-Y2 ..... 58

Figura 6. Varones XX. Hibridación DNA-DNA. Sonda pdp1007 .... 59

Figura 7. Varones XX. PCR. Oligonucleótidos TDF4-TDF5 ..... 60

Figura 8. Varones XX. PCR. Oligonucleótidos SRY1-SRY2 ..... 61

Figura 9. H.V. 46,XX. Hibridación DNA-DNA.Sonda py97 ..... 62

Figura 10. H.V. 46,XX. PCR. Oligonucleótidos Y1-Y2 ..... 63

Figura 11. H.V. 46,XX. Hibridación DNA-DNA. Sonda pdp1007 .... 64

Figura 12. H.V. 46,XX. PCR. Oligonucleótidos TDF4-TDF5 ..... 65

Figura 13. H.V. 46,XX. PCR. Oligonucleótidos SRY1-SRY2 ..... 66

Figura 14. H.V.46,XX/46,XY. Hibridación DNA-DNA.Sonda pY97 ...	67
Figura 15. H.V.46,XX/46,XY. PCR. Oligonucleótidos Y1-Y2 .....	68
Figura 16. H.V.46,XX/46,XY:Hibridación DNA-DNA.Sonda pDP1007 .	69
Figura 17. H.V.46,XX/46,XY. PCR. Oligonucleótidos TDF4-TDF5 ..	70
Figura 18. H.V.46,XX/46,XY. PCR. Oligonucleótidos SRY1-SRY2 ..	71

## A B R E V I A T U R A S

Bkm	Banded krait minor
CGP	Células Germinales Primordiales
DHT	Dihidrotestosterona
dpc	días post-coito
E2	Estradiol
FSH	Hormona Folículo Estimulante
HCG	Gonadotropina Coriónica Humana
HMG	Grupo de Alta Movilidad
HV	Hermafroditismo Verdadero o Hermafrodita Verdadero
LH	Hormona Luteinizante
MIS	Sustancia Inhibidora de Müllermanos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Transcriptasa Reversa por Reacción en Cadena de la Polimerasa
SRY	Sex-determining Region of the Y chromosome (humano)
Sry	Sex-determining Region of the Y chromosome (ratón)
Sxl	Gen sex lethal
T	Testosterona
TDF	Factor Determinante Testicular
Tdy	Testis determining Y gene
VXX	Varón XX
WT1	Gen relacionado con el tumor de Wilms
ZFX	Zinc Finger protein on X chromosome (humano)
Zfx	Zinc Finger protein on X chromosome (ratón)
ZFY	Zinc Finger protein on Y chromosome (humano)
Zfy	Zinc Finger protein on Y chromosome (ratón)



## R E S U M E N

La determinación sexual en mamíferos aún no está completamente elucidada, pero se considera que depende de una vía de regulación génica. En este proceso, el cromosoma Y tiene una función esencial ya que porta el gen que actúa como determinante masculino dirigiendo la formación del testículo a partir de la gónada indiferenciada. En humanos el gen *ZFY* (zinc finger protein on Y chromosome) localizado en el brazo corto del cromosoma Y fue propuesto como el *TDF* (factor determinante testicular), pero evidencias posteriores lo descartaron como *TDF*, *ZFY* probablemente participa en la espermatogénesis. Recientemente se ha ubicado al *TDF* adyacente a la región pseudoautosómica en Yp dentro de un fragmento de 35 kb, este gen fue denominado *SRY* (sex-determining region of the Y chromosome). Este gen codifica para una proteína con un dominio de unión a DNA y está relacionado con las proteínas de alta movilidad (caja HMG). El gen *SRY* satisface los criterios para ser el *TDF*.

El objetivo de este trabajo es reconocer secuencias derivadas del cromosoma Y en DNA genómico de pacientes con anomalías de la diferenciación sexual, especialmente de la diferenciación gonadal como son los varones XX y los hermafroditas verdaderos, para tratar de ayudar a establecer la etiología de estos padecimientos.

Se analizaron 8 varones XX y 10 hermafroditas verdaderos (6 con cariotipo 46,XX, 3 con cariotipo 46,XX/46,XY y uno 46,XX/47,XXY) con sondas y oligonucleótidos específicos para la regiones alfoides centroméricas del cromosoma Y y los genes ZFY y SRY.

Los resultados de los estudios moleculares de los 8 varones XX estudiados no mostraron positividad para la región centromérica del cromosoma Y. Utilizando la sonda pDP1007 específica para el gen ZFY y por PCR con oligonucleótidos específicos para los genes ZFY y SRY se reconoció que tres pacientes fueron ZFY y SRY positivos, mientras que uno fue sólo SRY positivo. Los cuatro restantes mostraban ausencia de secuencias del cromosoma Y.

Sólo uno de los hermafroditas verdaderos 46,XX presentó las secuencias del brazo corto del cromosoma Y (ZFY y SRY), los otros cinco hermafroditas verdaderos 46,XX no presentaron secuencias derivadas del cromosoma Y. No se detectaron secuencias centroméricas del Y en ninguno de ellos. Los estudios moleculares en los hermafroditas verdaderos con cariotipo 46,XX/46,XY y 46,XX/47,XXY mostraron la presencia de centrómero del cromosoma Y y de los genes ZFY y SRY.

La presencia de secuencias derivadas del Y en los pacientes con cariotipo 46,XX pudo deberse a un intercambio desigual en la meiosis paterna; mientras que en los pacientes Y negativos pudo haber ocurrido una mutación autosómica o ligada al X que permita la diferenciación testicular en ausencia del TDF.

## A B S T R A C T

## GENETIC AND MOLECULAR STUDIES IN TRUE HERMAPHRODITES AND XX MALES.

Sex determination in mammals has not yet been completely elucidated, but it is generally agreed that it involves a pathway of gene regulation. In this process the Y chromosome plays an essential role, as it carries the control gene which triggers maleness by directing testes formation from the indifferent gonad. In humans the gene *ZFY* (zinc finger protein on Y chromosome) was proposed like the *TDF* (testis determining factor), but recently this locus was redefined in a 35 kb segment on the distal region of the short arm of the Y chromosome, proximal to the pseudoautosomal boundary. The gene defined by this segment is called *SRY* (sex-determining region on Y chromosome).

The objective of this study is to recognize sequences derivated from the Y chromosome in genomic DNA from patients with sexual differentiation abnormalities, specifically from the gonadal differentiation like XX males and true hermaphrodites, to try to establish the etiology of these diseases.

Molecular analysis searching for Y-derived sequences was performed in 8 sporadic 46,XX males and in 10 sporadic true hermaphrodites (6: 46,XX, 3: 46,XX/46,XY and 1: 46,XX/47, XXY).

Three XX males where *ZFY+* *SRY+*, showing several phenotypes, another XX male presented only the *SRY* sequence and had complete virilization, while the remaining four were Y-negative with abnormal genitalia. In all cases a hidden mosaicism with a Y-bearing cell line was ruled out due to the absence of Y-centromeric sequences. Our data demonstrate that the phenotype does not always correlate with the presence or absence of Y-sequences in the genome.

Six of the true hermaphrodites were 46,XX, the molecular studies in these cases showed Yp sequences only in patient HV1 (*ZFY+* *SRY+*), the remaining five were Y negative. In the four true hermaphrodites with karyotype 46,XX/46,XY Y-centromeric and Yp sequences were detected.

In patients with 46,XX karyotype the derivated sequences from Y could be owed to an unequal interchange between X and Y chromosomes in the paternal meiosis; while the Y-negative could be owed to an autosomal or X-linked mutation that allows the testicular differentiation in the absence of *TDF*.

## I N T R O D U C C I O N

**Origen y Evolución del Sexo.**

La reproducción a partir de un solo progenitor se denomina asexual (Margulis y Sagan, 1985; Margulis, 1986). Los procariontes se reproducen asexualmente por fisión binaria o por gemación, la descendencia procede de un sólo progenitor de quien recibe todos sus genes. Algunas bacterias han desarrollado una clase de proceso sexual llamado conjugación bacteriana, mediante el cual una bacteria donadora (F+) transfiere información genética a una bacteria receptora (F-), la cantidad de DNA transferida es variable (Ippen-Ihler y Minkley, 1986; Lewin, 1994). Después de la conjugación, la célula receptora, ahora convertida en célula hija, es una célula conjugante o recombinante, que recibe la información genética de ambos progenitores (donador y receptor) (Margulis, 1986).

Las bacterias pueden adquirir información genética diferente por otros dos procesos, la transducción mediada por fagos y la transformación en la cual la célula bacteriana incorpora DNA del medio (Lewin, 1994).

A diferencia de los procariontes, los eucariontes con excepción de algunos protistas, se reproducen sexualmente; es decir, la descendencia posee genes procedentes de dos progenitores (Margulis, 1986).

La vía evolutiva que condujo de la reproducción asexual a la sexual con dos progenitores fue compleja; entre sus numerosos pasos requirió de la organización del material genético en cromosomas y del desarrollo de la mitosis y posteriormente de la meiosis (McIntosh, 1985; Margulis, 1986; Alberts et al., 1989). Durante la meiosis se lleva a cabo la recombinación o el entrecruzamiento entre los cromosomas homólogos, ésto enriquece la información genética en las células haploides resultantes (Cleveland, 1947; Margulis, 1986; Alberts et al., 1989). El número diploide de cromosomas se recupera durante la fertilización (Wassarman, 1987).

La aparición de la reproducción sexual proporcionó a la vida una de sus estrategias más importantes: una forma nueva de incorporar cambios genéticos con valor adaptativo; los genes preexistentes y por lo tanto presumiblemente ventajosos, pueden recombinarse rápidamente en nuevos individuos. Contrariamente a lo que ocurre en los procariontes, fundamentalmente asexuados, que adquieren variabilidad genética por medio de mutaciones, los organismos sexuados no necesitan que exista aparición de una mutación favorable, pues cuando ya la posee distintos individuos pueden combinarse rápidamente y la descendencia puede adquirir esta ventaja (Crews, 1994).

## Diferenciación Sexual Animal.

Una de las características más importantes de la vida es la sexualidad, la división en hembras y machos. Las diferencias fenotípicas entre los dos sexos incluyen apariencia, comportamiento y "maquillaje" químico en casi todos los organismos multicelulares (Crews, 1994).

Los diversos grupos animales exhiben una sorprendente variedad de sistemas de determinación sexual (Hodgkin, 1992), es más, algunos sistemas que son superficialmente similares pueden utilizar diferentes mecanismos básicos. El control de la determinación sexual está influida por factores ambientales, cromosómicos (relación X-autosomas) y génicos (Figura 1) (McLaren, 1988).

### Factores ambientales

En el gusano *Bonellis viridia*, el sexo fenotípico está determinado por la distancia de la larva a la madre. La larva presente en la proboscide de la madre se desarrolla como masculina, en cambio la larva distante se desarrolla como femenina. Se ha sugerido que la madre secreta en la proboscide una sustancia u hormona masculinizante (Simpson, 1976).

Los estímulos sensoriales pueden modular la diferenciación sexual. Algunas especies de peces dependientes de estímulos sociales son hermafroditas secuenciales, es decir, cambian de un sexo a otro durante su vida, pero sólo expresan un sexo gonadal

en un momento determinado. Los peces anémona anaranjados, así como los blancos, nacen como machos y posteriormente se desarrollan como hembras. Ciertos peces que viven en los arrecifes de coral en el Océano Pacífico y en el Caribe siguen el curso opuesto, comienzan como hembras y luego se transforman en machos. El cambio de sexo depende de un factor social, como la desaparición de una hembra o un macho dominante (Ohno, 1967; Crews, 1994). En el pez rojo *Anthias squamipinnis* el porcentaje de hembras y machos está determinado por estímulos visuales; cuando en un tanque sólo se encuentran hembras una de ellas revertirá a sexo masculino, lo cual no ocurre si se coloca un macho en un tanque contiguo separado por un vidrio (Fishelson, 1970). Otras especies de peces son hermafroditas simultáneos, pero nunca fertilizan sus propios huevos, se aparean para mantener las ventajas de la diversidad genética proporcionada por la reproducción sexual. Entonces, el sexo expresado por un pez depende de su entorno social (Crews, 1994).

En muchas clases de reptiles la temperatura de incubación del huevo va a determinar el sexo; por ejemplo en varias tortugas terrestres y marinas se desarrollan machos a temperaturas bajas de incubación y hembras a temperaturas altas; contrariamente a lo que sucede en lagartijas y cocodrilos en los que en temperaturas bajas de incubación se obtienen hembras y en altas machos (Bull y Vogt, 1979; Bull, 1980; Crews, 1994).



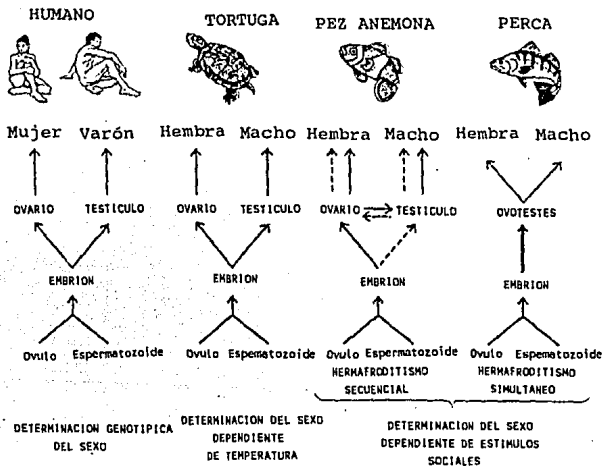


Figura 1. Mecanismos de determinación del sexo en animales, un factor génico o ambiental dirige el desarrollo hacia hembra o macho (modificada de Crews, 1994).

### Factores cromosómicos (relación X-autosomas)

Los cromosomas homomórficos y comunes en ambos sexos son los llamados autosomas, los heteromórficos son el par de cromosomas sexuales (X y Y ó Z y W) (Gardner, 1975). En organismos como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* el sexo está determinado por el número de cromosomas X en relación a los autosomas, ambas especies presentan dos sexos. En *Caenorhabditis* el nemátodo XX es normalmente hermafrodita y el XO es masculino, los hermafroditas son esencialmente hembras somáticas que producen primero espermatoцитos y luego oocitos (Hodgkin, 1992; McElreavey et al., 1993a). En *Drosophila* las moscas XX son hembras y las XY son machos, sin embargo el cromosoma Y no es el determinante del sexo (Hodgkin, 1992; Cline, 1993). En ambas especies la determinación del sexo se basa en la relación de cromosomas X y autosomas (X:A) (Hodgkin, 1990).

El control génico de la determinación del sexo en estos dos modelos ha sido reconocido debido a la identificación de mutaciones que modifican un fenotipo en otro; ésto ha permitido clonar genes relacionados con la determinación del sexo en ambos organismos. Inesperadamente el análisis comparativo de estos genes reveló que no hay semejanzas en la secuencia de eventos entre las dos especies (Hodgkin, 1992) y que los mecanismos moleculares que participan en la diferenciación sexual en las dos especies son muy diferentes.

La determinación del sexo en la *Drosophila* ocurre a través de una cascada de interacciones de regulación positiva, generalmente mediadas por procesamiento de RNA, mientras que en el *Caenorhabditis* la cascada esta caracterizada por interacciones de regulación negativa (Figura 2) (Hodgkin, 1990; Hodgkin, 1992; Cline, 1993; McElreavey et al., 1993a).

La relación X:A en *Drosophila* dicta el estado de actividad del gen maestro regulador *sex lethal* (*Sxl*) que se transcribe en ambos sexos. En moscas hembra (2X:2A) el producto del gen *Sxl* es funcional, contrariamente a lo que ocurre en machos (1X:2A) en que la proteína esta truncada. El gen *Sxl* dirige el desarrollo sexual a través de su efecto en la cascada génica que regula la determinación del sexo somático (Hodgkin, 1990; Cline, 1993).

En *Caenorhabditis elegans* la señal primaria de determinación del sexo es la relación X:A y los genes que controlan la vía de determinación sexual (*Xol* y *sdc*). En respuesta a una baja relación X:A el gen maestro *Xol-1* regula negativamente a los genes *sdc-1*, *sdc-2* y *sdc-3*. Basándose en estudios de mutaciones en los genes *sdc* se predijo que estos regulan negativamente al siguiente gen en la cascada de la determinación del sexo *her-1*. En machos los niveles de expresión de *her-1* son elevados, mientras que niveles muy bajos pueden detectarse en hermafroditas. (Hodgkin, 1990; McElreavey et al., 1993a).

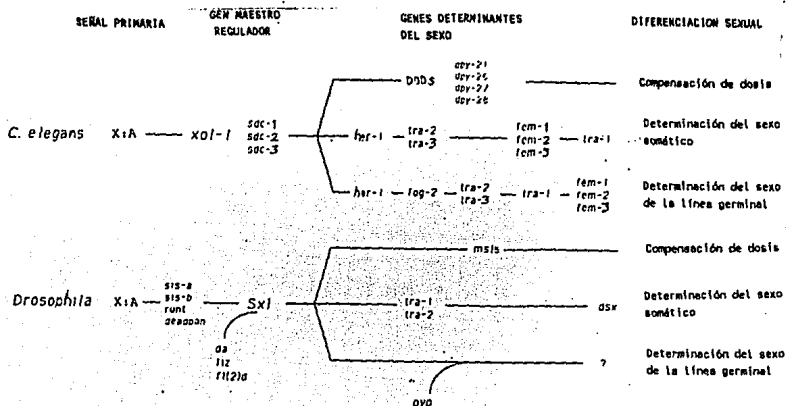


Figura 2. Diagrama esquemático de las vías de determinación del sexo en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (modificada de Hodgkin, 1990).

### Factores génicos

En algunas especies de organismos multicelulares la determinación sexual está bajo el control de un sólo gen o un pequeño número de genes. El sexo heterogamético lleva diferentes alelos de este gen o genes y produce dos tipos de células sexuales, en cambio el sexo homogamético es homocigoto para estos genes (Lucchesi, 1994). En mamíferos el cromosoma Y actúa

como un determinante masculino dominante, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma. Individuos XY, XXY o XXXY son masculinos, mientras que individuos XO, XX o XXX son femeninos (Welshons y Russell, 1959; McLaren, 1988). Esto indica que existe un gen (o genes) en el cromosoma Y que determina el sexo masculino (McLaren, 1991a). En otros organismos como aves y reptiles, el individuo homogamético (ZZ) corresponde al sexo masculino y el heterogamético (ZW) al femenino (Becak et al., 1964; Bull, 1980; McLaren, 1988).

#### **Evolución de los Cromosomas Sexuales.**

La reproducción sexual con dimorfismo gamético es casi universal entre los eucariontes. Los gametos femeninos y los masculinos pueden ser producidos por el mismo individuo (cosexualidad) o por individuos diferentes (gonocoria). En este último caso el dimorfismo fenotípico es también muy frecuente. La forma más común de determinación genética del sexo requiere de la participación de los cromosomas sexuales (Charlesworth, 1991).

Se ha sugerido que los cromosomas sexuales se derivan de un par de cromosomas homólogos. Esto se apoya en estudios citogenéticos en serpientes, cuyo sexo heterogamético es el femenino y donde se encuentran variaciones entre los cromosomas sexuales Z y W (Becak et al., 1964). En la familia más primitiva de las serpientes, la *Boidae*, el cuarto par de cromosomas

corresponde a los cromosomas sexuales Z y W y éstos son homomórficos. En cambio, en la familia *Colubridae*, los cromosomas Z y W son del mismo tamaño pero difieren por una inversión pericéntrica del cromosoma W. En las familias *Crotalidae*, *Elapidae* y *Viperidae*, las más evolucionadas de los reptiles, el cromosoma W es muy pequeño (Kobel, 1962). La pérdida de homología entre los cromosomas Z y W modificó el apareamiento meiótico y condujo a un entrecruzamiento desigual, favoreciendo la pérdida de algunas regiones y dando lugar a la estructura actual de los cromosomas sexuales (Polani, 1982).

En especies en donde el sexo heterogamético es el masculino, la ausencia de intercambio genético está asociada con una pérdida de homología genética entre regiones relevantes de los cromosomas X y Y (Charlesworth, 1991; Rice, 1994). El cromosoma X mantiene las secuencias originales, mientras que en el cromosoma Y sólo se han preservado algunos genes (Page et al., 1984; Lucchesi, 1994).

En los mamíferos, la región de apareamiento de los cromosomas X y Y, llamada región pseudoautosómica, contiene loci homólogos (Cuevas y Kofman, 1990; Charlesworth, 1991; Ellis, 1991; Rappold, 1993). En el humano la región pseudoautosómica se localiza en la parte distal del brazo corto de los cromosomas sexuales X y Y, contiene secuencias homólogas y es el sitio de apareamiento entre el X y el Y durante la meiosis masculina (Rappold, 1993).

## Diferenciación Sexual en el Humano.

La diferenciación sexual en el humano es un proceso dinámico, sujeto a un programa secuencial en tres etapas de diferenciación. 1) Cromosómica, 2) Gonadal o diferenciación sexual primaria y 3) Fenotípica o diferenciación sexual secundaria (Kofman-Alfaro et al., 1982).

### Diferenciación cromosómica

El proceso de diferenciación cromosómica en mamíferos se inicia en el momento de la fertilización cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza un óvulo que aporta un cromosoma X (Wassarman, 1987). El complemento cromosómico XX corresponde al sexo femenino y el XY al masculino. Desde hace tiempo se postuló que la presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva (Jost, 1953; Welshons y Russell, 1959), indicando que en este cromosoma se debía de localizar el inductor del desarrollo testicular llamado *TDF* (Testis Determining Factor) en humanos y *Tdy* (Testis determining Y gene) en ratón. Se postularon diversos factores para cumplir con esta función, entre ellos el antígeno H-Y, las secuencias Bkm, el gen *ZFY* y recientemente el gen *SRY*.

### Antígeno H-Y

El antígeno H-Y fue considerado durante una época como el principal inductor de la diferenciación testicular (Billingham y Silvers, 1960; Wachtel et al., 1975). Sin embargo, evidencias bioquímicas y moleculares posteriores lo excluyeron como *TDF* (Zenzes et al., 1978; Cuevas y Kofman, 1990).

### Secuencias Bkm

Se denominan Bkm por ser aisladas de la víbora Banded Krait Minor. Estas secuencias están ampliamente distribuidas en el genoma de los diferentes organismos y fueron asociadas a la determinación del sexo heterogamético. En el ratón se han observado en los cromosomas Y, X y 17 y en el humano estas se localizan en los cromosomas 6, 11 y X pero no en el Y, lo que descartó su participación en la determinación sexual (Kiel-Metzger et al., 1985).

### ZFY (Zinc finger gene on Y chromosome)

El análisis de las secuencias del cromosoma Y presentes en un varón XX y ausentes en una mujer XY con translocación Y:22 permitieron a Page y cols. sugerir la localización del *TDF* en un fragmento de 140 kb, en el intervalo 1A1 del brazo corto del cromosoma Y. En esta región fue identificado el gen *ZFY* (zinc finger gene on Y chromosome), el cual fue propuesto como el *TDF* (Page et al., 1987).



El gen *ZFY* codifica para una proteína con núcleo de Zn y 13 dedos con capacidad de unión a DNA, que puede participar en la regulación de la transcripción. El mismo grupo de investigadores reconoció la presencia de un gen homólogo a *ZFY* en el cromosoma X (Xp21.3), el gen *ZFX*, postulando un mecanismo de dosis génica que controlara la diferenciación testicular basándose en la inactivación del cromosoma X (Page et al., 1987). Sin embargo, posteriormente se describió que el gen *ZFX* escapa a la inactivación por lo que la hipótesis de dosis génica fue descartada (Schneider-Gadicke et al., 1989).

Otras evidencias que descartaron al gen *ZFY* como *TDF* fueron:

a) Sinclair y cols en 1988 reportaron que genes homólogos a *ZFY* en marsupiales se localizan en autosomas.

b) El estudio de la expresión de *Zfy-1* y *Zfy-2* (homólogos murinos de *ZFY*) en un embrión mostró que los primeros transcritos de *Zfy-1* aparecen antes de la diferenciación testicular, aumentan en el momento en que ésta ocurre y decrecen una vez que se ha establecido; *Zfy-2* sólo se expresa en el testículo adulto. Además en ratones  $w^e/w^e$ , que carecen de células germinales, *Zfy-1* y *Zfy-2* no se expresan, lo que indica que *Zfy* no es el *TDF* porque éste debería expresarse en las células somáticas de la gónada en desarrollo. (Koopman et al., 1989).

c) El gen *ZFY* esta ausente en 20% de los varones XX y en la mayoría de los hermafroditas verdaderos 46,XX (Ramsay et al., 1988).

d) En tres varones 46,XX y en un hermafrodita verdadero 46,XX se encontró la presencia de un fragmento del cromosoma Y de 60 kb que no incluía al ZFY (Palmer et al., 1989).

#### SRY (Sex-determining gene on Y chromosome)

En 1989 Palmer y cols., propusieron que el TDF se encontraba en la zona comprendida entre la región pseudoautosómica y 60 kb hacia el centrómero del cromosoma Y. En 1990 Sinclair y cols., redefinieron esta región en Yp, constituida por 35 kb subclonándola en varios fragmentos que fueron utilizados como sondas para estudios de hibridación DNA-DNA en mamíferos de ambos sexos (bovinos, murinos, cuyos y humanos). Sólo el fragmento pY53.3 se encontró conservado en todos los euterios analizados y su secuencia reveló un marco de lectura abierto para 223 aminoácidos (aa). La comparación de esta secuencia de aa con la de otras proteínas mostró homología con proteínas no-histonas del grupo de proteínas de alta movilidad (HMG), en una región de 79 aa conocida como caja HMG (Sinclair et al., 1990). La caja HMG se ha encontrado en diferentes proteínas con propiedades de unión a DNA, incluyendo algunos factores de transcripción (Ner, 1992). La presencia de la caja HMG puede implicar que el producto del gen SRY sea un regulador transcripcional de otros genes en la vía de la determinación del sexo (Goodfellow y Lovell-Badge, 1993).

Diversas evidencias experimentales apoyan la hipótesis de que el gen SRY es el TDF:

a) Localización cromosómica del gen *SRY*.- En humanos el *SRY* se localiza en el fragmento de 35 kb en los brazos cortos del cromosoma Y que induce el desarrollo testicular (Sinclair et al., 1990). La localización en Yp fue corroborada en el sujeto 46,XY con translocación Y:22, antes mencionado, que presentaba una deleción en la región del gen *ZFY* y una segunda deleción del gen *SRY* (Page et al., 1990). La localización cromosómica del *SRY* ha sido determinada indirectamente en muchas especies de mamíferos euterios por la deleción de fragmentos específicos del cromosoma Y (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990; Gubbay et al., 1992). Homólogos del *SRY* han sido detectados en el cromosoma Y en dos ordenes de marsupiales (Foster et al., 1992).

b) Patrones de expresión.- Cualquier gen implicado que se postule tenga función en la determinación del sexo debe de expresarse en el momento de la diferenciación de la cresta genital hacia el testículo (Koopman et al., 1989). Utilizando el método de transcriptasa reversa por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en RNAm derivado de crestas genitales de ratón, fue posible detectar la expresión de *Sry* en machos a los 10.5, 11.5 y trazas a los 12.5 dpc (días post-coito). También se ha observado expresión de *Sry* en testículos de ratón adulto (Koopman et al., 1990). La hibridación *in situ* en embriones sugiere que la expresión de *Sry* está limitada a la cresta genital y posiblemente al componente somático de la gónada en desarrollo; ésto fue confirmado observando embriones machos  $W^e/W^e$ , que carecen de células germinales. En contraste, la

expresión del gen *Sry* en el testículo adulto requiere de la presencia de células germinales (Koopman et al., 1990). Se ha reportado la expresión de *Sry* en el embrión de ratón en blastocisto, no obstante esto no implica una función durante la preimplantación (Zwingman et al., 1993). La expresión del gen *SRY* en el humano ha sido detectada en el testículo adulto (Sinclair et al., 1990), y mediante RT-PCR también se detectan niveles de expresión bajos en varios tejidos fetales, incluyendo el cerebro (Goodfellow y Lovell-Badge, 1993). La expresión del *SRY* es específica en tiempo y tejido, lo que sugiere la existencia de genes que lo controlen y que actúan "río arriba" en la vía de la determinación del sexo. Aún no se conoce la identidad específica de éstos (Goodfellow y Lovell-Badge, 1993).

c) Mutaciones de *SRY* en mujeres 46,XY.- Las mutaciones en el gen *SRY* resultan en pérdida de su función y pueden causar reversión sexual como por ejemplo en individuos 46,XY que desarrollan fenotipo femenino y disgenesia gonadal (Berta et al., 1990; Jager et al., 1990; Hawkins et al., 1992; Affara et al., 1993). Solo 15% de estos sujetos presentan mutaciones puntuales o pequeñas deleciones en la región que codifica para la caja HMG (Berta et al., 1990; Jager et al., 1990; Hawkins et al., 1992; Affara et al., 1993). La mayoría de las mutaciones descritas son *de novo* y pueden ocurrir en la línea germinal paterna o muy temprano en el desarrollo embrionario (Berta et al., 1990; Affara et al., 1993). Existen también mutaciones heredadas (Jager et al., 1992). El análisis de los productos de

*SRY* con mutaciones en la caja HMG, muestra en algunos casos la pérdida de unión al DNA (Hawkins et al., 1992; Mc Elreavey et al., 1992b; Affara et al., 1993).

d) R ratones transgénicos para *Sry*.- En 1991 Koopman y cols., transfectoron un fragmento de DNA de 14 kb del cromosoma Y que incluía al gen *Sry* a ratones 46,XX, observándose que 25% de los transgénicos para *Sry* presentaban reversión sexual. Aunque se demostró que *Sry* puede promover el desarrollo testicular en ausencia de otros genes ligados al cromosoma Y la reversión sexual no ocurre en todos los casos, la explicación más plausible es que el transgen *Sry* sea sensible a efectos de posición, es decir, que alteren su expresión las secuencias que lo flanquean en el lugar de integración.

e) Caracterización molecular de *SRY*.- En el humano el transcrito del gen *SRY* no presenta intrones y produce un transcrito de 1.1 kb (Su y Lau, 1993). El producto de *SRY* presenta una región de unión a DNA, la caja HMG; esta unión parecería depender tanto de la secuencia como de la conformación del DNA; la secuencia consenso que reconoce es A/TACAAT y la conformación es DNA cruciforme (Bianchi et al., 1992; Ferrari et al., 1992). Se ha observado que *SRY* se puede unir a promotores de otros genes relacionados con la diferenciación sexual como el gen *MIS* (sustancia inhibidora de Müllermanos) y el de la aromatasa P450 (Haqq et al., 1993). Aún cuando se ha demostrado que la proteína de *SRY* se une a DNA y lo dobla en un ángulo de 85°, aún no se ha demostrado que pueda afectar la transcripción

(Goodfellow y Lovell-Badge, 1993).

f) *SRY* y autosomas.- La vía de la determinación del sexo además del gen *SRY* en el cromosoma Y, cuenta con la participación de otros genes localizados en el cromosoma X o en autosomas que pueden actuar "río arriba" o "río abajo" de *SRY*. Estos genes aún no se conocen con certeza pero se han propuesto que el gen *MIS* puede influir en el desarrollo de la gónada y probablemente actúe después de *SRY*. Otros estudios indican que el gen *WT1* relacionado con el tumor de Wilms pudiera actuar antes del gen *SRY* (Bogan y Page, 1994).

g) Acción de *SRY* e interacciones célula-célula.- Cuatro linajes celulares están comprometidos en el desarrollo de la gónada, cada uno de ellos bipotenciales: i) células germinales, ii) células de soporte, iii) células esteroidogénicas y iv) células de tejido conectivo. El gen *Sry* actúa en el linaje de las células de soporte para diferenciarlas en células de Sertoli, todos los demás linajes siguen entonces la línea de diferenciación testicular (McLaren, 1991b). Sin embargo, en algunas circunstancias *Sry* no es suficiente y a veces no es necesario para la diferenciación de las células de Sertoli (Palmer y Burgoyne, 1991). Por ello, el gen *Sry* no puede ser visto como el único gen responsable de comprometer a las células de una manera específica. Es claro que las interacciones célula-célula son críticas para la función de *Sry* y en general para la diferenciación gonadal (Palmer y Burgoyne, 1991; Lovell-Badge, 1992).

h) Conservación del gen *SRY* en la escala filogenética.- El gen *SRY* se ha encontrado en otras especies incluyendo marsupiales y primates, la única región conservada entre todas ellas es la caja HMG (Tiersch et al., 1991; Goodfellow y Lovell-Badge, 1993).

### Diferenciación gonadal

La gónada en los mamíferos está compuesta por células germinales y por tres tipos de células somáticas: células de soporte (células de Sertoli en el macho y células foliculares en la hembra), células esteroidogénicas (células de Leydig en el macho y células de la teca en la hembra) y células de tejido conectivo (Balinsky, 1978; Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986; Bogan y Page, 1994).

Las gónadas se desarrollan en la mitad posterior del embrión, a partir del borde superior de la capa visceral del mesodermo de la placa lateral. El primer esbozo aparece formando una banda longitudinal engrosada de epitelio mesodérmico, que tapiza la cavidad del embrión a los lados del mesenterio dorsal: la cresta germinal. Esta, se forma a partir de las células mesodérmicas que van a dar origen a las células somáticas de la gónada (Balinsky, 1978). El otro tipo celular son las células germinales primordiales (CGP) de origen extragonadal, migratorias, que pueden establecer contacto con células somáticas y tienen capacidad de proliferación. En el humano las CGP se reconocen tempranamente, son más grandes que las células

somáticas, de citoplasma claro, núcleos grandes y redondos, con un contenido alto de glucógeno y fosfatasa alcalina (McKay, 1953). Se observan por primera vez a los 22 días de vida embrionaria, iniciando la migración alrededor de la 4a semana desde el endodermo del intestino y el epitelio dorsal del saco vitelino a través del mesenterio dorsal para llegar a la gónada primitiva aproximadamente en la 5a semana (Witschi, 1948). En muchas especies las CGP llegan a las cercanías de la región urogenital por fuerzas pasivas, ya sea a través de la circulación o por rearrreglos morfogenéticos, como en mamíferos (Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986). Una vez próximas a la gónada presentan un desplazamiento ameboide activo. Se desconoce el factor o los factores que guían a las CGP a su destino, pero es claro que las células somáticas que se encuentran en la región de las crestas genitales poseen y/o emiten señales específicas que atraen y retienen a las CGP (Wylie y Heasman, 1993). Existe evidencia que la fibronectina está presente a lo largo de la ruta migratoria de las CGP y que esta glicoproteína es necesaria para la translocación de las CGP *in vitro* (Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986). Las CGP empiezan a proliferar en la cresta urogenital, coincidiendo con la proliferación de las células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico que bordean esta región (Balinsky, 1978; Wylie y Heasman, 1993).

La gónada primitiva tiende a organizarse en dos estructuras; aquella que presenta a las CGP rodeadas por células somáticas precursoras de las células de Sertoli o de la granulosa y la que



presenta el tejido estromático que dará origen al tejido conectivo, vasos sanguíneos y tejido intersticial esteroideogénico. Este último estará representado por las células de Leydig o de la teca interna y la glándula intersticial (Balinsky, 1978; Kofman-Alfaro et al., 1982; Merchant-Larios y Taketo, 1991). La gónada primitiva o indiferenciada se distribuye en dos áreas, la corteza y la médula. La diferenciación gonadal comienza entonces con el establecimiento de la gónada sexualmente indiferenciada o primitiva (Merchant-Larios y Taketo, 1991).

El primer evento en la diferenciación sexual es la invasión gradual de mesenquima y células endoteliales hacia la cresta genital en la gónada de los embriones masculinos (XY) (Merchant-Larios y Taketo, 1991), como resultado los cordones sexuales primitivos se vuelven conspicuos, primero en la región de la médula y después en la corteza, las CGP migran de la corteza de la gónada hasta los cordones sexuales primitivos de la médula, para formar los túbulos seminíferos que quedan conectados a la rete testis. Estos conductos se desarrollan en la parte dorsal de la gónada y se conectan con el mesonefros. La médula del testículo pasa a ser una porción funcional, en cambio la corteza se reduce y se convierte en una capa epitelial delgada que cubre la cavidad celómica (Merchant-Larios y Taketo, 1991; Merchant-Larios et al., 1993). A nivel ultraestructural las células de Sertoli son las primeras que se diferencian, se identifican por el desarrollo de retículo endoplásmico rugoso, este cambio

citológico puede reflejar la producción activa de MIS. La diferenciación de las células de Leydig y de las células mioides peritubulares se observa en estadios más tardíos (Merchant-Larios y Taketo, 1991).

Contrariamente, en los embriones femeninos es la médula de la gónada la que se reduce, el crecimiento del estroma es pobre. Los cordones sexuales primarios son reabsorbidos y el interior de la gónada madura se llena de mesénquima poco compacto atravesado por vasos sanguíneos. Las CGP permanecen en la corteza, la cual aumenta de espesor. Durante el crecimiento de la gónada, las células corticales se agrupan y rodean a una o varias CGP, que van a formar los oocitos primarios, los folículos se forman sólo cuando hay oocitos, en ausencia de oocitos no hay foliculogénesis y por lo tanto persisten los cordones gonadales, los cuales pueden parecerse a los túbulos seminíferos cuando se observan en microscopía de luz (Taketo-Hosotani et al., 1989; Merchant-Larios y Taketo, 1991).

#### Diferenciación fenotípica

Constituye la diferenciación de los genitales internos y externos y depende del tipo de gónada presente. Este mecanismo fue elucidado experimentalmente por Jost en 1953, quien demostró que cuando la gónada primitiva se diferencia a testículo, sus secreciones hormonales inducen el desarrollo del fenotipo masculino; en cambio si la diferenciación gonadal ocurre hacia ovario, el fenotipo pasivamente será femenino. La ausencia

temprana de las gónadas fetales también conduce a un fenotipo femenino lo cual también demuestra la escasa actividad endócrina del ovario fetal (Jost, 1953; Jost et al., 1973).

Las estructuras primordiales del tracto genital incluyen dos sistemas de conductos presentes en embriones de ambos sexos que darán origen a los genitales internos: los conductos wolffianos (mesonéfricos) y los conductos müllerianos (paramesonéfricos). Los genitales externos se desarrollan a partir del tubérculo genital, los pliegues genitales y el engrosamiento labioescrotal.

El fenotipo masculino resulta de la acción de tres hormonas testiculares; la sustancia u hormona inhibidora de los conductos müllerianos (MIS), la testosterona (T) y la dihidrotestosterona (DHT). La MIS es secretada por las células de Sertoli y causa regresión de los conductos müllerianos alrededor de las 8 semanas de gestación. Posteriormente, la testosterona secretada por las células de Leydig, induce el desarrollo de los conductos wolffianos en epidídimo, vas deferens, conducto eyaculador y vesículas seminales. La diferenciación de los genitales externos masculinos está dada por la DHT que se forma a partir de la reducción de la T mediante la acción de la 5-alfa reductasa extragonadal (Josso et al., 1991; Josso, 1992).

El fenotipo femenino no requiere de secreciones hormonales. En ausencia de MIS, los conductos müllerianos no involucionan y posteriormente se desarrollarán en útero, trompas de falopio y tercio superior de la vagina. La ausencia de T conduce a la

involución de los conductos wolffianos y en ausencia de DHT los genitales externos se desarrollan como femeninos (Josso et al., 1991; Josso, 1992).

En la figura 3 se resume la diferenciación sexual en el humano.

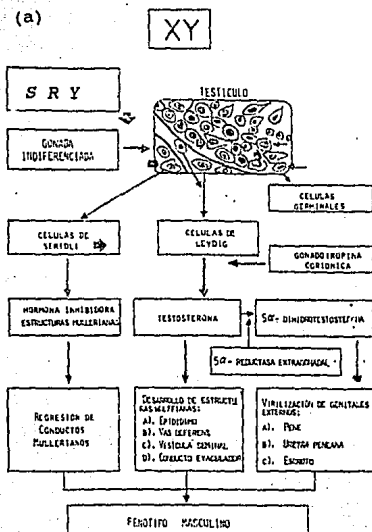


Figura 3a. Diferenciación sexual Masculina normal en el humano (modificada de Kofman-Alfaro, et al., 1982).

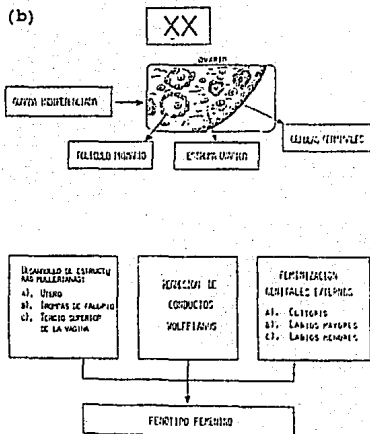


Figura 3b. Diferenciación sexual femenina normal en el humano (modificada de Kofman-Alfaro, et al., 1982).

#### Diferenciación gonadal patológica.

Aunque pueden existir alteraciones de la diferenciación sexual a todos los niveles, son de particular interés para este trabajo las alteraciones de la diferenciación gonadal.

Las alteraciones de la diferenciación gonadal ocurren durante la vida intrauterina y se traducen en la vida posnatal en un grupo de entidades clínicas bien reconocidas, caracterizadas por la incongruencia entre el sexo cromosómico y el sexo gonadal del individuo. Este fenómeno puede presentarse en forma esporádica o familiar. En este grupo de alteraciones se incluye al hermafroditismo verdadero y al síndrome de varón XX.

### Hermafroditismo verdadero.

El hermafroditismo verdadero (HV) es una de las variantes más raras de los estados intersexuales en el humano. En este los individuos afectados poseen tanto tejido ovárico como testicular, ya sea en gónadas separadas o formando ovotestes (Klebs, 1876). El tejido ovárico no sólo contiene estroma sino también folículos, mientras que en el tejido testicular deben estar presentes tubúlos seminíferos (Grumbach y Conte, 1981; Pérez-Palacios et al., 1994a). El padecimiento es la mayoría de las veces esporádico, aunque existen algunos casos familiares (Armendares et al., 1975; van Niekerk, 1976; Ramsay et al., 1988).

### Clasificación.

En 1981 van Niekerk estableció una clasificación, de acuerdo al tipo y distribución del tejido gonadal en los HV:

- 1.- Bilateral. Ovotestes presente en ambos lados.
- 2.- Unilateral. Ovotestes de un lado y ovario o testículo contralateral.
- 3.- Alterna o lateral. Ovario en un lado y testículo en el lado opuesto.

En 1981, van Niekerk y Retief examinaron los patrones de distribución gonadal en 409 casos de HV, encontrando que las combinaciones gonadales más frecuentes son ovario-testículo en un 29.6% y ovotestes-ovario en un 29.1%; otros arreglos como

ovotestes bilateral y ovotestes-testículo son menos frecuentes.

#### Características clínicas.

La ambigüedad de los genitales internos y externos depende en cada caso de la producción hormonal de las gónadas presentes. En la mayoría de estos los genitales están suficientemente virilizados y debido al tamaño del falo el sexo de asignación es por lo general masculino (van Niekerk y Retief, 1981; Kofman-Alfaro et al., 1992). Aún cuando esta entidad se asocia siempre con anomalías genitales, sólo un 20% de los pacientes presenta ambigüedad genital severa, por lo que consultan al nacimiento.

Los ovarios en los HV presentan una localización normal, en cambio, el testículo puede tener una posición intra-abdominal, inguinal o escrotal. La posición del ovotestes depende de la cantidad de tejido ovárico o testicular presente, encontrándose en cavidad abdominal en 50% de los casos o en el trayecto de descenso testicular en el resto (van Niekerk y Retief, 1981; Kuhn et al., 1985). El tejido ovárico y testicular en el ovotestes puede estar separado uno de otro o de manera imbricada (van Niekerk y Retief, 1981; Kuhn et al., 1985). En esta entidad no se observan comúnmente cambios en la identidad psicosexual de los pacientes (Pérez-Palacios et al., 1994a).

En pacientes adultos con menor grado de ambigüedad genital los síntomas que pueden llevar al diagnóstico de HV incluyen hematuria cíclica, amenorrea, hematocolpos, ginecomastia o la presencia de hernias inguinales (Pérez-Palacios et al., 1994a).

### Citogenética.

En dos tercios de los pacientes con HV el cariotipo es 46,XX, siguiéndole en frecuencia el 46,XX/46,XY, el 46,XY y otros mosaicos cromosómicos (Gallegos et al., 1976; van Niekerk, 1976; van Niekerk y Retief, 1981).

### Función endócrina y gametogénica.

En la pubertad, los HV presentan todos los cambios en la unidad hipotalámica-pituitaria que se observan en los individuos normales (van Niekerk y Retief, 1981; Kofman-Alfaro et al., 1992). Como resultado del aumento en las concentraciones de las gonadotropinas (LH y FSH), el tejido gonadal puede iniciar su función gametogénica y/o hormonal. La producción relativa de hormonas sexuales esteroideas (andrógenos y/o estrógenos + progesterona) puede variar dependiendo de la composición de las gónadas y el desarrollo de características sexuales secundarias depende de las hormonas predominantemente secretadas (Grumbach y Conte, 1981; Pérez-Palacios et al., 1981).

En la pubertad, el ovario o el componente ovárico del ovotestes comienzan su producción hormonal más temprano que el componente testicular, de manera similar a lo que se observa en la población normal. Aproximadamente la mitad de los casos estudiados muestran desarrollo mamario y signos de ovulación (van Niekerk y Retief, 1981; Kofman-Alfaro et al., 1992; Pérez-Palacios et al., 1994a), e incluso existen reportes de



fertilidad en HV con fenotipo femenino (Narita et al., 1975; Tegenkamp et al., 1979). La presencia de ginecomastia durante la pubertad y vida adulta ha servido como una clave diagnóstica para esta entidad en HV con fenotipo masculino (Pérez-Palacios et al., 1981).

El testículo presenta secreción de T, pero sólo en el 12% de los casos reportados por van Niekerk y Retief se documentó espermatogénesis.

#### Síndrome del Varón XX

El síndrome del Varón XX fue descrito en 1964 y se caracteriza por la presencia de un cariotipo 46,XX en individuos con fenotipo masculino (de la Chapelle et al., 1964; Therkelsen, 1964). El padecimiento presenta una frecuencia de 1 en 20000 a 1 en 40000 en diferentes poblaciones (de la Chapelle, 1972; Evans et al., 1979; de la Chapelle, 1981). La mayoría de los casos son esporádicos, aunque se han informado familias con varios varones XX (de la Chapelle et al., 1977) o coexistiendo con hermafroditas verdaderos (Berger et al., 1970; Skordis et al., 1987).

#### Características clínicas.

Los genitales externos de los varones XX están bien virilizados en 85% de los casos, y la mayoría consulta en la adolescencia o en la vida adulta por hipogonadismo, ginecomastia

y/o infertilidad. El 15% restante presenta genitales externos ambiguos por lo que pueden diagnosticarse en la infancia (de la Chapelle, 1981; Pérez-Palacios et al., 1994b).

Las gónadas existentes son testículos bilaterales disminuidos de tamaño al igual que el pene. Se observan grados variables de desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Los genitales internos son masculinos. Los testículos presentan disminución en el número y en el tamaño de los túbulos seminíferos, hiperplasia de células de Leydig y ausencia de espermatogénesis. El perfil hormonal es normal en la infancia con deterioro gonadal progresivo que conduce en adultos al desarrollo de un hipogonadismo hipergonadotrófico (de la Chapelle, 1981).

#### Citogenética.

Los primeros casos informados revelaron un complemento cromosómico 46,XX sin anomalías estructurales (de la Chapelle et al., 1964; Therkelsen, 1964). Sin embargo, existen reportes de anomalías en uno de los cromosomas X:

a) En 1974 Madan y Waker reportaron una banda adicional en Xp en un varón XX. El origen de esta banda no pudo ser identificado y el cariotipo se designó como 46,XXp+.

b) En 1979 Evans y cols., realizaron un estudio citogenético con bandas G, Q y R en 13 varones XX, encontrando un Xp heteromórfico en 9 pacientes. Los autores sugirieron la participación de un intercambio entre los cromosomas X y Y.

c) de la Chapelle y cols., en 1979, mostraron que no hay evidencia del fenómeno XXp+ en los varones XX y que además la presencia de XXp+ no es por sí misma evidencia de intercambio desigual entre el X y el Y durante la meiosis paterna.

#### **Etiología de hermafroditas verdaderos 46,XX y varones 46,XX**

Tres mecanismos han sido propuestos para explicar la diferenciación testicular en sujetos con cariotipo 46,XX: (1) mosaïcismo oculto con una línea celular con presencia de cromosoma Y; (2) translocación de material del cromosoma Y, que incluya el factor determinante testicular (*TDF*) del Y al X en la meiosis paterna y (3) una mutación autosómica que permita la determinación testicular en ausencia de *TDF* (Ferguson-Smith, 1991; Berkovitz et al., 1992a; Berkovitz, 1992b; Fechner et al., 1993).

Mosaïcismo oculto con una línea con cromosoma Y.- En este caso puede haber un mosaico con una línea con un cromosoma Y en muy bajo porcentaje, o una línea con cromosoma Y presente en la cresta genital al momento de la diferenciación testicular (Berkovitz, 1992b). Existen reportes de varones XX con mosaico 46,XX/47,XXY (Miró et al., 1978).

Translocación de material genético del cromosoma Y al X.- Este mecanismo fue propuesto por Ferguson-Smith en 1966 para

explicar la reversión sexual en individuos con cariotipo 46,XX. Durante la meiosis en el humano, el apareamiento entre los cromosomas X y Y se inicia en la región pseudoautosómica (Pearson y Bobrow, 1970; Simmler et al., 1985; Rappold, 1993), y posiblemente se extiende a todo el brazo corto del cromosoma Y, lo que predispone a un entrecruzamiento aberrante entre los cromosomas sexuales (Chandley et al., 1984), que da como resultado la translocación de un segmento de tamaño variable del cromosoma Y al X. Incluso se ha propuesto que la formación de la vesícula sexual durante la primera profase meiótica favorece la asociación de un fragmento de Yp con la región pseudoautosómica del cromosoma X (Stalvey et al., 1989). Estudios moleculares realizados hasta la fecha, en pacientes con diagnóstico de varón XX han confirmado esta hipótesis, ya que indican que 80% de ellos presentan secuencias derivadas del cromosoma Y de tamaño variable en su genoma (Guellaen et al., 1984; Page et al., 1985; Affara et al., 1986; Anderson et al., 1986; Vergnaud et al., 1986; Muller et al., 1987; Palmer et al., 1989; Schempp et al., 1989; Verga y Erickson, 1989; Abbas et al., 1990; Ferguson-Smith et al., 1990; Donlon et al., 1991; Pereira et al., 1991; Berkovitz et al., 1992a; Berkovitz, 1992b, McElreavey et al., 1992a; Numabe et al., 1992; Fechner et al., 1993). Esta hipótesis se apoya también en los pocos hermafroditas verdaderos que presentan secuencias derivadas del cromosoma Y en su genoma (Nakagome et al., 1991; McElreavey et al., 1992a).

Mutación autosómica.- En la mayoría de los hermafroditas verdaderos XX y en 20% de los varones XX no se encuentran secuencias del cromosoma Y (Abbas et al., 1990; Pereira et al., 1991; Kuhnle et al., 1993). Estudios familiares en donde coexisten sujetos con ambos padecimientos sugieren un modo de herencia autosómico, donde pueden estar implicados uno o más genes autosómicos que participen en la cascada de la diferenciación testicular y que presenten una mutación que les permita actuar en ausencia de *TDF* (Abbas et al., 1990; Pereira et al., 1991; McElreavey et al., 1993b; Kuhnle et al., 1993).

#### Reversión sexual en otras especies.

La reversión sexual XX, en la que existen sujetos con complemento cromosómico XX, testículos bilaterales y fenotipo masculino se ha reportado en varias especies de mamíferos además del humano, incluyendo al ratón, la cabra (Hamerton et al., 1969) y el perro (Selden et al., 1984; Mayers-Wallen y Patterson, 1988).

**Etiología de hermafroditas verdaderos 46,XX/46,XY.**

La etiología del hermafroditismo verdadero 46,XX/46,XY es diferente ya que está presente una línea celular con cromosoma Y. Este quimerismo pudo resultar de una doble fertilización o por un error mitótico postcigótico. La diferenciación testicular parcial puede ser ocasionada por el número relativo de células que contienen cromosoma Y, comparado con el número de células que no lo tienen, por una mutación en el gen *SRY* o por menor expresión de *SRY* en las etapas tempranas de diferenciación de la gónada (Berkovitz, 1992b).

## O B J E T I V O

El objetivo de este trabajo es identificar como factor condicionante en varones XX y hermafroditas verdaderos la presencia de un mosaico críptico con cromosoma Y o de secuencias del brazo corto del cromosoma Y en el genoma de estos pacientes.

### Objetivos particulares.

1.- Identificar secuencias específicas del centrómero del cromosoma Y para descartar la existencia de una línea celular con cromosoma Y en varones XX y hermafroditas verdaderos con cariotipo 46,XX.

2.- Reconocer la presencia de los genes ZFY y SRY en varones XX y en hermafroditas verdaderos 46,XX.

3.- Corroborar la presencia de secuencias del Y en los hermafroditas verdaderos 46,XX/46,XY.

4.- Caracterizar el genotipo en relación con el fenotipo en todos los casos.

## M A T E R I A L Y M E T O D O S

**Pacientes**

Se estudiaron 8 pacientes con diagnóstico comprobado de síndrome de varón XX y 10 con diagnóstico comprobado de hermafroditismo verdadero. Los 18 pacientes estudiados fueron de la población mexicana y no relacionados. Todos los casos fueron estudiados previamente clínica, citogenética, endocrinológica e histológicamente (Kofman-Alfaro et al, 1992; Méndez et al, 1994).

En la tabla I se muestran las características clínicas de los varones XX estudiados. Tres pacientes fueron diagnosticados en edad adulta por infertilidad (n=2) o ginecomastia (n=1), cinco pacientes fueron detectados en la infancia por ambigüedad genital. Todos los pacientes presentaban cariotipo 46,XX en las 50 células analizadas. Los datos endocrinológicos de los VXX se muestran en la tabla II, los pacientes adultos mostraron hipogonadismo hipergonadotrófico, mientras que los pacientes pediátricos presentaban concentraciones hormonales normales para su edad.



Tabla I. Características clínicas en los varones XX estudiados.

PACIENTE	EDAD AL INGRESO (Años)	SEXO DE ASIGNACION	GENITALES EXTERNOS	TESTICULOS (Volumen cc)		GINECOMASTIA
				DERECHO	IZQUIERDO	
1	3/12	M	Falo 3.2 cm Hipospadias peneana	1.8	2.1	-
2	16	M	Falo 7.5 cm	3.3	4.1	SI
3	35	M	Falo 9.2 cm	3.3	2.7	NO
4	6/12	M	Falo 1.5 cm Hipospadias perineo-escrotal	1.1	1.1	-
5	9/12	M	Falo 3.2 cm Hipospadias penoescrotal	2.7	2.7	-
6	9/12	M	Falo 3.5 cm Hipospadias subcoronal	1.0	1.3	-
7	25	M	Falo 6.5 cm	9.0	9.0	NO
8	6	M	Falo 4.5 cm Hipospadias penoescrotal	1.5	1.0	-

Tabla II. Concentraciones hormonales basales y respuesta máxima de testosterona al estímulo con HCG en los varones XX estudiados.

PACIENTE	LH(mU/ml)	FSH (mU/ml)	E2 (pg/ml)	T (ng/ml) basal	T (ng/ml) pos HCG
1	4.7	1.0	13.5	0.4	7.5
2	30.3	30.4	24.5	2.2	2.8
3	27.5	11.9	37.2	2.5	3.0
4	ND	ND	ND	0.5	2.8
5	1.3	0.7	20.8	0.1	1.0
6	0.2	ND	37.0	1.3	8.5
7	13.5	23.7	37.0	2.3	3.2
8	NC	NC	NC	NC	NC

Abreviaturas LH: Hormona Luteinizante, FSH: Hormona Foliculo Estimulante, E2: Estradiol, T: Testosterona, HCG: Gonadotropina Coriónica Humana, ND: No Detectable, NC: No Cuantificado.

En las tablas III y IV se muestran las características clínicas de los hermafroditas verdaderos estudiados. Todos los pacientes presentaban ambigüedad genital con diferentes grados de severidad. La gónada más frecuentemente encontrada fue el ovotestes, seguida por ovario y más raramente por testículo. El cariotipo en seis casos fue 46,XX, en tres 46,XX/46,XY y en uno 46,XX/47,XXY. Los estudios endocrinológicos de los HV se muestran en la tabla V. La síntesis y secreción de esteroides gonadales dependió tanto del tipo de gónada existente como de su grado de funcionalidad, así como de la edad del paciente.

Tabla III. Características clínicas de los hermafroditas verdaderos estudiados.

PACIENTE	EDAD AL INGRESO (Años)	SEXO DE ASIGNACION	GENITALES EXTERNOS	GINECOMASTIA
1	27	M	Falo 5.8 cm Labios escrotalizados	SI
2	10	M	Falo 3.1 cm Escroto bífido	-
3	10/12	F	Falo 3.5 cm Labios escrotalizados	-
4	11/12	F	Se practicó cirugía genital antes de ingreso	-
5	17	F	Falo 3.0 cm Labios escrotalizados	SI
6	4	M	Falo 2.8 cm Escroto bífido	-
7	2	M	Falo 2.8 cm Labios escrotalizados	-
8	2	M	Falo 2.0 cm Labios escrotalizados	-
9	1	F	Falo 3.0 cm Labios escrotalizados	-
10	16	M	Falo 3.5 cm Escroto bífido	SI

Tabla IV. Cariotipo y hallazgos histopatológicos en los hermafroditas verdaderos estudiados.

PACIENTE	CARIOTIPO (Porcentaje)	GONADAS		GENITALES INTERNOS		UTERO
		DERECHA	IZQUIERDA	DERECHOS	IZQUIERDOS	
1	46,XX (100)	ovario	ovotestes	trampa reminiscencia de wolffianos	trampa reminiscencia de wolffianos	SI
2	46,XX (100)	testículo	ovotestes	epidídimo	trampa epidídimo deferente	SI
3	46,XX (100)	ovotestes	ovotestes	trampa epidídimo	trampa epidídimo	SI
4	46,XX (100)	ovotestes	ovotestes	trampa	trampa	SI
5	46,XX (100)	ovario	testículo	trampa	epidídimo	SI
6	46,XX (100)	ovario	testículo	trampa	trampa	SI
7	46,XX/46,XY (75/25)	ovario	ovotestes	trampa	trampa	SI
8	46,XX/46,XY (68/32)	ovotestes	ovotestes	trampa epidídimo	trampa epidídimo	SI
9	46,XX/46,XY (23/77)	pendiente de cirugía		pendiente determinación		-
10	46,XX/47,XXY (72/28)	ovotestes	ovario	trampa	trampa	SI

Tabla V. Concentraciones hormonales basales y respuesta máxima de testosterona a la HCG en los hermafroditas verdaderos estudiados.

PACIENTE	LH(mUI/ml)	FSH (mUI/ml)	E2 (pg/ml)	T basal (ng/ml)	T pos HCG (ng/ml)
1	13.3	3.5	180.0	1.32	4.16
2	3.7	2.8	<13	0.36	0.73
3	1.1	0.6	<13	0.62	2.10
4	0.8	0.3	<13	0.03	1.54
5	NC	NC	NC	NC	NC
6	ND	ND	28.0	0.42	1.73
7	1.0	0.6	<13	0.20	0.45
8	1.5	1.5	<13	0.24	2.16
9	ND	ND	13.0	0.93	4.91
10	12.1	5.3	37.0	1.42	3.93

Abreviaturas LH: Hormona Luteinizante, FSH: Hormona Folículo Estimulante, E2: Estradiol, T: Testosterona, HCG: Gonadotropina Coriónica Humana, ND: No Detectable, NC: No Cuantificado.

### Estudios moleculares

#### Aislamiento de DNA.

El DNA genómico de los 18 pacientes así como de 10 controles femeninos y 10 masculinos normales fué obtenido de sangre mediante una técnica descrita anteriormente (Ausubel et al, 1987; Sambrook et al, 1989; Escobar y Zamora, 1992) con algunas

modificaciones. Se tomaron de 15 a 20 ml de sangre en tubos con EDTA como anticoagulante, los leucocitos se separaron por centrifugación y se lavaron con amortiguador de lisis de eritrocitos hasta obtener un botón blanco libre de eritrocitos, se agregó amortiguador lisis leucocitos y Proteinasa K a una concentración final de 200  $\mu\text{g/ml}$  y se dejó en incubación 18 a 20 hr a 42°C.

Posteriormente, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo 1:1 y una extracción con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se precipitó el DNA con etanol absoluto a -20°C y NaCl a una concentración final de 50 a 100 mM. El DNA se lavó en etanol al 70% y se disolvió en TE. Todas las muestras se almacenaron a 4°C.

Todas las muestras de DNA obtenidas se analizaron por espectrofotometría, mediante la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm de una dilución 1:100 de la muestra, calculando con ésta la relación 260/280 y la concentración de la muestra. La concentración de la muestra se calculó utilizando la siguiente fórmula:

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

$$\text{ya que } 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \text{ de DNA} = 1 \text{ D.O. } 260$$

Para conocer la calidad de la muestra se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

### Sondas moleculares.

La sonda pY97 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 (resistente a ampicilina) que hibrida con un fragmento del centrómero del cromosoma Y de 5.5 kb (Wolfe et al, 1985).

La sonda pDP1007 contiene un fragmento genómico de 1.3 kb derivado del cromosoma Y humano clonado en el sitio *HindIII* de pUC13 y detecta por hibridación DNA-DNA un fragmento de 3.5 kb en Yp11.3 que corresponde al gen *ZFY* (Page et al, 1987). Esta sonda hibrida en forma cruzada con el gen homólogo *ZFX* en Xp21.3 observándose una banda de 1.8 kb (Page et al, 1987). El marcador del plásmido es resistencia a ampicilina.

### Transformación bacteriana.

La transformación bacteriana se realizó por técnicas estándar (Ausubel et al, 1987; Sambrook et al, 1989). Utilizando células competentes por  $\text{CaCl}_2$  de la cepa *E. coli* JM101 (sensible a ampicilina y *lacZ*<sup>-</sup>). Los plásmidos que se utilizaron fueron pDP1007 y pY97, ambos confieren resistencia a ampicilina, como control positivo se utilizó pBR322 y un control negativo sin DNA. Se conservaron las bacterias transformadas.

#### Purificación de plásmido.

La purificación del plásmido se realizó por la técnica de lisozima (Sambrook et al, 1989), se cultivó la bacteria transformada en 100 ml de infusión cerebro corazón con ampicilina, se lisaron las bacterias en 4ml de: 8% Sacarosa, 0.5% triton X-100, EDTA 50 mM, Tris 50 mM(pH 8) y 0.4 ml de lisozima 10 mg/ml disuelta en Tris 25 mM y 250 µg de RNasa, se colocaron directo a la flama hasta ebullición, posteriormente un min. en re-ebullición a baño María, se colocaron en hielo, se centrifugaron y el sobrenadante se precipitó con 0.6 ml de isopropanol por cada ml de volumen, se centrifugó nuevamente y se resuspendió en TE. Se realizaron las extracciones, una con fenol y una con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La fase superior se precipitó con el doble de volumen de etanol y la mitad de volumen de acetato de amonio 3M. El DNA se lavó en etanol al 70%, se resuspendió en TE y se almacenó a 4°C.

#### Purificación del inserto.

La concentración del plásmido se valoró por electroforesis. Se digirieron 1-5 µg de plásmido con la enzima de restricción correspondiente. Para pDP1007 se utilizó *HindIII* y para pY97 *EcoRI*. La digestión se corrió en un gel de agarosa 0.8%, con un marcador de peso molecular y plásmido sin digerir como referencia. Se cortó la banda correspondiente al inserto. Para



PDP1007 el inserto mide 1.3 kb. Para pY97 el inserto mide 5.3 kb. El inserto se purificó por dos métodos, el kit Gene Clean siguiendo las instrucciones del fabricante y el método de congelación de agarosa en nitrógeno líquido, se separó el DNA por centrifugación, se realizó una extracción con fenol, una con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), precipitando con etanol, el inserto se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (Koenen, 1989).

#### Hibridación DNA-DNA.

Para la técnica de hibridación DNA-DNA se utilizó el DNA extraído a partir de sangre. En todos los casos se digirieron 10  $\mu\text{g}$  de DNA genómico con *EcoRI* (Boehringer Mannheim GmbH).

Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se incluyó fago lambda digerido con *HindIII* como marcador de peso molecular. El DNA fue desnaturalizado *in situ* colocando el gel en solución desnaturalizante en agitación moderada por una hora y una hora en solución neutralizante. Posteriormente fue transferido a una membrana de nitrocelulosa reforzada con nylon (Duralose UV, Stratagene o Hybond C-extra, Amersham) de acuerdo al procedimiento descrito por Southern en 1975.

La prehibridación y la hibridación se realizaron por técnicas estándar (Ausubel et al, 1987; Sambrook et al, 1989). La prehibridación para ambas sondas se realizó en un volumen de 75  $\mu\text{l}$  por  $\text{cm}^2$  de filtro y a una temperatura de  $42^{\circ}\text{C}$  por 18 h. La hibridación se realizó en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  por  $\text{cm}^2$ , por 18 h,

a una temperatura de 42°C para la sonda pDP1007 y de 48°C para la sonda pY97.

El marcaje de las sondas moleculares o insertos se realizó por hexanucleótidos al azar bajo las condiciones indicadas por el fabricante (Amersham, Aylesbury, England). Las condiciones finales de lavado fueron: 0.2XSSC/0.1%SDS/50°C. Los filtros se expusieron a película X-OMAT K (Kodak, Guadalajara, Jalisco) con pantalla intensificadora durante 5 días a -70°C.

#### Reacción en cadena de la polimerasa.

Se utilizaron cuatro pares de oligonucleótidos: el par Y1-Y2 para la región centromérica del cromosoma Y, el par TDF4-TDF5 para el gen ZFY y el par SRY1-SRY2 para el gen SRY.

El par Y1, Y2 flanquea un fragmento de 170 pb de secuencias alfoides repetidas de la región centromérica del cromosoma Y humano. Y1: 5'-ATG ATA GAA ACG GAA ATA TG-3'; Y2: 5'-AGT AGA ATG CAA AGG GCT CC-3'. La amplificación se realizó mediante 30 ciclos (94°C/1 min.; 55°C/1 min.; 72°C/1 min.) y un ciclo de extensión a 72°C durante 10 min. (Witt y Erickson, 1989; Witt y Erickson, 1991).

Para el gen ZFY se utilizó el par TDF4: 5'-ATG TGG ATG TCC ACA AAG GT-3' y TDF5: 5'-AAG CTT GTA GAC ACA CTG TT-3', que limita una región de 400 pb (Page et al, 1987), el programa de amplificación correspondiente es de 30 ciclos (94°C/1 min.; 60°C/1 min.; 72°C/1 min.) y un ciclo de extensión a 72°C durante

10 min..

También se amplificó una región de 609 pb del gen SRY utilizando el par de oligonucleótidos SRY1: 5'-CGA CAA TGC AAT CAT ATG C-3' y SRY2: 5'-TAG CGG TCC CGT TGC TGC-3'. El programa de amplificación utilizado fue: (95°C/1 min.; 50°C/1 min.; 72°C/1 min.) 33 ciclos y un ciclo de extensión a 72°C durante 10 min.. (Nakagome et al., 1991).

La amplificación se realizó en todos los casos a partir de 1 µg de DNA genómico. 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. Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio 0.0002% (Saiki, 1989; Erlich et al., 1992).

#### Preparación de reactivos y soluciones.

##### Amortiguador de lisis de eritrocitos.

Tris-HCl(pH 7.6)	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	10 mM

Mezclar y esterilizar por filtración.

##### Amortiguador de lisis de leucocitos.

Tris-HCl(pH 7.6)	10 mM
EDTA(pH 8.0)	10 mM
NaCl	50 mM

SDS	0.2 %
-----	-------

Mezclar y esterilizar por filtración.

Fenol equilibrado.

Fenol fundido	500.0 g
---------------	---------

8 hidroxiquinoleina

Tris(pH 8)	0.1 M
------------	-------

mezclar agitando vigorosamente, cubrir con papel aluminio, almacenar a 40C. Se forman dos fases, utilizar solamente la inferior.

Amortiguador TE.

Tris	10 mM
------	-------

EDTA(pH 8)	1 mM
------------	------

TBE 5X.

Tris	27.0g
------	-------

Acido Bórico	13.8g
--------------	-------

EDTA	2 mM
------	------

Aforar con agua destilada a 500 ml. Se utiliza en concentración 1X para preparar los geles de agarosa y correr la electroforesis

Amortiguador de digestión.

Tris-HCl(pH 7.6)	100 mM
------------------	--------

EDTA(pH 8.0)	10 mM
--------------	-------

NaCl	100 mM
------	--------

Mezclar y esterilizar por filtración.

Solución desnaturizante.

NaOH	0.5 M
------	-------

NaCl	1.5 M
------	-------

Solución neutralizante.

Tris (pH 7.4)	1.0 M
NaCl	1.5 M

SSC 20X.

NaCl	3.0 M
Citrato de Na	0.3 M

Ajustar el pH a 7.0.

Solución de Prehibridación-Hibridación.

Formamida	50.0 %
SSC	6.0 X
Denhart	5.0 X
SDS	0.5 %
DNA de salmón	100µg/µl

Solución básica para la reacción en cadena de la polimerasa(PCR).

Buffer (10X, 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5.0 µl
dATP (10 mM)	1.0 µl
dTTP (10 mM)	1.0 µl
dGTP (10 mM)	1.0 µl
dCTP (10 mM)	1.0 µl
Enzima Taq polimerasa (2.5 U/µl)	0.5 µl
Oligonucleótido 1 (50µM)	1.0 µl
Oligonucleótido 2 (50µM)	1.0 µl
DNA	1.0 µg

El volumen final de la reacción es de 50 µl.

## R E S U L T A D O S

En la tabla VI se resumen los resultados de los estudios moleculares en los 8 varones XX estudiados. Ninguno de los casos presentó positividad para la región centromérica del cromosoma Y con la sonda pY97 por hibridación DNA-DNA, ni con los oligonucleótidos específicos para centromero de Y (Y1-Y2) por PCR (Figuras 4 y 5, respectivamente). Al utilizar la sonda pDP1007 se reconoció que los casos 2, 4 y 7 son ZFY positivos, todos los casos muestran el gen ZFX, homólogo a ZFY en el cromosoma X (Xp21.3) (Figura 6). Estos datos se confirmaron utilizando PCR con oligonucleótidos específicos para ZFY (TDF4-TDF5) (Figura 7).

Los resultados de PCR con el par de oligonucleótidos SRV1-SRV2, específicos para una región de 609 pb de SRY, demostraron la presencia de este gen en 4 de los 8 varones XX (pacientes 2, 3, 4 y 7) (Figura 8).

En cuanto a los 6 hermafroditas verdaderos 46,XX los resultados se encuentran resumidos en la tabla VII. Utilizando la sonda pY97 y el par de oligonucleótidos Y1-Y2 específicos para la región centromérica del cromosoma Y se observó que ninguno de los HV 46,XX es positivo para esta región (Figuras 9 y 10).

La hibridación DNA-DNA con la sonda pDP1007 mostró que sólo el caso 1 es positivo para el gen ZFY. Todos los casos son positivos para el gen ZFX (Figura 11).

Tabla VI. Resultados del análisis molecular en los varones XX estudiados.

PACIENTE	HIBRIDACION DNA-DNA			Ycen	PCR	
	Y97	ZFY	ZFX		ZFY	SRY
1	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
3	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
4	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
5	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
8	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

En la figura 12 se muestran los resultados de PCR con los oligonucleótidos específicos para ZFY, confirmandose que sólo el paciente 1 es positivo para ZFY y los casos 2 al 6 son negativos.

Por técnica de PCR con el par de oligonucleótidos SRY1-SRY2 se demostró que sólo el paciente 1 es positivo para SRY (Figura 13).

Los resultados de los casos 7 al 10 se muestran en la tabla VIII. Los cuatro casos presentan mosaicismo 46,XX con una línea adicional con cromosoma Y. Se confirmó la presencia de Y utilizando la sonda pY97 (Figura 14) y por PCR con el par de oligonucleótidos Y1-Y2 (Figura 15). Los cuatro casos fueron positivos para los genes ZFY y ZFX utilizando la sonda pDP1007 (Figura 16), resultado que se confirmó por PCR con los oligonucleótidos específicos para ZFY (Figura 15).

Tabla VII. Resultados del análisis molecular en los hermafroditas verdaderos 46,XX estudiados.

PACIENTE	HIBRIDACION DNA-DNA			Ycen	PCR	
	Y97	ZFY	ZFX		ZFY	SRY
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
2	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

Los resultados de PCR con los oligonucleótidos específicos para SRY muestran que los casos 7 al 10 son positivos para SRY (Figura 16). Confirmándose la presencia de un cromosoma Y normal.

Tabla VIII. Resultados del análisis molecular en los hermafroditas verdaderos 46,XX/46,XY estudiados.

PACIENTE	HIBRIDACION DNA-DNA			Ycen	PCR	
	Y97	ZFY	ZFX		ZFY	SRY
7	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
9	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
10	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)



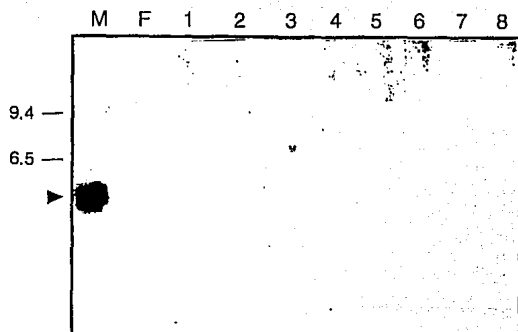


Figura 4. Hibridación DNA-DNA tipo Southern utilizando la sonda pY97. El carril M (control masculino) muestra una banda de 5.5 kb ( ▶ ) correspondiente a la región centromérica del cromosoma Y. Los carriles F (control femenino), y 1 al 8 (varones XX estudiados) no la muestran. Los números a la izquierda indican el peso molecular de fragmentos del fago lambda digerido con *HindIII*.

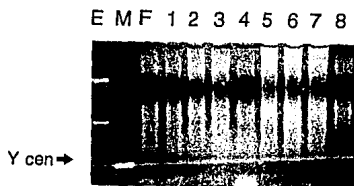


Figura 5. Reacción en cadena de la polimerasa. Amplificación de la región centromérica del cromosoma Y utilizando el par de oligonucleótidos Y1-Y2. El carril E es el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). El carril M (control masculino) muestra la banda de 170 pb correspondiente, los carriles F (control femenino) y 1 al 8 (varones XX estudiados) no la muestran.

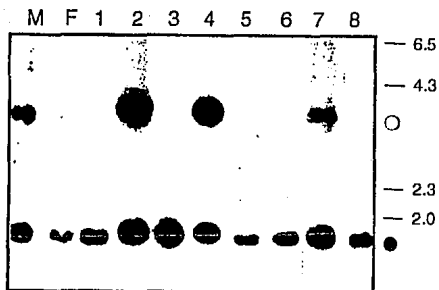


Figura 6. Hibridación DNA-DNA tipo Southern utilizando la sonda pDP1007. Carriles 1 al 8: varones XX estudiados. Los carriles M (control masculino), 2, 4 y 7 muestran una banda de 3.5 kb (○) correspondiente al gen ZFY. Los carriles F (control femenino), 1, 3, 5, 6 y 8 (varones no la muestran. Todos los carriles muestran la banda de 1.8 kb (●) correspondiente al gen ZFX. El marcador de peso molecular es fago lambda digerido con *Hind*III.

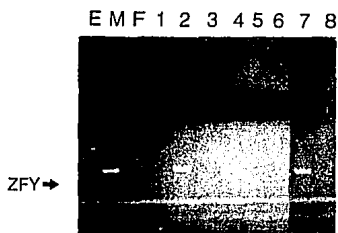


Figura 7. Reacción en cadena de la polimerasa. Amplificación del gen *ZFY* utilizando el par de oligonucleótidos TDF4-TDF5. Los varones XX estudiados se encuentran en los carriles 1 al 8. El carril E es el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Los carriles M (control masculino), 2, 4 y 7 muestran la banda de 400 pb correspondiente, los carriles F (control femenino), 1, 3, 5, 6 y 8 no la muestran.

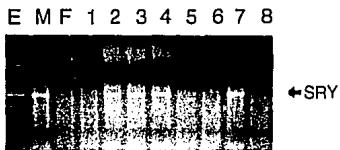


Figura 8: Reacción en cadena de la polimerasa. Amplificación del gen *SRY* utilizando el par de oligonucleótidos *SRV1-SRV2*. Carriles 1 al 8: varones XX estudiados. El carril E es el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Los carriles M (control masculino), 2, 3, 4 y 7 muestran la banda de 609 pb correspondiente, los carriles F (control femenino), 1, 5, 6 y 8 no la muestran.

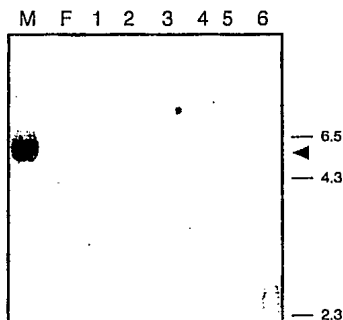


Figura 9. Hermafroditas verdaderos 46,XX estudiados mediante hibridación DNA-DNA tipo Southern utilizando la sonda pY97. Carriles 1 al 6: pacientes estudiados. El carril M (control masculino) muestra una banda de 5.5 kb (◄) correspondiente a la región centromérica del cromosoma Y. Los carriles F (control femenino), y 1 al 6 no la muestran. Los números a la derecha indican el peso molecular de fragmentos del fago lambda digerido con *HindIII*.

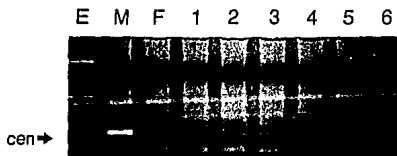


Figura 10. Reacción en cadena de la polimerasa. Amplificación de la región centromérica del cromosoma Y utilizando el par de oligonucleótidos Y1-Y2. El carril E es el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). El carril M (control masculino) muestra la banda de 170 pb correspondiente, los carriles F (control femenino) y 1 al 6 (hermafroditas verdaderos 46,XX) no la muestran.

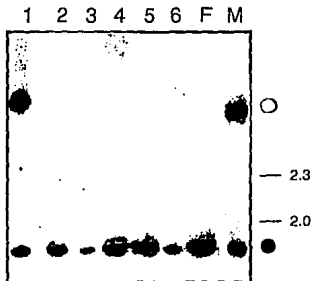


Figura 11. Hermafroditas verdaderos 46,XX (carriles 1 al 6) estudiados mediante hibridación DNA-DNA tipo Southern utilizando la sonda pDP1007. Los carriles M (control masculino) y 1 muestran una banda de 3.5 kb (○) correspondiente al gen ZFY. Los carriles F (control femenino) y 2 al 6 no la muestran. Todos los carriles muestran la banda de 1.8 kb (●) correspondiente al gen ZFX. El marcador de peso molecular es fago lambda digerido con *Hind*III.



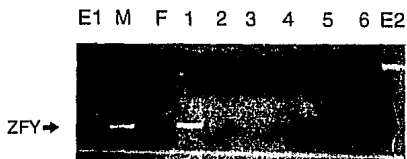


Figura 12. Reacción en cadena de la polimerasa. Amplificación del gen *ZFY* utilizando el par de oligonucleótidos TDF4-TDF5. Carriles 1 al 6: hermafroditas verdaderos 46,XX estudiados. El carril E1 es el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb), el carril E2 es la escalera de 123 pb. Los carriles M (control masculino) y 1 muestran la banda de 400 pb correspondiente a la región amplificada, los carriles F (control femenino) y 2 al 6 no la muestran.

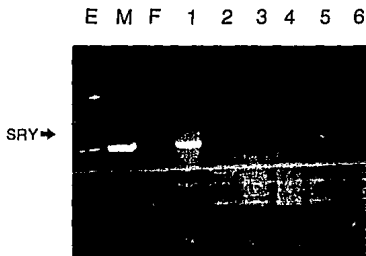


Figura 13. Reacción en cadena de la polimerasa. Amplificación del gen *SRY* utilizando el par de oligonucleótidos *SRY1-SRY2*. Carriles 1 al 6: hermafroditas verdaderos 46,XX estudiados. El carril E es el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Los carriles M (control masculino) y 1 muestran la banda de 609 pb correspondiente, los carriles F (control femenino) y 2 al 6 no la muestran.

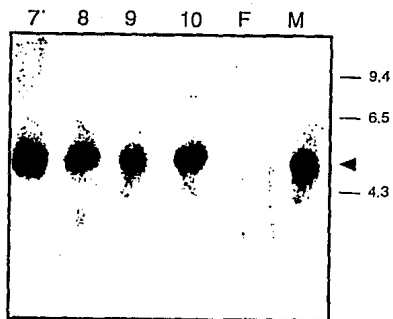


Figura 14. Pacientes con hermafroditismo verdadero, con una línea celular con cromosoma Y (carriles 7 al 10) estudiados por hibridación DNA-DNA tipo Southern utilizando la sonda pY97. Los carriles M (control masculino) y 7 al 10 muestran una banda de 5.5 kb ( ◄ ) correspondiente a la región centromérica del cromosoma Y. El carril F (control femenino), no la muestra. El marcador de peso molecular es fago lambda digerido con *HindIII*.

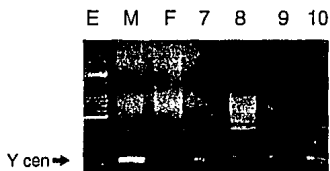


Figura 15. Amplificación de la región centromérica del cromosoma Y mediante PCR utilizando el par de oligonucleótidos Y1-Y2. Carriles 7 al 10: hermafroditas verdaderos, con una línea celular con cromosoma Y, estudiados. El carril E es el marcador de peso molecular (escalera de 100pb). Los carriles M (control masculino) y 7 al 10 muestran la banda de 170 pb correspondiente a la región amplificada. El carril F (control femenino) no la muestra.

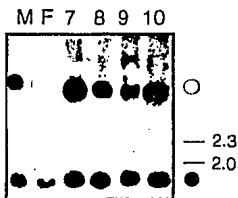


Figura 16. Hibridación DNA-DNA tipo Southern utilizando la sonda pDP1007. Los carriles M (control masculino) y 7 al 10 muestran una banda de 3.5 kb (○) correspondiente al gen *ZFY*. El carril F (control femenino), no la muestra. Todos los carriles muestran la banda de 1.8 kb (●) correspondiente al gen *ZFX*. El marcador de peso molecular es fago lambda digerido con *HindIII*.

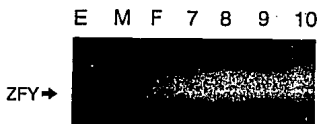


Figura 17. Reacción en cadena de la polimerasa. Amplificación del gen *ZFY* utilizando el par de oligonucleótidos TDF4-TDF5. Carriles 7 al 10: hermafroditas verdaderos estudiados. El carril E es el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Los carriles M (control masculino) y 7 al 10 muestran la banda de 400 pb correspondiente a la región amplificada, el carril F (control femenino) no la muestra.

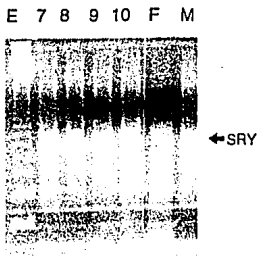


Figura 18. Reacción en cadena de la polimerasa. Amplificación del gen *SRY* utilizando el par de oligonucleótidos *SRY1-SRY2*. Carriles 7 al 10: hermafroditas verdaderos estudiados. El carril E es el marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). Los carriles M (control masculino) y 7 al 10 muestran la banda de 609 pb correspondiente, el carril F (control femenino) no la muestra.

## DISCUSION

El síndrome del Varón XX fue descrito en 1964 y se caracteriza por presentar cariotipo 46,XX y fenotipo masculino (de la Chapelle et al., 1964; Therkelsen, 1964). Las gónadas son testículos bilaterales, los genitales internos son masculinos y se observan grados variables de desarrollo de caracteres sexuales secundarios. El perfil hormonal es normal en la infancia con deterioro gonadal progresivo que conduce en adultos a hipogonadismo hipergonadotrófico (de la Chapelle, 1981).

El estudio de los 8 pacientes con síndrome de varón XX, mostró tres adultos y cinco prepúberes. En todos los sujetos estudiados comprobamos el diagnóstico de síndrome de varón XX clínica, radiológica y endocrinológicamente. En nuestro grupo de varones XX el número de pacientes con genitales normales es menor a lo reportado en la literatura, probablemente porque los varones adultos infértiles en nuestra población no acuden a consulta o no son referidos para estudio citogenético.

Para explicar la diferenciación testicular en los varones XX se han propuesto tres hipótesis:

1) mosaicismo oculto con una línea celular con cromosoma Y (Miró et al., 1978);

2) intercambio desigual entre los cromosomas X y Y durante la meiosis paterna con la consecuente translocación de material genético de Y al X (Therkelsen, 1964; Ferguson-Smith, 1966) y



3) mutaciones en genes en el cromosoma X o en autosomas que permitan la diferenciación testicular en ausencia de *TDF*. (Petit et al., 1987; Berkovitz, 1992b; Fechner et al., 1993).

El primer mecanismo propone la existencia de una línea celular con cromosoma Y. En los 8 casos que estudiamos, el cariotipo fue 46,XX en 50 células analizadas sin evidencia citogenética de un cromosoma Y. Este dato fue confirmado mediante técnicas moleculares, en las que ninguno de los sujetos presentó secuencias centroméricas del cromosoma Y por hibridación DNA-DNA utilizando la sonda Y97, ni por PCR utilizando el par de oligonucleótidos Y1-Y2. Estos hallazgos eliminan en estos casos la posibilidad de mosaico críptico en el tejido estudiado.

La presencia de secuencias de *Yp* en cuatro de nuestros varones XX (50%) apoya la segunda hipótesis.

En tres pacientes (casos 2, 4 y 7) el segmento de *Yp* incluye los genes *ZFY* y *SRY*. En cambio, el paciente 3 sólo muestra el gen *SRY*, proponiéndose que en este caso el segmento del cromosoma Y translocado es más pequeño, pero incluye *TDF*. Se ha propuesto que la sola presencia de *SRY* es insuficiente para el desarrollo adecuado de genitales externos. En la literatura han sido descritos algunos casos de varones XX *ZFY*- *SRY*+ donde se presenta criptorquidia uni o bilateral (Palmer et al., 1989; Fukutani et al., 1992; BoucekKine et al., 1992; McElreavey et al., 1993b). Sin embargo, el varón XX 3 presenta un fenotipo masculino sin anomalías genitales, esto podría deberse a la expresión de un segundo gen ligado al Y, cercano a *SRY* que se exprese fuera del testículo (Bogan y Page, 1994).

En los pacientes 1, 5, 6 y 8 no se encontraron secuencias derivadas del cromosoma Y. Estos casos podrían corresponder a una mutación autosómica o ligada al cromosoma X en alguno de los genes que participan en la cascada de la diferenciación testicular, permitiendo el desarrollo de esta gónada en ausencia de *TDF*, tal como lo propone la tercera hipótesis.

Diferentes reportes señalan que en presencia de secuencias derivadas del cromosoma Y, los varones XX presentan genitales normales, por el contrario la mayoría de los varones XX con ambigüedad genital son Y negativos (Affara et al., 1986; Ferguson-Smith et al., 1990; Ferguson-Smith, 1991; Pereira et al., 1991; Berkovitz, 1992b; Numabe et al., 1992; Fechner et al., 1993).

Los pacientes adultos 2, 3 y 7, que acudieron a consulta por infertilidad y/o ginecomastia presentan secuencias derivadas de *Yp*, en cambio los casos pediátricos con ambigüedad genital (1, 5, 6 y 8), no muestran secuencias derivadas del Y. Estos datos coinciden con lo reportado en la literatura. No obstante uno de nuestros pacientes con ambigüedad genital (caso 4) presenta secuencias derivadas del cromosoma Y (*ZFY+*, *SRY+*), sugiriendo que en este caso la expresión de *SRY* esta alterada por la posición del gen en el cromosoma X o por inactivación preferencial del X que posee las secuencias del Y.

Se puede concluir que este padecimiento es genéticamente heterogéneo dividiéndose en dos grupos bien definidos. El primero que incluye a aquellos varones XX que presentan genitales normales y secuencias derivadas del cromosoma Y. El segundo

grupo, que incluye a pacientes con genitales ambiguos, sería similar a los hermafroditas verdaderos 46,XX que en su mayoría carecen de secuencias derivadas del Y (Ferguson-Smith, 1991; Numabe et al., 1992; Fechner et al., 1993).

Aún cuando la mayoría de los pacientes con síndrome de varón XX son esporádicos, se han informado familias con varios miembros afectados (de la Chapelle et al., 1977) o coexistiendo con hermafroditas verdaderos (Berger et al., 1970; Skordis et al., 1987). Los estudios moleculares en estas familias revelaron ausencia de secuencias del cromosoma Y, lo que sugiere una etiología común para ambos padecimientos. Estos podrían ser manifestaciones alternativas de un mismo defecto genético, probablemente una mutación en un gen autosómico o ligado al cromosoma X que participe en la cascada de la diferenciación sexual y que permita la diferenciación testicular en ausencia de *TDF*. (Waibel et al., 1987; Ramsay et al., 1988; Abbas et al., 1990; Pereira et al., 1991; Kuhnle et al., 1993).

Se definen como hermafroditas verdaderos a aquellos individuos que poseen tejido ovárico y testicular, ya sea en gónadas separadas o formando ovotestes (Klebs, 1876). Los genitales internos y externos, así como la función endócrina dependen del tipo de gónada presente, la funcionalidad de la misma y la edad del paciente (van Niekerk, 1976), el cariotipo en la mayoría de los casos es 46,XX (van Niekerk, 1976; Kofman-Alfaro et al., 1992). El padecimiento es generalmente esporádico, aunque existen algunos casos familiares (Armendares et al., 1975; van Niekerk, 1976; Ramsay et al., 1988) o coexistiendo con

varones XX (Berger et al., 1970; Skordis et al., 1987).

De los 6 casos con HV 46,XX estudiados, 5 acudieron a consulta por anomalías genitales con diferente grado de severidad. Sólo el paciente 1, con menor grado de ambigüedad y sexo de asignación masculino, consultó por ginecomastia y hematuria cíclica. En todos los sujetos estudiados se comprobó el diagnóstico de hermafroditismo verdadero tanto clínica como endocrinológicamente. En los 6 casos de HV 46,XX no hubo evidencia citogenética de presencia de una línea celular con cromosoma Y, en las 50 células analizadas. Esto fue confirmado por la negatividad para la región centromérica del cromosoma Y por hibridación DNA-DNA con la sonda Y97 y por PCR con oligonucleótidos específicos, lo que descartó en estos casos la hipótesis del mosaicismo críptico.

Los resultados de la hibridación DNA-DNA con la sonda pDF1007 mostraron que cinco HV 46,XX fueron ZFY negativos, corroborándose este hallazgo por PCR con oligonucleótidos específicos para ZFY. Sólo el caso 1 presentó positividad para ZFY. El análisis por PCR específico para SRY demostró que cinco casos son SRY negativos y sólo el caso 1 es SRY+. Esto probablemente es debido a un intercambio desigual entre X y Y durante la meiosis paterna, como lo propone una de las hipótesis que explica este padecimiento. Para este caso (ZFY+, SRY+) con ovario y ovotestes, podemos postular varias hipótesis para explicar la diferenciación testicular incompleta: a) rearreglos o mutación en el gen SRY ocurridos durante la translocación o disminución de la expresión del SRY debido a las secuencias

flanqueadoras en el sitio de la translocación. b) ausencia de otras secuencias, además de *SRY*, necesarias para la determinación testicular. c) anomalías en el tiempo o la extensión de la inactivación del cromosoma X (Berkovitz et al., 1992a).

Para explicar la diferenciación ovárica en el caso 1 podría postularse que la expresión de *SRY* es más tardía que en individuos normales. Esto conduciría a insensibilidad de la gónada primitiva al producto de *SRY*, activando los genes responsables de la diferenciación ovárica (Berkovitz, 1992b).

Estudios preliminares en DNA obtenido de tejido gonadal embebido en parafina mostraron en el paciente 1 la presencia de los genes *ZFY* y *SRY* en la porción testicular del ovotestes estudiada, corroborando los datos obtenidos en DNA obtenido de leucocitos. Se han estudiado también las dos gónadas de los casos 5 y 6 por PCR con oligonucleótidos específicos para la región centromérica del cromosoma Y, demostrándose la ausencia de estas secuencias y descartando la posibilidad de un mosaico críptico en este tejido (Avila, 1993).

Los estudios moleculares en los hermafroditas verdaderos muestran que la mayoría carece de secuencias derivadas del cromosoma Y (Waibel et al., 1987; Ramsay et al., 1988; Nakagone et al., 1991; Berkovitz et al., 1992a; McElreavey et al., 1992a). Nuestros datos coinciden con los reportados en la literatura donde la mayoría de los HV 46,XX carecen de secuencias derivadas del cromosoma Y. Podemos concluir que también el HV 46,XX es un padecimiento heterogéneo. Aún cuando la presencia de secuencias del Y es rara, la mayoría de los casos representan mutaciones en

un gen autosómico o ligado al X que permiten la diferenciación testicular en ausencia de *TDF* (Nakagone et al., 1991; Berkovitz et al., 1992a; Berkovitz, 1992b).

Comparando el tipo de gónada, y el fenotipo con la ausencia o presencia de secuencias del cromosoma Y se observa que en los HV 46,XX no hay relación alguna entre el fenotipo y la presencia o no de secuencias de Yp.

En el hermafroditismo verdadero 46,XX/46,XY el quimerismo pudo resultar de una doble fertilización o por un error mitótico postcigótico. La diferenciación testicular parcial puede ser ocasionada por el número relativo de células que contienen cromosoma Y, comparado con el número de células que no lo tienen, por una mutación en el gen *SRY* o por menor expresión de *SRY* en las etapas tempranas de diferenciación de la gónada (Berkovitz, 1992b). Los tres pacientes HV 46,XX/46,XY y el paciente HV 46,XX/47,XXY acudieron a consulta por ambigüedad genital. Los estudios citogenéticos realizados en estos pacientes mostraron que no existe relación entre el tipo de gónada presente y el porcentaje de células con cromosoma Y, ya que la gónada más frecuentemente encontrada fue el ovotestes. No hay una relación entre el sexo de asignación y el porcentaje de células con cromosoma Y, como se puede observar en la tabla IV. El caso 9 con mayor porcentaje de células con cromosoma Y (77%) tiene sexo de asignación femenino, mientras que los pacientes 7, 8 y 10 con sexo de asignación masculino presentan un menor porcentaje de células con cromosoma Y. Los estudios endocrinológicos mostraron que la producción hormonal depende del tipo de gónada presente y

la edad del paciente. El único paciente postpúber (caso 10) mostró concentraciones elevadas de estradiol indicando la funcionalidad del ovario y niveles bajos de testosterona antes y después de la estimulación con gonadotropina coriónica humana (Kofman-Alfaro et al., 1992).

Los estudios moleculares en los casos 7 al 10 mostraron presencia de secuencias centroméricas del cromosoma Y y de los genes *ZFY* y *SRY*, corroborando la presencia de un cromosoma Y normal. Es importante secuenciar en estos pacientes el gen *SRY* para tratar de identificar mutaciones que pudieran estar ocasionando la diferenciación testicular parcial (Braun et al., 1993).

## C O N C L U S I O N E S

1.- De los 8 varones XX estudiados 50% presentó secuencias derivadas del cromosoma Y. Este hallazgo apoya la hipótesis que propone un intercambio desigual en la meiosis paterna entre los cromosomas X y Y como la causa de presentar desarrollo testicular, en presencia de cariotipo 46,XX.

2.- De los varones XX, el caso 3 (ZFY-, SRY+) presenta una reversión sexual completa sin anomalías genitales. Este paciente parecería corresponder a los pocos varones XX descritos en la literatura donde la sola presencia del gen SRY es suficiente para una virilización adecuada.

3.- El varón XX 4, que presenta ambigüedad genital y es ZFY+ y SRY+, constituye una excepción a la mayoría de los reportes en la literatura donde los varones XX con secuencias derivadas del cromosoma Y no presentan ambigüedad genital.

4.- Los varones XX que no presentan secuencias derivadas del Y y tienen ambigüedad genital están relacionados con los hermafroditas verdaderos XX con ambigüedad genital que tampoco presentan secuencias del Y. Estas podrían ser manifestaciones alternativas de un mismo defecto genético, una alteración en un gen o genes autosómico o ligado al cromosoma X que permita la diferenciación testicular en ausencia de TDF.



5.- De los 6 hermafroditas verdaderos 46,XX sólo un caso presentó secuencias derivadas de Yp, que pudieran explicar la diferenciación testicular en este caso, probablemente por un intercambio desigual entre los cromosomas X y Y durante la meiosis paterna.

6.- Los hermafroditas verdaderos 2 al 6 no presentaron secuencias derivadas del Y. En estos casos el defecto puede localizarse en un gen ligado al X o autosómico que participe en la cascada de la diferenciación testicular que permita la diferenciación del testículo en ausencia de TDF.

7.- Los resultados obtenidos en los HV 46,XX coinciden con lo reportado en la literatura, donde la minoría de los HV 46,XX presenta secuencias derivadas del cromosoma Y.

8.- Los hermafroditas verdaderos 46,XX/46,XY mostraron un cromosoma Y aparentemente normal. En este caso el desarrollo de la gónada puede depender de la función de SRY o de la cantidad relativa de células con cromosomas Y presentes.

9.- El síndrome de varón XX y el hermafroditismo verdadero son padecimientos genéticamente heterogéneos.

10.- La diferenciación sexual en el humano es un proceso aún no totalmente dilucidado. La identificación del gen *SRY* como *TDF* constituye sólo un paso en este mecanismo, faltando la detección de genes ligados al X o autosómicos que participen antes o después de *SRY* en la cascada que conduce al fenotipo masculino.

## B I B L I O G R A F I A

Abbas N, Toublanc J, Boucekine 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.

Affara NA, Ferguson-Smith MA, Tolmie J, Kwok K, Mitchell M, Jamieson D, Cooke A, Florentin L. (1986) Variable transfer of Y-specific sequences in XX males. *Nucleic Acid Res* 14: 5357-5387.

Affara NA, Cham I J, 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.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff K, Roberts K, Watson JD. (1989) *Molecular Biology of the Cell*. 2a. ed. Garland Publishing Inc. Nueva York. 1219.

Alvarez-Buylla A, Merchant-Larios H. (1986) Mouse primordial germ cells use fibronectin as substrate for migration. *Exp Cell Res* 165: 362-368.

Anderson M, Page DC, de la Chapelle A. (1986) Chromosome Y-specific DNA is transferred to the short arm of X chromosome in human XX males. *Science* 233: 786-788.

Armendares S, Salamanca F, Cantu JM, del Castillo V, Nava S, Domínguez E, Cortes-Gallegos V, Gallegos A, Cervantes C, Parra A. (1975) Familial true hermaphroditism in three siblings. *Hum Genet* 29: 99-109.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1987) *Current protocols in molecular biology*. Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School..

Avila E. (1993) Amplificación enzimática de regiones específicas del cromosoma Y en DNA extraído de tejido gonadal embebido en parafina de pacientes con alteraciones de la diferenciación sexual. En *Memorias del XVIII Congreso Nacional de Genética Humana*. Noviembre 1993. Tlaxcala, Tlax.

Balinsky BI. (1978) *Introducción a la embriología*. Ed Omega Barcelona. 423-440.

Becak W, Becak H, Nazareth H, Ohno S. (1964) Close karyological kinship between the reptilian suborder serpentes and the class aves. *Chromosoma* 15: 606-617.

Berger R, Abonyi D, Nodot A, Vialatte J, Lejeune J. (1970) Hermaphroditisme vrai et "Garçon XX" dans une fratrie. Rev Eur Stud Clin Biol 15: 330-333.

Berkovitz GD, Fechner PY, Marcantonio SM, Bland G, Stettent G, Goodfellow PN, Smith KD, Migeon C. (1992a) The role of sex-determining region of the Y-chromosome (*SRY*) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. Hum Genet 88: 411-416.

Berkovitz GD. (1992b) Abnormalities of gonadal determination and differentiation. Seminars in Perinatology 16: 289-298.

Bertha P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths B, Goodfellow PN, Fellous M. (1990) Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. Nature 348: 448-450.

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.

Billingham RE, Silvers WK. (1960) Studies on tolerance of the Y chromosome antigen in mice. J Immunol 85: 14-26.

Bogan JS, Page DC. (1994) Ovary? testis?- A mammalian dilemma. Cell 76: 603-607.

Boucekkine C, Toublanc J E, Abbas N, Semrouni M, Vilain E, McElreavey K, Mugneret F, Fellous M. (1992) The sole presence of the testis-determining region of the Y chromosome (*SRY*) in 46,XX patients is associated with phenotypic variability. Horm Res 37: 236-240.

Braun A, Kammerer S, Cleve H, Lohrs U, Schwarz HP, Kunhle U. (1993) True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male gonadal sex-determining locus (*SRY*): Molecular genetics and histological findings in a sporadic case. Am J Hum Genet 52: 578-585.

Bull J, Vogt R. (1979) Temperature-dependent sex determination in turtles. Science 206: 1186-1188.

Bull J. (1980) Sex determination in reptiles. Quart Rev Biol 55: 3-21.

Chandley AC, Goetz P, Hargreave TB, Joseph AM, Speed RM. (1984) On the nature and extent of XY pairing at meiotic prophase in man. Cytogenet Cell Genet 38: 241-247.

Charlesworth B. (1991) The evolution of sex chromosomes. Science 251: 1030-1033.

Cleveland LR. (1947) The origin and evolution of meiosis. Science 105: 287-288.

Cline TW. (1993) The *Drosophila* sex determination signal: how do flies count to two? *Trends Genet* 9: 385-390.

Crews D. (1994) Animal sexuality. *Sci Am* 270: 96-103.

Cuevas-Covarrubias S, Kofman-Alfaro S. (1990) El cromosoma Y humano. *Rev Invest Clin (Mex)* 42: 290-297.

de la Chapelle A, Hortling H, Niemi M, Wennstrom J. (1964) XX sex chromosomes in a human male. First case. *Acta Med Scan. (Suppl)* 412: 25-38.

de la Chapelle A. (1972) Nature and origin of males with XX sex chromosomes. *Am J Hum Genet* 24: 71-105.

de la Chapelle A, Schroder J, Murros J, Tallqvist G. (1977) Two XX males in one family and additional observations bearing on the etiology of XX males. *Clin Genet* 11: 91-106.

de la Chapelle A, Simola K, Simola P, Knutila S, Gahnberg N, Pajunen L, Lundquist C, Sarna S, Murros J. (1979) Heteromorphic X chromosomes in 46,XX males?. *Hum Genet* 49: 157-167.

de la Chapelle A. (1981) The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* 58: 105-116.

de la Chapelle A., Tippet P, Wetterstrad T., Page D. (1984) Genetic evidence of X-Y interchange in a human XX male. *Nature* 307: 170-171.

de la Chapelle A. (1987) The Y-chromosomal and autosomal testis-determining genes. *Development (Suppl)* 101: 33-38.

Donlon TA, Muller U. (1991) Deletion mapping of DNA segments from the Y chromosome long arm and their analysis in an XX male. *Genomics* 10: 51-55.

Ellis N. (1991) The human Y chromosome. *Seminars in Developmental Biology* 2: 231-240.

Erich HA, Arnheim N. (1992) Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Ann Rev Genet* 26: 479-506.

Escobar LM, Zamora A. (1992) Elaboración de un banco de DNA de pacientes con anomalías de la diferenciación sexual. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, UNAM. 101.

Evans HJ, Buckton KE, Spowart G, Carothers AD. (1979) Heteromorphic X chromosomes in XX males: evidence for the involvement of X-Y interchange. *Hum Genet* 49: 11-31.

Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Migeon C, Smith K, Berkovitz G, Amrhein J, Bard P, Lee P, Reid CH, Tsalikian E, Urban M (1993) The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 690-695.

Ferguson-Smith M. (1966) X-Y chromosomal interchange in the etiology of the true hermaphroditism and the XX Klinefelter's Syndrome. *Lancet* 2: 475-476.

Ferguson-Smith M A, Cooke A, Affara N A, Boyd E, Tolmie J L. (1990) Genotype-phenotype correlations in XX males and the bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet* 84: 198-202.

Ferguson-Smith MA. (1991) Genotype-phenotype correlations in individuals with disorders of sex determination and development including Turner's syndrome. *Developmental Biology* 2: 265-76.

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.

Fishelson L. (1970) Protogynous sex reversal in the fish *Anthias squamipinnis* (Telostei, Anthiidae) regulated by the presence or absence of male fish. *Nature* 227: 90-92.

Foster JW, Brennen FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH. (1992) Evolution of sex determination and Y chromosome: SRY related sequences in marsupials. *Nature* 359: 531-533.

Fukutani K, Kajiwara T, Nagafuchi S, Nakahori Y, Nakagome Y (1993) Detection of the testis-determining factor in an XX male. *J Urol* 149: 126-28.

Gallegos AJ, Guizar E, Armendares S, Cortés Gallegos V, Cervantes C, Bedolla N, Parra A. (1976) Familial true hermaphroditism in three sibilgs: plasma hormonal profile and *in vitro* steroid biosynthesis in gonadal structures. *J Clin Endocrinol Metab* 42: 653-660.

Gardner EJ. (1975) Cell mechanics, sex determination and differentiation. En *Principles of Genetics*. Gardner EJ ed. John Wiley and Sons Co. New York. 95-140.

Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110: 521-528.

Goodfellow PN, Lovell-Badge R. (1993) SRY and sex determination in mammals. *Ann Rev Genet* 27: 71-92.

Grumbach M, Conte F, (1981) Disorders of sex differentiation. In Williams RH ed. *Text book of Endocrinology*. WB Saunders Co. Philadelphia 423-514.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsternberg A, Vivian N, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.

Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow P. (1992) Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7953-7957.

Guellaen G, Casanova M, Bishop C, Geldwerth D, Andre G, Fellous M, Weissenbach J. (1984) Human XX males with Y-single copy DNA fragments. *Nature* 307: 172-173.

Hamerton JL, Dickson JM, Pollard CE, Grieves SA, Short RV. (1969) Genetic intersexuality in goats. *J Reprod Fert Suppl* 28: 205-216.

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.

Hawkins J R, Taylor A, Berta P. (1992) Mutation analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet* 88: 471-474.

Hinman F. (1935) The principles and practice of urology. Sanders. Philadelphia.

Hodgkin J. (1990) Sex determination compared in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *Nature* 344: 721-728.

Hodgkin J. (1992) Genetic sex determination mechanisms and evolution. *Bio Essays* 14: 253-261.

Ippen-Ihler KA, Minkley EG. (1986) The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Ann Rev Genet* 20: 593-624.

Jager 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.

Jones HW, Scott WW. (1958) Hermaphroditism verus. In Hermaphroditism, genital anomalies and related endocrine disorders. Williams and Wilkins. Baltimore. 91-136.

Josso N, Vigier B, Magre S, Picard JY. (1991) Anti-Müllerian hormone and gonadal development. *Seminars in Developmental Biology* 2: 285-291.

Josso N. (1992) Hormone regulation of sexual differentiation. *Seminars in Perinatology* 16: 279-288.

Jost A. (1953) Problems of fetal endocrinology. The gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 8: 379-387.

Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP. (1973) Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* 29: 1-41.

Kiel-Metzger K, Warren G, Wilson G, 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.

Klebs E. (1876) *Handbuch der pathologischen anatomie*. Hirschwald. Berlin.

Kobel HR. (1962) Hetrochromosomen bei *Vipera berus* L. (*Viperidae, Serpentes*) *Experientia* 18: 173-174.

Kofman Alfaro S, Merchant-Larios H y Pérez Palacios G. (1982) Diferenciación sexual. I Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Invest Clin (Mex)* 34: 349-359.

Kofman Alfaro S, Mutchinick O, Valdes E y Pérez Palacios G. (1984) Diferenciación sexual. II Anomalías de los cromosomas sexuales y alteraciones de la diferenciación gonadal. *Rev Invest Clin (Mex)* 36: 53-70.

Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Pérez-Palacios G. (1992) Estudios citogenéticos, endocrinológicos e histológicos en hermafroditas verdaderos. *Rev Inv Clin (Mex)* 44: 229-234.

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.

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.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351: 117-121.

Kuhn JM, Cleret JM, Lavoinnie A, Lanolot MH, Emet J, Wolf LW. (1985) True hermaphroditism: from female to male endocrine status. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 196-199.

Kuhnle U, Schwarz HP, Löhrs U, Stengel-Ruthkowski S, Cleve H, Braun A. (1993) Familial true hermaphroditism: paternal and maternal transmission of true hermaphroditism (46,XX) and XX maleness in the absence of Y-chromosomal sequences. *Hum Genet* 92: 571-576.

Lewin B. (1994) *Genes*. Oxford University Press, Oxford, 1272



Lovell-Badge R. (1992) Testis determination: soft talk and kinky sex. *Current Opinion in Genetics and Development* 2: 596-601.

Lucchini JC. (1994) The evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Bio Essays* 16: 81-83.

Madan K, Walker S. (1974) Possible evidence of Xp+ in a XX male. *Lancet* 1: 1223.

Margulis L, Sagan D. (1985) El origen de las células eucariontes. *Mundo Científico* 5: 366-374.

Margulis L. (1986) La evolución del sexo. En Margulis L. El origen de la célula. Ed Reverté. Barcelona. 99-114.

Mayers-Wallen V, Patterson DF. (1988) XX sex reversal in the american cocker spaniel dog: phenotypic expression and inheritance. *Hum Genet* 80: 23-30.

McElreavey K, Rappaport R, Vilain E, Abbas N, Richaud F, Lortat-Jacob S, Berger R, Le Coniat M, Boucekkine C, Kucheria K, Tamtamy S, Nihoul-Fekete C, Brauner R, Fellous M. (1992a) A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequences including SRY. *Hum Genet* 90: 121-125.

McElreavey K, Vilain E, Abbas NA, Costa JM, Souleyreau N, Kucheria K, Boucekkine C, Thibaud E, Brauner R, Flamant F, Fellous M. (1992b) XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11016-11020.

McElreavey K, Vilain E, Cotinot C, Payen E, Fellous M. (1993a) Control of sex determination in animals. *Eur J Biochem* 278: 769-783.

McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. (1993b) A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3368-3372.

McIntosh K. (1985) Mitosis. *Science* 2.

McKay DG. (1953) Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rev* 117: 201.

McLaren A. (1988) Sex determination in mammals. *Trends Genet* 4: 153-157.

McLaren A. (1991a) The making of male mice. *Nature* 351: 96.

McLaren A. (1991b) Development of the mammalian gonad: the fate of supporting cell lineage. *Bio Essays* 13: 151-156.

Méndez JP, Kofman-Alfaro S, Canto P, Tlaiye Z, Diaz L, Reyes E, Ulloa-Aguirre A, Pérez-Palacios G. (1994) Síndrome de reversión sexual en el humano. Estudios en 9 pacientes con síndrome de varón XX. Enviado para publicación.

Merchant-Larios H, Taketo T. (1991) Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Electron Microscop Tech* 19: 158-171.

Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M. (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 37: 407-415.

Miró R, Caballin MR, Marsini S, Egozcue J. (1978) Mosaicism in XX males. *Hum Genet* 45: 103-106.

Muller U, Donlon T, Schmid M, Fitch N, Richer CL, Lalonde M, Latt SA. (1986) Deletion mapping of the testis-determining locus with DNA probes in 46,XX males and in 46,XY and 46,X,dic(Y) females. *Nucleic Acids Res* 14: 6489-6505.

Muller U, Latt S A, Donlon T. (1987) Y- specific DNA sequences in male patients with 46,XX and 47,XXX karyotypes. *Am J Med Genet* 28: 393-401.

Nakagone Y, Seki S, Fukutani K, Nagafuchi S, Nakahori Y, Tamura T. (1991) PCR detection of distal Yp sequences in an XX true hermaphrodite. *Am J Med Genet* 41: 112-114.

Narita O, Manba S, Nakanishi T, Ishisuka N. (1975) Pregnancy and childbirth in a true hermaphrodite. *Obstet Gynecol* 45: 593-595.

Ner SS. (1992) HMGs everywhere. *Curr Biol* 2: 208-210.

Numabe H, Nagafuchi S, Nakahori Y, Tamura T, Kiuchi H, Namiki M, Kohda N, Fukushima Y, Fuse H, Kusano M, Arai T, Matzuzaki Y, Fukutani K, Isurugi K, Kuroki Y, Ikeuchi T, Yoshida M, Minowada S, Nakagome Y. (1992) DNA analyses of XX and XX-hypospadiac males. *Hum Genet* 90: 211-214.

Ohno S. (1967) Evolution of vertebrate sex chromosomes and genomes. *En Sex Chromosomes and Sex-linked Genes*. Ohno S. ed. Springer-Verlag. Berlin. 5-73.

Page DC, Harper M, Love J, Botstein D. (1984) Occurrence of a transposition from the X-chromosome long arm to the Y chromosome short arm during human evolution *Nature* 311: 119-123.

Page DC, de la Chapelle A, Weissenbach J. (1985) Chromosome Y-specific DNA in related human XX males. *Nature* 315: 224-226.

Page DC, Mosher E, Simpson E, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown LG. (1987) The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091-1104.

Page DC, Fisher EMC, McGillivray B, Brown LG. (1990) Additional deletion in sex-determining region of human Y chromosome resolves paradox of X,t(Y;22) female. *Nature* 346: 279-281.

Palmer M, Sinclair A, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas N, Fellous M. (1989) Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342: 937-939.

Palmer SJ, Burgoyne PS. (1991) In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* 112: 265-268.

Pearson PL, Bobrow M. (1970) Definitive evidence for the short arm of the Y chromosome associating with the X chromosome during meiosis in the human male. *Nature* 226: 959-961.

Pereira ET, Cabral de Almeida JC, Guhna ACYRG, Patton M, Taylor R, Jeffery S. (1991) Use of probes for ZFY, SRY and the Y pseudoautosomal boundary in XX males, XX true hermaphrodites and an XY female. *J Med Genet* 28: 591-595.

Pérez-Palacios G, Carnevale A, Escobar N, Villareal G, Fernández del C C, Medina M. (1981) Induction of ovulation in a true hermaphrodite with male phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1257-1259.

Pérez-Palacios G., Kofman-Alfaro S., Méndez J y Ulloa-Aguirre A. (1994a) True hermaphroditism. In *Intersexual States*. Martínez-Mora J, Audi L eds. Ed Doyma. Barcelona. 253-268.

Pérez-Palacios G., Kofman-Alfaro S., Méndez J y Ulloa-Aguirre A. (1994b) Sex reversal in humans: The XX male syndrome and related disorders. In *Intersexual States*. Martínez-Mora J, Audi L eds. Ed Doyma. Barcelona. 269-281.

Petit C, de la Chapelle A, Levilliers L, Castillo S, Noel B, (1987) et al. An abnormal terminal X-Y interchange accounts for most but not all cases of human XX maleness. *Cell* 49: 595-602.

Polani P. (1982) Pairing of X and Y chromosomes, non inactivation of X-linked genes and maleness factor. *Hum Genet* 60: 207-211.

Ramsay M, Bernstein R, Zwane E, Page DC, Jenkins T. (1988) XX true hermaphroditism in Southern African blacks. An enigma of primary sexual differentiation. *Am J Hum Genet* 43: 4-13.

Rappold GA. (1993) The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 92:315-324.

- Rice W. (1994) Degeneration of a non recombining chromosome. *Science* 263: 230-232.
- Saiki R. (1989) The design and optimization of the PCR. In PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Erlich H. A. Ed. Stockton Press N.Y. 7-16.
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 9.16-9.57.
- Schempp W, Müller G, Scherer G, Bohlander SK, Rommerskirch W, Fraccaro M, Wolf V. (1989) Localization of Y chromosome sequences and X chromosomal replication studies in XX males. *Hum Genet* 81: 144-148.
- Schneider-Gädick A, Beer-Romero P, Brown L G, Nussbaum R, Page D C. (1989) ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57: 1247-1258.
- Selden JR, Moorhead PS, Koo GC, Wachtel SS, Haskins ME, Patterson DF. (1984) Inherited XX sex reversal in the cocker spaniel dog. *Hum Genet* 67: 62-69.
- Sinclair AH, Foster JW, Spencer JA, Page DC, Palmer MS, Goodfellow PN, Graves JA. (1988) Sequences homologous to ZFY a candidate for the sex determining gene are autosomal in marsupials. *Nature* 336: 780-783.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- Simmler MC, Rouyer F, Verganaud G, Nystrom-Lathi M, Ngo KY, (1985) Pseudoautosomal DNA sequences in the pairing region of the human sex chromosomes. *Nature* 317: 692-697.
- Simpson J. (1976) *Disorders of sexual differentiation*. Academic Press. New York.
- Skordis NA, Stetka DG, MacGillivray MH, Greenfield SP. (1987) Familial XX males coexisting with familial XX true hermaphrodites in same pedigree. *J Pediatr* 110: 244-248.
- Southern EM. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.

Stalvey J, Durbin E, Erickson RP. (1989) Sex vesicle "entrapment": translocation or nonhomologous recombination of misaligned Yp and Xp as alternative mechanisms for abnormal inheritance of the sex-determining region. *Am J Med Genet* 32: 564-572.

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.

Taketo-Hosotani T, Nishioka Y, Nagamine CM, Villalpando I, Merchant-Larios H. (1989) Development and fertility of ovaries in the B6.Y<sup>DOM</sup> sex-reversed female mouse. *Development* 107: 95-105.

Tegankamp TR, Brazzel JW, Tegankamp I, Lavid F. (1979) Pregnancy without benefit to reconstructive surgery in a bisexually active true hermaphrodite. *Am J Obstet Gynecol* 135: 427-428.

Therkelsen AJ. (1964) Sterile man with chromosomal constitution 46,XX. *Cytogenetics* 3: 207-218.

Tiersch TR, Mitchell MJ, Wachtel SS. (1991) Studies on the phylogenetic conservation of the *SRY* gene. *Hum Genet* 86: 571-573.

van Niekerk W. (1976) True hermaphroditism. An analytic review with a report of 3 new cases. *Am J Obstet Gynecol* 126: 890-907.

van Niekerk W, Retief A. (1981) The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet* 58: 117-122.

Verga V, Erickson RP. (1989) An extended long-range restriction map of the human sex-determining region on Yp, including *ZFY*, finds marked homology on Xp and no detectable Y sequences in an XX male. *Am J Hum Genet* 44: 756-765.

Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel V, 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.

Wachtel S, Ohno S, Koo C, Boyse A. (1975) Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* 257: 235-236.

Waibel F, Snerer G, Fraccaro M, Hustinx TWJ, Weissenbach J, (1987) Absence of Y-specific DNA sequences in human 46,XX true hermaphrodites and in 45,X mixed gonadal dysgenesis. *Hum Genet* 76: 332-336.

Wassarman PM. (1987) Early events in mammalian fertilization. *Annu Rev Cell Biol* 3: 109-142.

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.

Witschi E. (1948) Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. Carnegie Contr Embryol 32: 67-80.

Witt N, Erickson RP. (1989) A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. Hum Genet 82: 271-274.

Witt N, Erickson RP. (1991) A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction (erratum). Hum Genet 86: 540.

Wolfe J, Darling SM, Erickson RP, Craig I, Buckle V, Rigby P, Willard HP, Goodfellow PN. (1985) Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome. J Mol Biol 182: 477-485.

Wylie CC, Heasman J. (1993) Migration, proliferation and potency of primordial germ cells. Seminars in Developmental Biology 4: 161-170.

Yoshida M, Kakizawa Y, Mariyama M, Minowada S, Higashihara E, (1991) et al. DNA and cytological detection of Y-containing cells in an XX boy with polyorchidism. J Urol 146: 1356-1358.

Young H. (1937) Genital abnormalities, hermaphroditism and related adrenal diseases. Williams and Wilkins. Baltimore.

Zenzes M, Muller U, Aschmoneit I, Wolf U. (1978) Studies on H-Y antigen in different cell fractions of the testis during pubescence. Immature germ cells are antigen H-Y negative. Hum Genet 45: 297-303.

Zwingman T, Erickson RP, Boyer T, Ao A. (1993) Transcription of sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. Proc Natl Acad Sci USA 90: 814-817.