



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Amplificación enzimática en ADN extraído de tejido gonadal incluido en parafina

T e s i s

Químico

Farmacéutico

Biólogo

Euclides

Avila

Chavez



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



México, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

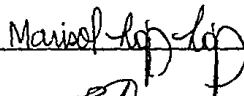
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. Angelina Quintero Ruiz.
Vocal Prof. Blas Lotina Henssen.
Secretario Prof. Marisol López López.
1er. suplente Prof. Ma. Estela Cevallos Ferriz.
2o. suplente Prof. Marina Gavilanes Ruiz.

Trabajo desarrollado en el Laboratorio de Investigación Básica,
Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM/ Instituto Nacional de Cancerología, SSA.

Asesor: QFB. Marisol López López



Sustentante: Euclides Avila Chávez



Dedicatoria

A mis padres: Emma y Mario

Por todo el apoyo, el amor, la confianza y la motivación que me han dado. Por todos los sacrificios que han tenido que pasar (como la vida sedentaria entre Las Palmas, Ayutla y la Ciudad de México), todo para que yo tuviera la oportunidad de ir a la Universidad. Gran parte de lo que soy se lo debo a ustedes: Gracias por todo.

A mis hermanos: Vianel y Mario

Por acompañar las aventuras de mi infancia, por el apoyo que he tenido de ellos, por tener siempre motivo para decirnos cosas muy "tiernas" y por el genio peculiar de cada uno. Gracias por hacerme la vida divertida.

Dedicatoria

A la memoria de María Callas.

Giuseppe Verdi, La Traviata, Atto terzo, Finale

Violetta

Più a me t'appressa-
Ascolta, amato Alfredo.
Prendi, quest'è l'immagine
De'miei passati giorni;
A rammentarti torni
Colei che si t'amò.

Alfredo

No, non morrai, non dirmelo-
Dei viver, amor mio.
A strazio sì terribil
Qui non mi trasse Iddio.

Germont

Cara, sublime, sublime vittima
D'un disperato amore,
Perdonami lo strazio
Recato al tuo bel cor.

Violetta

Se una pudica vergine
Degli anni suoi sul fiore,
A te donasse il core-
Sposa ti sia - lo vo'.
Le porgi quest'effigie;
Dille che dono ell'è
Di chi nel ciel fra gli angeli
Prega per lei, per te.

Germont

Finché avrà il ciglio lagrime
lo piangerò per te.
Voia a'beati spiriti,
Iddio ti chiama a sé.

Alfredo

Sì presto, ah no, dividerti
Morte non può da me.

Violetta

È strano!
Cessarono
Gli spasimi del dolore.
In me rinasce - m'agita
Insolito vigor!
Ah! ma io ritorno a viver!
Oh gioia

Agradecimientos

A mis abuelos, tíos y primos por lo que significan para mí.

Con mucho cariño a mi tía Rosalva por todo lo que hizo por mí cuando llegué a esta ciudad

A la Facultad de Química de la UNAM.

A la "tortuguita" Leda por ayudarme, aconsejarme, acompañarme hasta horas impropias para una dama como ella, por enseñarme (de todo), por los regalos que algún día tuvo que afrontar por mi culpa, por su fenotipo folclórico, por toda su energía, por los cantos entonados en el laboratorio (Va pensiero..., Gloria..., etc.) y por toda clase de aventuras en la calle, camiones, peseros, etc. Sin embargo, creo que también sería bueno agregar un punto más: por soportarme todo este tiempo. Eres una mujer maravillosa. Gracias por conocerte.

A Marisol:

Por darme la oportunidad de conocer el micromundo de los sistemas biológicos y por entrar al detalle en materia de gónadas, genitales ambiguos, hipospadias y cosas más horribles que ya no quiero mencionar. Por la revisión crítica del trabajo escrito para que quedara tal como está. Por todo, Gracias.

Con cariño para los integrantes de la División de Investigación Básica, IIB/INCan: Gabriel, Venancio, Emma, Roxana, Emmy, Raquel, Suitpy y especialmente a Memo.

A todo el personal del Servicio de Genética del Hospital General de México por las experiencias compartidas. Afectuosamente a la Dra. Susana Kofman-Alfaro por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo y por su interés contagioso en estas cosas de la diferenciación sexual.

A los doctores Arturo Angeles, Juan Pablo Méndez, Sara Paraguirre y a la QFB. Alicia Cervantes por haber proporcionado bloques de gónadas y muestras de sangre de pacientes y controles.

Con todo el afecto a mis amigos de carrera:
Paty, Vero R., Vero A., Claudia, Pili R, Pili V, Lupita, Fabián, Martha, Susy, Agustín, Dea, Mónica, Liz (y su inseparable marido) Ricardo, Karl, Tere, Tommy.

A toda persona que yo conozca y que no se encuentre en esta breve lista.

A personas que son más que amigos: Omar, Gerardo, Carlos y Laura.

A los profesores de la Facultad de Química que dejaron alguna huella en mí.

INDICE

	Página
Abreviaturas	I
Resumen	III
1. Marco teórico	1
1.1 Los cromosomas sexuales humanos	2
1.1.1 El cromosoma Y	2
1.1.2 El cromosoma X	6
1.2 Diferenciación sexual normal	9
1.2.1 Diferenciación cromosómica	9
1.2.1.1 El factor determinante testicular (TDF)	9
1.2.2 Diferenciación gonadal	21
1.2.3 Diferenciación fenotípica	24
1.3 Diferenciación sexual patológica	29
1.3.1 Disgenesias gonadales	29
1.3.1.1 Disgenesia gonadal pura 46,XY	29
1.3.1.2 Disgenesia gonadal mixta	35
1.3.2 Hermafroditismo verdadero	37
1.3.2.1 Hermafroditismo verdadero 46,XX	39
1.3.2.2 Otros complementos cromosómicos en el hermafroditismo verdadero	42
1.4 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	45
1.4.1 Fundamento de la reacción	46
1.4.2 Los ciclos	47
1.4.3 Los componentes de la reacción	48
1.4.4 Aplicaciones de PCR	56
1.5 La técnica histológica de la parafina	58

Abreviaturas

A₂₆₀: absorbancia registrada a 260 nm.
A₂₈₀: absorbancia registrada a 280 nm.
A₂₆₀/A₂₈₀: relación de absorbancias a 260 y 280 nm.
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNC: ácido desoxirribonucleico complementario
ALE: amortiguador de lisis de eritrocitos
ALL: amortiguador de lisis de leucocitos
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: trifosfato de adenosina
CGP: células germinales primordiales
CHCl₃-AIA: cloroformo-alcohol isoamílico 24:1
CTP: trifosfato de citidina
DHT: 5 alfa-dihidrotestosterona
dic: cromosoma dicéntrico
dNTP: desoxirribonucleótido
dpc: días poscoito
DGM: disgenesia gonadal mixta
DGP: disgenesia gonadal pura
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
GTP: trifosfato de guanosina
hCG: gonadotropina coriónica humana
HIM: hormona inhibidora de estructuras müllerianas
HV: hermafroditismo verdadero
idic: cromosoma isodicéntrico
kb: kilobase (1 x 10³ nucleótidos)
kDa: kilodalton
LH: hormona luteinizante
Mb: megabase (1 x 10⁶ nucleótidos)
μl: microlitro
p: brazo corto de un cromosoma
PABX: límite de la región pseudoautosómica del cromosoma X
PABY: límite de la región pseudoautosómica del cromosoma Y
PAR: región pseudoautosómica de los cromosomas sexuales

1.6	Extracción de ADN de tejido incluido en parafina	61
2.	Planteamiento del problema y objetivos	65
3.	Parte experimental	66
3.1	Soluciones empleadas	66
3.2	Equilibración del fenol	66
3.3	Extracción de ADN a partir de bloques de gónada fijadas en formaldehído e incluidas en parafina	67
3.3.1	Método A	67
3.3.2	Método B	68
3.3.3	Método C	69
3.3.4	Método D	70
3.4	Extracción de ADN a partir de leucocitos totales	72
3.5	Determinación cuantitativa del ADN extraído	73
3.6	Amplificación de secuencias centroméricas de los cromosomas sexuales por reacción en cadena de la polimerasa	74
3.7	Análisis de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa	77
4.	Resultados	79
5.	Discusión	96
6.	Conclusiones	103
7.	Bibliografía	105

Abreviaturas

A₂₆₀: absorbancia registrada a 260 nm.
A₂₈₀: absorbancia registrada a 280 nm.
A_{260/A280}: relación de absorbancias a 260 y 280 nm.
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNC: ácido desoxirribonucleico complementario
ALE: amortiguador de lisis de eritrocitos
ALL: amortiguador de lisis de leucocitos
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: trifosfato de adenosina
CGP: células germinales primordiales
CHCl₃-AIA: cloroformo-alcohol isoamílico 24:1
CTP: trifosfato de citidina
DHT: 5 alfa-dihidrotestosterona
dic: cromosoma dicéntrico
dNTP: desoxirribonucleótido
dpc: días poscoito
DGM: disgenesia gonadal mixta
DGP: disgenesia gonadal pura
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
GTP: trifosfato de guanosina
hCG: gonadotropina coriónica humana
HIM: hormona inhibidora de estructuras müllerianas
HV: hermafroditismo verdadero
idic: cromosoma isodicéntrico
kb: kilobase (1 x 10³ nucleótidos)
kDa: kilodalton
LH: hormona luteinizante
Mb: megabase (1 x 10⁶ nucleótidos)
μl: microlitro
p: brazo corto de un cromosoma
PABX: límite de la región pseudoautosómica del cromosoma X
PABY: límite de la región pseudoautosómica del cromosoma Y
PAR: región pseudoautosómica de los cromosomas sexuales

pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PMPE: perfect match polymerase enhancer
q: brazo largo de un cromosoma
RACE: amplificación rápida de los extremos de un ácido desoxirribonucleico complementario
RNasa: ribonucleasa
SDS: dodecilsulfato de sodio
SRY: región sexo-determinante del cromosoma Y
Sry: homólogo murino de SRY
Ta: temperatura teórica de alineamiento
TBE: amortiguador Tris-boratos-EDTA
TDF: factor testículo determinante
Tdy: gen testículo determinante en el cromosoma Y murino
TE: amortiguador Tris-EDTA
Tm: temperatura de fusión
TTP: trifosfato de timidina
U: unidad de actividad enzimática
UV: ultravioleta
VX: varón XX
Y: cromosoma Y
ZFY: gen del cromosoma Y humano codificador de la proteína con dominios de unión a zinc
Zfy: homólogo murino de ZFY

Resumen

El dimorfismo sexual en los mamíferos es el producto de la acción concertada de un gran número de moléculas durante la embriogénesis. Después de establecido el sexo cromosómico, se determina el destino de la gónada indiferenciada hacia dos vías: ovario o testículo. En el embrión XY, una compleja interacción de señales se activa cuando el factor determinante testicular (*TDF*) se expresa y dispara la cascada de la diferenciación testicular. En ausencia de cromosoma Y, la gónada bipotencial evoluciona pasivamente hacia la formación de un ovario. El desarrollo posterior de las características sexuales secundarias constituye el sexo fenotípico.

Existen errores en este proceso complejo que se manifiestan como una incongruencia entre el sexo cromosómico, el sexo gonadal y el sexo fenotípico. En el humano, la reversión sexual da como resultado el síndrome del varón XX (VX) o la disgenesia gonadal pura (DGP) XY. La disgenesia gonadal mixta (DGM) y el hermafroditismo verdadero (HV) 46,XX, son resultado de un proceso de diferenciación sexual anormal. En estos padecimientos se extirpan una o ambas gónadas de acuerdo a criterios médicos establecidos.

En los últimos años, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado su enorme potencial en estudios retrospectivos en ADN obtenido de muestras diversas, incluyendo tejido embebido en parafina.

La estandarización de una técnica para extraer ADN de gónadas incluidas en parafina, así como la amplificación enzimática de secuencias centroméricas específicas de los cromosomas X y Y a partir de este ADN, constituyen los principales objetivos de este trabajo.

Utilizando tejido gonadal normal (testículo y ovario) incluido en parafina, se logró desarrollar una metodología para extraer ADN cualitativa y cuantitativamente apropiado para usarse en PCR. Esta metodología fue aplicada al análisis del genoma gonadal de dos pacientes con disgenesia gonadal mixta, un

paciente con disgenesia gonadal pura 46,XY y dos casos de hermafroditismo verdadero 46,XX.

Se identificó la presencia de una región centromérica del cromosoma Y en los dos pacientes con DGM y en la paciente con DGP 46,XY, y se descartó en los casos de HV 46,XX. Esta misma región fue identificada en el ADN de leucocitos de estos pacientes.

Este estudio demuestra la posibilidad de realizar análisis molecular retrospectivo por PCR en gónadas incluídas en parafina. En el caso de las gónadas presentes en pacientes con diferentes anomalías de la diferenciación sexual, la investigación de secuencias específicas permite entender más claramente la etiología de estos padecimientos.

1. Marco teórico

Desde tiempos inmemoriales existe una gran curiosidad acerca de los factores que determinan el sexo de un nuevo ser. Ya en el esplendor de la cultura griega, se postulaban hipótesis científicas en cuanto al mecanismo de determinación sexual; contando con aportaciones de filósofos de la época, entre ellos Aristóteles (Fincham, 1987).

Hasta 1900 se aceptaba que el sexo del embrión humano se determinaba por factores ambientales tales como la nutrición materna. A raíz del redescubrimiento de las contribuciones de Mendel, se encontró que en varias especies de vertebrados e invertebrados, el sexo individual era determinado por la constitución cromosómica, demostrándose que el dimorfismo sexual en insectos tenía bases cromosómicas (Fincham, 1987).

En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y en *Drosophila*, el sexo es determinado por la relación existente entre el número de cromosomas X y de autosomas (X/A). De esta manera, las hembras de *Drosophila* tienen una relación 2X:2A y los machos 1X:2A (McElreavey y cols., 1993b).

La existencia de los cromosomas X y Y humanos se demostró en 1923 por métodos citológicos. Por analogía a *Drosophila*, se asumió que el sexo en mamíferos depende del número de cromosomas X presentes. En 1959, estudios en humanos y ratones con complementos cromosómicos anormales como por ejemplo XXY y X0, revelaron el papel crítico del cromosoma Y en la determinación sexual. De manera independiente del número de cromosomas X, los embriones de mamíferos que poseen un cromosoma Y (XY o XXY) se desarrollan como machos, en contraste con el fenotipo femenino originado en embriones sin cromosoma Y (XX o X0) (Page y cols., 1987). La determinación y diferenciación sexual son procesos secuenciales que inician con el establecimiento del sexo genético en la concepción, seguido por la diferenciación gonadal y fenotípica durante la embriogénesis temprana y finalizando en la pubertad con la maduración sexual completa y la capacidad de preservar la especie (Moore y Grumbach, 1992).

1.1 Los cromosomas sexuales humanos

En la actualidad se acepta que los cromosomas sexuales dimórficos provienen de un par de cromosomas sexuales homomórficos por una reducción gradual del cromosoma Y y con una serie de rearrreglos importantes (Hodgkin, 1992).

1.1.1 El cromosoma Y

El cromosoma Y es pequeño, acrocéntrico y pertenece al grupo G, siendo generalmente el más grande de este grupo. Los brazos largos tienden a acercarse entre sí y no posee satélites en sus brazos cortos. Muestra un gran polimorfismo de tamaño debido a su región heterocromática (Cuevas-Covarrubias y Kofman-Alfaro, 1990).

Este cromosoma se divide en dos regiones: una eucromática localizada en todo el brazo corto y la región proximal del brazo largo, y una porción heterocromática, genéticamente inactiva, ubicada en la región distal de sus brazos largos (Cuevas-Covarrubias y Kofman-Alfaro, 1990).

Los resultados de un mapa de delección del cromosoma Y usando varias enzimas de restricción, permiten dividirlo en 7 intervalos: los primeros 3 incluyen la totalidad de Yp, el cuarto corresponde a la región centromérica y los tres restantes se encuentran en el brazo largo (Vergnaud y cols., 1986). Page y cols.; (1991) han propuesto un mapa más detallado del cromosoma Y, dividiéndolo en 30 intervalos.

En la parte distal del brazo corto del cromosoma Y se encuentra la región pseudoautosómica principal o mayor (PAR), abarcando en promedio unos 2.6 Mb de longitud (Rappold, 1993). Existe una región homóloga en el cromosoma X, conocida como región pseudoautosómica del cromosoma X. El nombre de esta región deriva de su participación en el apareamiento de los cromosomas X y Y en forma término-terminal entre Xp y Yp, abarcando al menos 95% de Yp y 27% de Xp. En PAR se lleva a cabo recombinación homóloga entre los cromosomas X y Y durante la meiosis paterna (Cuevas-Covarrubias y Kofman-Alfaro, 1990). Se ha encontrado una segunda

región pseudoautosómica en brazos largos de los cromosomas X y Y, muy cerca de los telómeros (Freije y cols., 1992). Recientemente se determinó que esta segunda región pseudoautosómica consta de 320 kb, translocados del cromosoma X al Y mediante un evento de recombinación mediado por secuencias *Alu* (Kvaloy y cols., 1994). El límite de la región pseudoautosómica del cromosoma Y (*PABY*) tiene próxima una serie de secuencias *Alu*, mismas que se encuentran ausentes en las cercanías de *PABX*, la frontera de la región pseudoautosómica del cromosoma X. Las secuencias *Alu* corresponden a ADN repetitivo humano con una unidad monomérica de ~ 304 pares de bases (pb) (Ellis y cols., 1989).

Se han identificado 6 genes en la región pseudoautosómica principal de ambos cromosomas sexuales humanos (Rappold, 1993). El gen *MIC2* codifica para un antígeno de superficie involucrado en procesos de adhesión celular; el gen *XE7* cuya función es desconocida; el locus *ASMT*, que codifica para la acetilserotonina metiltransferasa, enzima que cataliza la reacción final en la síntesis de la hormona melatonina y que se ha propuesto como candidato para desórdenes psiquiátricos a causa de su expresión limitada a cerebro y retina. Otro gen es el que codifica para la adenina nucleótido translocasa *ANT3*, que se encarga del transporte de ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial y por lo tanto, juega un papel importante en el metabolismo energético de la célula eucariótica. El gen *IL3RA*, codifica la subunidad alfa del receptor de interleucina, y finalmente el locus del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*GM-CSF*), un factor de crecimiento y estimulación que actúa sobre las células del linaje monocito-macrófago (Rappold, 1993).

La región eucromática no-pseudoautosómica del brazo corto del cromosoma Y y el segmento eucromático de Yq, se extienden en una zona entre 13 y 15 Mb de longitud (Moore y Grumbach, 1992).

Inmediatamente proximal a *PABY* y a las secuencias *Alu*, se encuentra la región determinante del sexo que contiene a *SRY* (Sinclair y cols., 1990), y junto a éste, se localiza el gen *ZFY* (Page y cols., 1987). Una revisión de los genes *SRY* y *ZFY* se encuentra más adelante.

Un gen que ha provocado diversas reacciones en la comunidad científica es *RPS4Y* que se localiza más cerca del centrómero que *ZFY*. Se propuso que este gen previene la formación de los estigmas del síndrome de Turner en los varones normales, aunque no existe evidencia experimental a su favor (Fisher y cols., 1990).

Siguiendo hacia el centrómero, se ha propuesto la localización de genes del crecimiento. Existen reportes de deleciones tanto en *Yp* como en *Yq* asociadas con baja estatura (Cuevas-Covarrubias y Kofman-Alfaro, 1990; Ogata y Matsuo, 1992).

Esto podría ser indicativo de que los genes promotores del crecimiento corporal se ubican en ambos brazos del cromosoma Y.

El centrómero del cromosoma Y, mantiene unidos ambos brazos y permite una buena segregación de los cromosomas durante las divisiones celulares (Tyler-Smith y Willard, 1993).

En *Yq* se ha propuesto ubicar a genes participantes en espermatogénesis y a un factor de azoospermia, *AZF*. También se ha establecido que la expresión del antígeno H-Y está controlada por un gen en la región eucromática de *Yq* (Simpson y cols., 1987). La localización de un gen regulador del crecimiento dental se ha asignado a la banda *Yq11*, y muy cerca de esta región se ha señalado que se encuentra el pseudogén de la sulfatasa de esteroides. Los pseudogenes para la sintetasa de argininosuccinato, de la actina y del gen *KALIG1*, han sido ubicados también en *Yq* (Cuevas-Covarrubias y Kofman-Alfaro, 1990, Rappold, 1993). David Page propuso que existe un locus en *Yq*, responsable directo de la formación de gonadoblastomas en gónadas disgenéticas y lo nombró *GBY* (Page, 1987), aunque no existe ningún respaldo experimental a esta hipótesis.

En la figura 1.1 se ilustra el cromosoma Y humano.

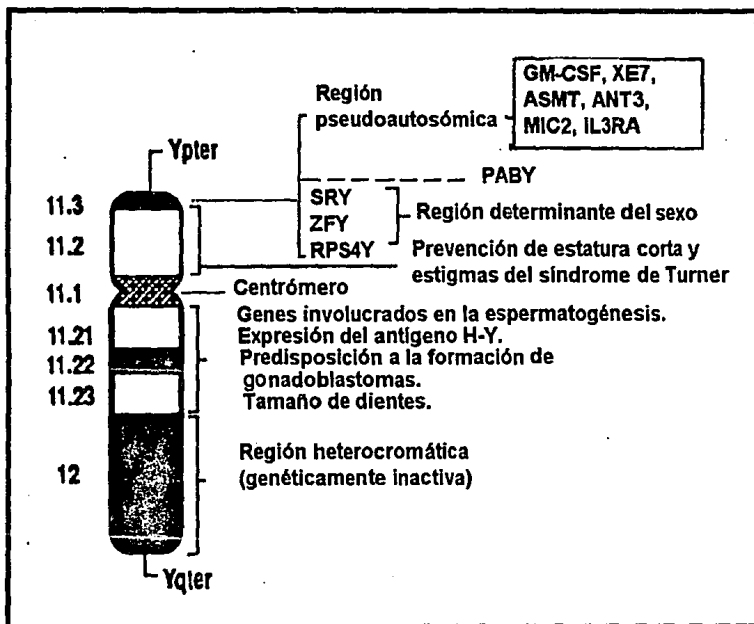


Figura 1.1 El cromosoma Y humano.

Tomado de Grumbach y Conte, 1992.

1.1.2 El cromosoma X

El cromosoma X es significativamente más grande que el cromosoma Y. Contiene muchos loci genéticos, incluyendo algunos esenciales para la diferenciación sexual tanto masculina como femenina, y genes vitales, ya que nunca se han reportado individuos con cariotipo 45,Y (Moore y Grumbach, 1992). En la figura 1.2 se presenta el cromosoma X humano.

Los genes X-específicos crean un problema de dosis génica debido a que la mujer XX normal tiene el doble de genes del cromosoma X que un varón XY (Kofman-Alfaro y cols., 1988).

En 1961, Mary Lyon observó que las hembras de mamíferos placentarios, heterocigotas con respecto a marcadores del color del pelaje ligados al cromosoma X, mostraban un patrón de mosaico, con algunas manchas que muestran el efecto de un cromosoma X y otros resultados llevó a Lyon a proponer que durante la embriogénesis temprana, uno de los dos cromosomas X en la mujer permanecía inactivo para compensar así la expresión de genes X-específicos en ambos sexos. Esta teoría ha sido confirmada y a este proceso se le ha llamado inactivación del cromosoma X (Fincham, 1987). Este proceso se lleva a cabo también en las aneuploidías que involucran cromosomas sexuales, por lo que una interpretación alternativa de este fenómeno sería un estado en el cual sólo un cromosoma X permanece genéticamente funcional, independientemente del número de cromosomas X presentes en un individuo (Lyon, 1992). El cromosoma X inactivo corresponde al cuerpo de Barr.

En las células somáticas, la inactivación del cromosoma X tiene un patrón aleatorio, ya que se puede inactivar el cromosoma X de origen paterno o materno, desde los días 12 y 18 de la gestación humana (Lyon, 1992). Se sabe que el cromosoma X inactivo replica tardíamente, y segrega de manera clonal, es decir, que todas las células descendientes tendrán el mismo cromosoma X inactivo (Kofman-Alfaro y cols., 1984).

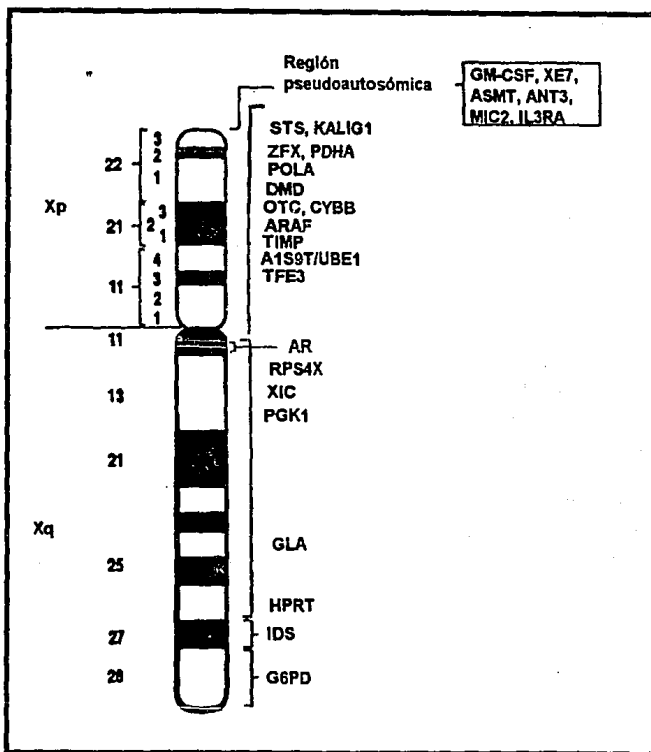


Figura 1.2 El cromosoma X humano.

Tomado de Grumbach y Conte, 1992.

Sin embargo, no siempre el proceso de inactivación se lleva a cabo al azar. La mujer, inmediatamente después de la fertilización mantiene activo su par de cromosomas X, y así se conserva durante la vida embrionaria temprana. Al alcanzar el estadio de trofoectodermo, ocurre la primera inactivación del cromosoma X, que no es al azar, sino que a semejanza de los marsupiales, involucra preferentemente al cromosoma paterno. La inactivación del cromosoma X por esta vía, persiste hasta que es reemplazado por el mecanismo al azar, una vez que el embrión se encuentra en el blastocisto tardío. La eficiencia del proceso de inactivación es tal, que cuando existe un cromosoma X aberrante, el proceso no ocurre al azar, sino que se mantiene activo al cromosoma X normal (Kofman-Alfaro y cols., 1988).

La meiosis femenina implica la presencia de ambos cromosomas sexuales para llevar a cabo primero la diferenciación ovárica normal, y después la gametogénesis. La base de esta aseveración se encuentra en los estudios realizados en otras especies, en donde se ha demostrado la reactivación del cromosoma X inactivo en las células germinales, justo antes de la meiosis. En el varón, el único cromosoma X también se encuentra inactivo para evitar interferencias meióticas en el espermatozoido primario (Kofman-Alfaro y cols., 1988).

Durante la década de los setentas, se propuso que los patrones de metilación eran el mecanismo expansor de la inactivación de un cromosoma X. En particular, se encontró que las citosinas de las islas CpG en las regiones promotoras, estaban metiladas en el cromosoma X inactivo. En nuestros días, se descarta este mecanismo como el evento primario de la inactivación, aunque se considera que la metilación diferencial es un factor importante para mantener el estado inactivo de un cromosoma X (Lyon, 1992).

La inactivación transcripcional de un cromosoma X, es mediada aparentemente por el efecto *cis* de una región conocida como centro de inactivación (XIC), la cual identifica a los cromosomas X en exceso e inicia una señal de inactivación bidireccional. Estudios detallados de las propiedades de numerosas translocaciones

X/autosoma y deleciones del cromosoma X han permitido la localización del gen *XIST*, el candidato al centro de inactivación, en la banda Xq13 en humanos y en la banda D en el ratón. La ubicación cromosómica de *XIST* coincide con la de *XIC*, y además se expresa únicamente en el cromosoma X inactivo (Brown y cols., 1991). Existe evidencia considerable que apoya el papel del homólogo murino *Xist* en la iniciación de la inactivación del cromosoma X. Sin embargo, no es clara su función en la propagación de la señal de inactivación y en el mantenimiento del estado inactivo (Rastan, 1994).

1.2 Diferenciación sexual normal

La diferenciación sexual en el humano es un proceso ordenado, dinámico y está sujeto a un programa secuencial que ocurre en tres etapas consecutivas de diferenciación: cromosómica, gonadal y fenotípica.

1.2.1 Diferenciación cromosómica

El sexo genético del cigoto se establece en el momento de la fertilización de un óvulo normal, que aporta sólo cromosomas X, por un espermatozoide que contiene un cromosoma X o un cromosoma Y (Kofman-Alfaro y cols., 1988). De esta manera se origina el dimorfismo sexual característico de la clase *Mammalia*, siendo la hembra poseedora de un complemento cromosómico sexual XX, mientras que el macho es heterogamético XY (Moore y Grumbach, 1992).

1.2.1.1 El Factor Determinante Testicular (TDF)

En los mamíferos, la presencia o ausencia del cromosoma Y constituye el determinante binario sobre el cual giran todas las características sexuales dimórficas. La decisión alternativa de

las dos vías durante la diferenciación sexual, trae como consecuencia un proceso fisiológico complejo que puede involucrar los productos de muchos genes, varios de ellos autosómicos (McLaren, 1988). La gónada indiferenciada recibe un efecto directo inicial del cromosoma Y y una vez que esto ocurre, se dispara una serie de reacciones en cadena a semejanza de una cascada que culmina en una gónada diferenciada. Una evidencia importante de la participación de genes autosómicos en la cascada de diferenciación sexual es una mutación encontrada en el cromosoma 17 de ratón que provoca la formación de ovarios en un ratón con cariotipo XY (Page y cols., 1987) y la reversión sexual humana asociada a deleciones 9p (Bennett y cols., 1993).

El evento central en la determinación sexual en mamíferos es la diferenciación testicular a partir de la cresta genital en la gónada indiferenciada (Koopman y cols., 1991b). Por esta razón, la determinación del sexo es equivalente a la formación testicular y el gen o genes presentes en el cromosoma Y responsables de tal evento se han nombrado como Factor Determinante Testicular (*TDF*) en humanos, y gen testículo-determinante en el cromosoma Y, *Tdy* en el ratón. En los últimos 15 años se han propuesto secuencialmente a tres proteínas como el producto del factor testículo-determinante: el antígeno H-Y, ZFY y SRY (Mittwoch, 1992).

En un principio se creyó que el factor determinante testicular correspondía al locus H-Y, el antígeno menor de histocompatibilidad masculino, responsable del rechazo lento de injertos de individuos machos en hospederos femeninos singénicos. Sin embargo se descubrió que los loci para el antígeno H-Y y *TDF* se localizan en diferentes posiciones en el cromosoma Y (O'Reilly y cols., 1992).

La ocurrencia natural de varias anomalías estructurales del cromosoma Y humano hizo posible la construcción de un mapa de deleción por hibridación con sondas de ADN Y-específicas y de esta manera definir la posición de *TDF* (Verzina y cols., 1986). Asimismo, fue importante para tal propósito el análisis del ADN de los pacientes con reversión sexual. El término reversión sexual define a individuos masculinos 46,XX y fenotipos femeninos

asociados a cariotipos 46,XY (Kofman-Alfaro y cols., 1988).

La presencia de cromatina de la región determinante del sexo en algunos varones XX así como la deleción de estas secuencias en varias mujeres XY, fue importante para el diseño experimental de la búsqueda del *TDF*. El mapa de deleción realizado en estos pacientes con reversión sexual, indica que sólo una pequeña porción del brazo corto del cromosoma Y humano es necesario y suficiente para inducir diferenciación testicular de la gónada bipotencial (Page y cols., 1987). Este fragmento genómico corresponde al intervalo 1A del cromosoma Y humano, dividido a su vez en 1A1 y 1A2, siendo este último el más próximo al centrómero. Se encontró posteriormente que un varón XX retenía los intervalos 1A1 y 1A2 mientras que una mujer X,t(Y;22); con translocación de una parte de Yp al cromosoma 22, tenía cromosoma Y sin el intervalo 1A2. Este descubrimiento situaba a *TDF* en el intervalo 1A2, dentro de un segmento de ADN de aproximadamente 140 kb de longitud contados a partir de PABY (Page y cols., 1987; Page y cols., 1990).

La hibridación de sondas de ADN derivadas del intervalo 1A2 con ADN genómico de hembras y machos de diferentes especies de mamíferos incluyendo al hombre, identificó un fragmento altamente conservado en el cromosoma Y, correspondiente a una secuencia de 1.3 kb clonada en el sitio *Hind* III del plásmido pDP1007. A este locus se le ha llamado *ZFY* en el humano y *Zfy* en ratones (Page y cols., 1987). Además de este gen, la sonda pDP1007 detectó una región compartida por machos y hembras, con una señal de hibridación del doble de intensidad en hembras con respecto a machos. Estudios posteriores revelaron que esta secuencia homóloga a *ZFY* se encontraba en Xp y que se conoce como *ZFX/Zfx* en el humano y ratón, respectivamente (Page y cols., 1987).

El análisis de la secuencia de la sonda pDP1007 mostró un marco abierto de lectura de 1.2 kb. La secuencia de aminoácidos contenida en este marco de lectura, reveló que se trata de una proteína de 404 aminoácidos con 13 dominios Cys-Cys/His-His de unión a zinc, similares a los del factor de transcripción IIIA (FTIIIA) de *Xenopus* y otras proteínas sintetizadas por especies de

Drosophila (Page y cols., 1987). Por analogía a FTIIIA y al factor de transcripción humano Sp1, que se fijan al ADN vía secuencia específica, se piensa que los dominios Cys-Cys/His-His en las proteínas codificadas por homólogos a ZFY interactúan directamente con ácidos nucleicos. El dominio de unión a zinc es una de las estructuras más conservadas presentes en proteínas de unión al ADN vía secuencia específica. Los dominios Cys-Cys/His-His coordinan a un ion Zn^{2+} en una conformación tetraédrica. Esta interacción es esencial para mantener la estructura tridimensional del dominio (Koopman y cols., 1991a).

Existen 4 homólogos a ZFY en el ratón: dos de ellos localizados en el cromosoma Y (*Zfy-1* y *Zfy-2*), otro ligado al cromosoma X (*Zfx*), y el último, *Zfa* que se encuentra situado en el cromosoma 10. En cuanto a similitudes en estructura primaria, ZFY comparte 99% con ZFX; *Zfy-1* muestra 98% de homología con *Zfy-2* y entre *Zfx* y *Zfa* se comparte 97% de la secuencia. Se cree que *Zfa* es de origen reciente por su ausencia en especies relacionadas con el ratón como *Mus pahari* y *Mus platyhris* y que derivó por retroposición de un transcrito de *Zfx* (Koopman y cols., 1991a).

Los estudios de expresión muestran que ZFX y ZFY se transcriben en todos los tejidos humanos (Page y cols., 1987; Schneider-Gädicke y cols., 1989), lo que podría indicar una función general en la célula, además de su papel en diferenciación sexual (Koopman y cols., 1989).

Existen varias observaciones experimentales que excluyen a ZFY como TDF.

Las crestas genitales embrionarias de ratón de ambos sexos, son indistinguibles hasta antes de los 11.5 días poscoito (dpc). El cordón testicular es una estructura embrionaria que se forma por alineamiento de células de Sertoli que proliferan con rapidez durante este período del desarrollo gonadal. Su formación a los 12.5 dpc, se considera como el primer signo macroscópico del desarrollo masculino del embrión. Se esperaría que TDF se exprese justo antes de que el cordón testicular comience a formarse. De la pareja de genes *Zfy-1/Zfy-2*, sólo el primero se expresa entre los 10.5 y 12.5 dpc en testículos embrionarios. Sin embargo, ninguno

de estos genes se expresa en testículos de ratones w^e/w^e , 40,XX *Sxr* y 40,XX *Sxr'*, todos ellos sin células germinales. La gónada embrionaria tiene linaje celular somático y germinal, pero se acepta como un hecho que las células germinales no influyen en la determinación testicular (Koopman y cols., 1989). Esta es una observación en contra del papel de *ZFY* como *TDF*.

Algunos reptiles como las tortugas y caimanes, dependen de la temperatura de incubación del embrión para la determinación del sexo. Sin embargo, también existen en este grupo algunas especies que contienen sistemas cromosómicos determinantes del sexo. Después de hibridar con la sonda pDP1007 al ADN extraído de lagartos, serpientes, cocodrilos, aves y tortugas, se encontraron secuencias homólogas a *ZFY* en los animales estudiados, independientemente de que el mecanismo de determinación sexual fuera cromosómico o dependiente de la temperatura (Bull y cols., 1988).

Los marsupiales y los mamíferos comparten el mecanismo de determinación sexual, aunque los cromosomas sexuales en metaterios son más pequeños que los correspondientes a las especies euterias y aparentemente carecen de una región de apareamiento. Cuando se buscaron secuencias equivalentes a la sonda pDP1007 en ADN de marsupiales, se detectó una banda de ~ 12 kb en varias especies, tanto hembras como machos. El experimento se repitió empleando ADN extraído de una línea celular híbrida cuyo-marsupial, la cual retiene un cromosoma X intacto de *Macropus robustus*. No se encontró el homólogo a *ZFX* en este ensayo, por lo que se concluye que las secuencias equivalentes a *ZFY* son autosómicas en marsupiales. Si *ZFY* fuese *TDF*, se esperaría que este gen se localizara en alguno de los cromosomas sexuales debido a la homología con la determinación sexual en mamíferos (Sinclair y cols., 1988).

Entre 1987 y 1988, se propusieron varias teorías para explicar la presencia de dos genes homólogos *ZFY* y *ZFX* en la determinación sexual. El modelo de la dosis/inactivación del cromosoma X, planteaba que *ZFY* y *ZFX*, producen proteínas funcionales: las células XY podrían tener dos copias de proteína

mientras que las células XX sólo tendrían una copia debido a la inactivación del otro cromosoma X. De esta manera, los embriones con doble dosis de proteína desarrollan como machos, y los embriones con dosis única de proteína, se convierten en hembras. Este modelo fue invalidado cuando se demostró que *ZFX* escapa a la inactivación del cromosoma X y por lo tanto, es transcripcionalmente activo (Schneider-Gädicke y cols., 1989).

La última prueba que excluyó definitivamente a *ZFY* como *TDF* se presentó en 1989. Estudiando el ADN extraído de 3 varones XX y un hermafrodita verdadero 46,XX; todos ellos *PABY* positivos y *ZFY* negativos, se descubrió que tenían secuencias del cromosoma Y con actividad determinante sexual. Sin embargo, *TDF* no se encontraba a 140 kb de *PABY*, sino abarcaba sólo 60 kb de secuencias Y-específicas. Esto significa que la ubicación cromosómica de *ZFY* no corresponde a *TDF* (Palmer y cols., 1989).

En mamíferos, por analogía a los resultados obtenidos en ratón, se cree que la familia de genes relacionados con *ZFY* se encuentra íntimamente relacionada con la espermatogénesis (Koopman y cols., 1989).

Varios grupos de investigación se lanzaron a la búsqueda de *TDF* en la zona comprendida entre *PABY* y 60 kb de ADN en dirección al centrómero, y los 3 varones XX y el hermafrodita verdadero 46,XX ya citados se usaron para este propósito. Poco después se reportó que los puntos de ruptura del cromosoma Y en los pacientes estudiados se agrupaban entre *PABY* y 35 kb, lo cual cerraba el margen propuesto inicialmente (Palmer y cols., 1989).

El ADN de esta región fue subclonado en fragmentos de aproximadamente 4 kb de longitud y cada uno de ellos fue posteriormente cortado con enzimas de restricción con un patrón frecuente de corte como *Rsa I*, para producir fragmentos pequeños del orden de 500 pb a 1 kb. Estos fragmentos se usaron como sondas en hibridación ADN-ADN tipo Southern con genomas de hembras y machos bovinos, murinos, de cuyos y de humanos. Siete de estas sondas detectaron secuencias específicas del cromosoma Y en ADN humano digerido con *EcoR I*, pero sólo una de ellas, pY53.3 de 2.1 kb, hibrida específicamente con secuencias de cromosoma Y bovino y

de ratón, además del humano. La digestión de pY53.3 con *Hinc* II genera un fragmento de 0.9 kb, con una afinidad aún mayor que la sonda parental por las secuencias conservadas entre los cromosomas Y de las especies arriba citadas y de otros mamíferos como conejo, cerdo, caballo, gato, tigre y chimpancé (Goodfellow y cols., 1991; Sinclair y cols., 1990). Sin embargo, cuando se disminuyó el rigor de los ensayos, se encontraron bandas adicionales compartidas por machos y hembras, lo que indica que existen secuencias relacionadas a la sonda pY53.3 en alguna otra parte del genoma. Se descarta al cromosoma X porque las bandas mencionadas no fueron observadas en células híbridas de humano-roedor que contienen al cromosoma X humano como única contribución (Sinclair y cols., 1990).

La secuenciación completa de la sonda pY53.3, reveló la presencia de 2 marcos abiertos de lectura de 99 y 223 aminoácidos respectivamente, con dirección de transcripción 5'»3' del centrómero hacia telómero. Las secuencias de aminoácidos de estos marcos abiertos de lectura se compararon con las reportadas en los bancos de datos de proteínas. El presunto polipéptido codificado por el marco abierto de lectura más grande, tiene una porción con estrecha homología a la proteína Mc codificada por el gen *mat3-M* de *Schizosaccharomyces pombe* y a una estructura conservada, presente en varias proteínas nucleares no-histonas relacionadas con HMG1 y HMG2. Esta estructura que cubre aproximadamente 80 aminoácidos muy conservados, se ha llamado caja o dominio HMG porque se encuentra en el grupo de proteínas HMG (grupo de alta movilidad). Después del último aminoácido del dominio HMG en la sonda pY53.3 y hacia el extremo 3', la proteína tiene 68 aminoácidos más antes de encontrar un codón de terminación (Goodfellow y cols., 1991; Sinclair y cols., 1990).

La homología entre 120 aminoácidos del marco abierto de lectura grande definido por la sonda pY53.3 en el humano y su equivalente en el conejo, hicieron pensar que efectivamente esta sonda contiene la secuencia codificadora de un gen (Sinclair y cols., 1990).

Mediante hibridación tipo Northern y usando el fragmento *Hinc II* de pY53.3 como sonda, se detectó un transcrito de 1.1 kb en testículo adulto humano. Este fragmento no se encontró cuando el experimento se repitió con ovario, pulmón masculino y líneas celulares de riñón masculinas. Este resultado es consistente con la suposición de que el equivalente a pY53.3 en el cromosoma Y codifica un transcrito testículo-específico. Con la evidencia reunida, al gen localizado en Yp y definido por la sonda pY53.3 se le ha dado el acrónimo *SRY* (Sinclair y cols., 1990). La secuencia conservada del dominio HMG de *SRY* ha permitido clonar los equivalentes de este gen en varias especies incluyendo el conejo, el ratón y las especies marsupiales *Sminthopsis macroura* y *Macropus eugenii* (McElreavey y cols., 1993b).

El descubrimiento de que las secuencias adyacentes a *SRY* son ricas en secuencias repetidas y la presencia del pequeño marco abierto de lectura, hicieron sospechar que este gen tenía pequeños exones y también intrones. La presencia del codón de terminación, de un potencial sitio de empalme hacia 5' y la señal de poliadenilación en 3' del marco de lectura del gen se tomaron como indicio de que se trataba del último exón de *SRY* (Sinclair y cols., 1990). Ahora se sabe que *SRY* es un gen pequeño, sin intrones, que codifica una proteína de 204 aminoácidos con un peso estimado en aproximadamente 23.9 kDa, que contiene un pequeño promotor rico en G+C hacia 5' y el dominio HMG ubicado desde el aminoácido 57 hasta el residuo 137. Además se confirmó que *SRY* origina un transcrito de un tamaño entre 950 pb y 1.1 kb (McElreavey y cols., 1993b; Su y Lau, 1993).

Dos grupos independientes han descrito la organización del gen *SRY*. Mediante 5' RACE-PCR y ensayos de protección con ribonucleasa en ARN aislado de testículo humano adulto, Vilain y cols.; (1992a) definieron el sitio de inicio de la transcripción a -91 pb del primer codón de metionina en el marco abierto de lectura. Resultados diferentes fueron obtenidos por Su y Lau (1993) usando una técnica de transferencia génica mediada por cósmidos, seguida por la detección de transcritos en cultivos celulares. Este sistema *in vitro* permitió la localización de dos

sitios de inicio de transcripción en las posiciones -78 pb y -136 pb. Los diferentes resultados obtenidos por los dos grupos pueden reflejar las estrategias empleadas para la resolución del problema (McElreavey y cols., 1993b) o la diferencia entre los tejidos estudiados (Goodfellow y Lovell-Badge, 1993). La región 5' adyacente al inicio del marco de lectura contiene secuencias regulatorias potenciales. En las posiciones -41 a -36 y de -65 a -56 se encuentra sitios de unión del factor de transcripción Sp1 a las cajas GC: el hexanucleótido GGGCGG en "tandem".

Se determinó también que las regiones 5' vecinas al inicio de transcripción no tienen cajas TATA o CAAT. La combinación de estas características habían sido reportadas en las regiones promotoras de los genes para la hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (*HGPRT*), adenosina desaminasa (*ADA*) y la 3-fosfoglicerato cinasa. Se encontró que la secuencia GGGGACTTCC localizada aproximadamente 1 kb hacia 5' del inicio de transcripción, es idéntica a la del elemento potenciador B, el cual fue inicialmente identificado en los promotores de los genes de las cadenas pesadas y ligeras kappa de las inmunoglobulinas (McElreavey y cols., 1993b).

La unidad transcripcional de *SRY* se encuentra delimitada por dos regiones ricas en A+T y también por secuencias repetidas invertidas, características de sitios de inserción en los eventos de retroposición. Una hipótesis que trata de explicar el origen de *SRY* plantea que este gen surgió por retroposición del transcrito de otro gen durante la evolución humana (Su y Lau, 1993).

El gen equivalente a *SRY* en el cromosoma Y del ratón se denomina *Sry*. Este gen también contiene un marco abierto de lectura homólogo al gen humano. La proteína *Sry* también tiene el dominio HMG y por esta característica, es capaz de unirse al ADN al igual que el producto de *SRY* (Gubbay y cols., 1990). El análisis de protección con RNasa de transcritos de *Sry*, ha dado la pauta para pensar que existe una diferencia dramática entre el tamaño de la proteína *SRY* y la contraparte *Sry*: 395 aminoácidos para ésta última (Goodfellow y Lovell-Badge, 1993).

La caja HMG es el dominio funcional de las proteínas relacionadas con HMG1 y todas ellas tienen la capacidad de unirse al ADN. Este dominio proteico tiene una carga neta positiva proporcionada por la abundancia de los aminoácidos lisina y arginina, así como una cantidad considerable de residuos aromáticos y prolina. Las variaciones en la secuencia del dominio HMG podría traer como consecuencia la amplia diversidad de funciones bioquímicas (Ferrari y cols., 1992).

Se han caracterizado varias moléculas que pertenecen al grupo de proteínas que poseen al menos una caja HMG y se les ha llamado genéricamente proteínas-HMG. Entre ellas se encuentran las proteínas de alta movilidad (HMG), el factor HUBF, los factores potenciadores linfoides TCF-1 y TCF-1a, la proteína Mc de *S. pombe*, el factor fúngico Stell, el regulador transcripcional de levadura Rox-1 y naturalmente SRY (Ferrari y cols., 1992).

La interacción de la proteína Sry con ADN que incluye la secuencia 5'-CCATTGTTCT-3', trae como consecuencia el doblamiento del ADN en un ángulo de 85°. El ángulo de curvatura generado por la unión del dominio HMG al ADN puede reflejar indirectamente la afinidad de unión de la proteína por la secuencia estudiada (Giese y cols., 1992). Se sabe que el doblamiento del ADN se requiere para la replicación, inicio de la transcripción y en la recombinación sitio-específica (McElreavey y cols., 1993b).

En otro estudio se encontró que la proteína SRY interacciona con la secuencia 5'-AACAAAG-3', misma a la que se une TCF-1. De hecho, primero se descubrió que TCF-1 se une a esta secuencia y a partir de este hallazgo se quiso saber si la proteína SRY también la reconoce. La segunda, cuarta, quinta y sexta posición son críticas para tal efecto (Harley y cols., 1992). No se sabe si esta secuencia tiene importancia fisiológica o es sólo una coincidencia experimental, aunque podrían existir otras secuencias con las que la proteína SRY interaccione de manera más eficiente y posiblemente otras proteínas en la cresta genital contribuyan a esta acción in vivo.

La caja HMG de la proteína SRY muestra los dos patrones de unión de las proteínas HMG: dependiente de secuencia y por el hecho de unirse a ADN cruciforme, también es sensible a la estructura del ADN (Ferrari y cols., 1992). Puede interaccionar con moléculas lineales y también con aquéllas que presenten alguna curvatura en el sitio de reconocimiento. Se ha determinado que cuando la proteína SRY interactúa con ADN lineal lo hace a través del surco menor (Giese y cols., 1992; Grosschedl y cols., 1994). A diferencia de HMG1, la proteína SRY no muestra afinidad por ADN de cadena sencilla (Harley y cols., 1992).

La hélice alfa del dominio HMG de la proteína SRY se une de manera específica y con alta afinidad a los promotores de los genes de la hormona antimülleriana y de la aromatasa P-450, aunque no se saben los efectos de tales interacciones. La aromatasa P-450 cataliza la conversión de la testosterona a estradiol en la mujer y se encuentra bajo regulación en el embrión masculino (Haqq y cols., 1993). La hormona antimülleriana se revisa en el capítulo de Diferenciación Fenotípica.

Los estudios de expresión de *Sry* son consistentes con su papel como *Tdy*: se transcribe en bajos niveles justo antes de la formación del cordón testicular a los 10.5 dpc y estos niveles se mantienen hasta los 12 dpc, específicamente por las células somáticas de la cresta urogenital, (Koopman y cols., 1990; Rossi y cols., 1993; Bogan y Page, 1994) e inclusive se expresa en el estadio embrionario de blastocisto (Zwingman y cols., 1993).

Durante la vida adulta se puede detectar transcrito de *Sry* en células germinales del testículo de ratón (Gubbay y cols., 1990; Rossi y cols., 1993) de manera similar a lo que sucede en el hombre (Sinclair y cols., 1990). Esta observación podría indicar que estos genes tienen una dualidad fisiológica, es decir, que independientemente de funcionar como la señal inicial que dirige a la gónada bipotencial hacia la formación de testículo, tengan una segunda función en el adulto, quizás en células germinales. No se detecta expresión de *Sry* en testículo de ratón adulto que carece de células germinales (Koopman y cols., 1990). Este hallazgo puede significar que existe comunicación entre células germinales y

elementos somáticos en el testículo adulto; y que esta interacción es indispensable para la expresión de *Sry* (McElreavey y cols., 1993b). Por otra parte, no se sabe si el transcrito fetal y adulto son idénticos (Bogan y Page, 1994).

Una prueba más de que *Sry* es *Tdy* se obtiene del estudio del ratón XX *Sxr*. Esta cepa de ratones tienen secuencias Y-específicas en el cromosoma X: *Tdy*, y los genes *Hya*, que regula la expresión del antígeno H-Y y *Spy*, involucrado en la espermatogénesis. *Sxr'* es una variante de *Sxr*, que retiene a *Tdy* pero ha perdido a *Hya* y *Spy* (McLaren, 1988). Se probó que *Sry* se encuentra en los ratones XX *Sxr* y XX *Sxr'* (Gubbay y cols., 1990).

Quizás la prueba más convincente del papel del gen *Sry* como *Tdy* es el trabajo realizado por Koopman y cols., en 1991. Estos autores introdujeron un fragmento de genoma murino de 14 kb que incluía a *Sry* en embriones normales de ratón XX. De entre los ratones transgénicos resultantes, algunos mostraron reversión sexual. Estos resultados indican que el gen *Sry* dirige los eventos iniciales en la determinación testicular en el ratón. El gen *SRY* humano es incapaz de producir reversión sexual en embriones murinos 40,XX; y además no se expresa ni en vida fetal ni en testículo adulto de ratón (Koopman y cols., 1991b).

Se ha visto que el gen *Sry* promueve el desarrollo testicular en la ausencia de otros genes del cromosoma Y, pero que la reversión sexual no siempre se lleva a cabo en su totalidad (Koopman y cols., 1991b). Con la evidencia reunida, se concluye formalmente que *Sry* es el determinante sexual en el cromosoma Y del ratón (Bogan y Page, 1994).

En la especie humana se han correlacionado los hallazgos en ratón con respecto al papel de *SRY* como *TDF*. Las dos primeras publicaciones que atribuyen la reversión sexual 46,XY a mutaciones en *SRY*, son importantes por ser pioneras en su género. Una de las pacientes presentó una mutación puntual en la caja HMG de *SRY*, y por consiguiente, la sustitución de un aminoácido por otro dentro del producto del gen (Berta y cols., 1990). Se demostró que esta mutación puntual disminuye de manera considerable la capacidad de unión de la caja HMG al ADN (Nasrin y cols., 1991). El otro

reporte presenta a una mujer 46,XY con un corrimiento de fase de lectura originado por la delección de cuatro bases cercanas al extremo 3' del dominio HMG del gen SRY (Jager y cols., 1990a).

Estas pruebas permiten establecer que SRY es el mejor candidato para desempeñar las funciones de TDF en el humano (Berta y cols., 1990; Jager y cols., 1990a; Bogan y Page, 1994).

Con base en evidencia experimental, McElreavey y cols. (1993a) postularon muy recientemente una hipótesis referente a la cascada regulatoria de la determinación sexual en mamíferos. Esta hipótesis propone que la proteína SRY activa la determinación sexual masculina por represión de la síntesis o actividad de la proteína codificada por un gen autosómico desconocido, al cual se le ha llamado teóricamente gen Z. En este modelo, la proteína Z es un regulador negativo de la determinación sexual masculina y el dominio HMG de la proteína SRY puede interaccionar con secuencias de ADN reguladoras del gen Z, lo cual trae como consecuencia la represión de la síntesis de la proteína Z.

1.2.2 Diferenciación gonadal

Las gónadas de ambos sexos se desarrollan a partir del esbozo localizado en el borde medioventral de la cresta urogenital, adyacente al riñón primitivo. Hasta el estadio de 12 mm, que ocurre aproximadamente a los 42 días de gestación, las gónadas del macho y la hembra son indistinguibles morfológicamente (Grumbach y Conte, 1985).

Básicamente, la gónada se origina de dos poblaciones celulares: las células germinales primordiales (CGP) y las células somáticas de origen mesodérmico. Las CGP han sido identificadas en embriones humanos de veinticuatro días, localizadas en el endodermo dorsal de la alantoides. A partir de este sitio, las CGP, en mitosis constante, migran durante la cuarta semana a la pared del intestino posterior y una vez allí, se dirigen a través del mesenterio dorsal hasta llegar a la gónada primordial de la cresta genital, en la semana quinta. Aún se desconocen los

factores que guían a las CGP hasta la gónada primordial, pero se piensa que las células somáticas de la cresta urogenital emiten señales quimiotácticas para atraer y posteriormente retener a las CGP (Grumbach y Conte, 1985; Kofman-Alfaro y cols., 1988).

La gónada primitiva indiferenciada deriva del blastema gonadal, situado en la parte ventral del mesonefros, y constituido por una masa celular mesenquimatosa, epitelio mesodérmico celómico, elementos mesonéfricos y las CGP que han colonizado la cresta urogenital. El blastema gonadal se organiza en dos tipos de tejidos: aquél donde las CGP se encuentran rodeadas por células somáticas precursoras de las células de Sertoli en el testículo o de la granulosa en el ovario, y el tejido estromático gonadal, que en una etapa posterior origina los vasos sanguíneos, el tejido conjuntivo y a los antecesores de las células de Leydig o las células de la teca interna ovárica. Alrededor de los cuarenta y cinco días de vida intrauterina, existen rearrreglos del epitelio celómico, precedentes inmediatos del desarrollo de los cordones seminíferos testiculares. En el humano, la génesis de la cresta gonadal se efectúa alrededor del día 32 de la embriogénesis y 3 días después se forman los cordones sexuales a partir del epitelio (Grumbach y Conte, 1985; Kofman-Alfaro y cols., 1988).

Existe una diferencia sexual sorprendente en la duración de la diferenciación gonadal. Bajo la influencia de *TDF*, la organización testicular comienza entre la sexta y séptima semanas de gestación. Por otra parte, el ovario no surge como tal a partir del estadio indiferenciado, hasta que han transcurrido tres meses de vida intrauterina, cuando aparece el primer signo de la diferenciación gonadal femenina: el comienzo de la meiosis. Evidentemente, existen mecanismos que regulan el inicio de la meiosis de las células germinales, dependiendo del sexo cromosómico (Grumbach y Conte, 1985).

Con el comienzo de la diferenciación testicular inducida por *TDF*, se suprime la proliferación de las células germinales de los cordones seminíferos primitivos y se detiene la diferenciación germinal en la etapa de espermatogonias. En suma, la organogénesis testicular implica sucesivamente la diferenciación de los cordones

seminíferos en células de Sertoli primitivas, que envuelven a las células germinales derivadas extragonadalmente, el desarrollo de la túnica albugínea, la aparición subsecuente de las células de Leydig, y finalmente, la diferenciación de los túbulos mesonéfricos en los ductos eferentes, que conectan los túbulos seminíferos y el sistema de redes con el epidídimo, para comunicar hacia el exterior por el conducto excretor (Grumbach y Conte, 1985; Kofman-Alfaro y cols., 1988).

En ausencia de TDF, el primordio gonadal tiene una tendencia natural a desarrollarse como ovario, si hay células germinales y sobreviven. El estadio indiferenciado persiste en el feto femenino semanas después de que comienza la organogénesis testicular. Sin embargo, hay una continua proliferación del epitelio celómico y células germinales primordiales, que se agrandan gradualmente y se transforman en ovogonias. Hacia la undécima semana, mucho después de la diferenciación del testículo en el feto masculino, un número significativo de células germinales comienzan a entrar en profase meiótica, que caracteriza la transición de ovogonia en ovocitos. Las ovogonias en la parte medular del ovario son las que primero entran en meiosis. Hasta la semana 21 de la gestación se inicia la formación de los primeros folículos primordiales (Grumbach y Conte, 1985). Este proceso se realiza por la ruptura de los cordones epiteliales de manera tal, que gradualmente cada ovocito queda envuelto por una capa única de células epiteliales cubiertas por una lámina basal delgada. La etapa final de la foliculogénesis es la formación de las tecas en torno a la lámina basal de los folículos en el seno del tejido estromático (Kofman-Alfaro y cols., 1988).

Si el futuro ovario no se coloniza por células germinales, o los ovocitos mueren antes o durante la foliculogénesis, no se lleva a cabo de manera completa la diferenciación ovárica, quedando la gónada indiferenciada para toda la vida. Por lo tanto, los factores que regulan la migración, supervivencia y proliferación de las células germinales, son críticos para la ontogenia ovárica y por consiguiente, de la maduración sexual femenina (Moore y Grumbach, 1992).

En cuanto al número de ovocitos, se observan las cantidades máximas entre las semanas 18 y 22, alcanzando los 6 y 7 millones de células germinales (Grumbach y Conte, 1985). Después de este tiempo hay una disminución progresiva, de tal manera que al nacimiento existen sólo 2 millones de células germinales, la mitad de las cuales muestra signos degenerativos (Kofman-Alfaro y cols., 1988).

1.2.3 Diferenciación fenotípica

En la séptima semana de vida intrauterina, el feto está equipado con primordios de los ductos genitales masculinos y femeninos derivados del mesonefros y a partir de la semana siguiente se inicia la diferenciación fenotípica masculina o femenina del embrión. En este tiempo, los precursores genitales externos consisten en una hendidura que está unida por pliegues uretrales apareados y más lateralmente, por abultamientos labioescrotales. La hendidura urogenital está coronada por un tubérculo genital precursor del cuerpo cavernoso y el glande. Los pliegues uretrales rodeados de mucosa pueden permanecer separados, en cuyo caso son denominados labios menores, o se fusionan para formar el cuerpo esponjoso conteniendo una uretra fálica. Los abultamientos labioescrotales pueden permanecer separados para formar los labios mayores o fundirse en la línea media para desarrollar el escroto y la cubierta epidérmica ventral del pene. La distinción entre clitoris y pene está basada principalmente en el tamaño y en la fusión de los labios menores precursores del cuerpo esponjoso (Grumbach y Conte, 1985; Grumbach y Conte, 1992). Ha sido demostrado claramente por Alfred Jost en experimentos clásicos, que las secreciones hormonales del testículo fetal juegan un papel decisivo en determinar la dirección del desarrollo de los ductos genitales (Moore y Grumbach, 1992). Las estructuras primordiales del aparato genital embrionario incluyen 2 sistemas de conductos: los conductos de Müller o paramesonéfricos, y los conductos de Wolff o mesonéfricos. En presencia de testículos

funcionales, las estructuras müllerianas involucionan, mientras que los conductos de Wolff completan su desarrollo. Si faltan testículos fisiológicamente normales o en presencia de ovarios, son los ductos wolffianos los que desaparecen por falta de estimulación y entonces maduran las estructuras müllerianas (Kofman-Alfaro y cols., 1988). Se necesitan tres hormonas testiculares para dirigir la diferenciación fenotípica masculina. La primera de ellas se encarga de la desaparición de los conductos paramesonéfricos entre las semanas 8 y 11 (Moore y Grumbach, 1992), y se conoce como hormona inhibidora de estructuras müllerianas u hormona antimülleriana, HIM (Kofman-Alfaro y cols., 1988). Esta hormona es un homodímero glicoproteico unido por enlaces disulfuro, con peso molecular de alrededor de 140 kDa, es el primer producto secretado por la célula de Sertoli y es un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante β (Josso, 1992).

En el sexo masculino, la HIM se sintetiza a partir de la diferenciación de túbulos seminíferos. El pico en la producción hormonal coincide con la regresión de los ductos müllerianos y disminuye paulatinamente sin llegar a desaparecer totalmente (Josso, 1992). No se conoce la función de la HIM producida después de la involución de los ductos müllerianos, aunque se ha dicho que tiene un papel en diferenciación gonadal (Moore y Grumbach, 1992) y se ha postulado como factor inhibidor de la meiosis masculina (Kofman-Alfaro y cols., 1988). Se ha identificado el gen de la HIM humana en los brazos cortos del cromosoma 19 y el gen se ha clonado en el bovino, humano, ratón y la rata (Mtnsterberg y Lovell-Badge, 1991).

De manera secuencial, después de iniciarse la síntesis de HIM en la célula de Sertoli, las células intersticiales del testículo fetal se transforman en células de Leydig. La importancia de estas células radica en que es el lugar de síntesis de la segunda hormona involucrada en el desarrollo fenotípico masculino: la testosterona (Grumbach y Conte, 1992; Josso, 1992).

La testosterona es una hormona esteroide que se sintetiza en la célula de Leydig a partir de unidades de acetato, teniendo como

un intermediario importante al colesterol, y a la pregnenolona como limitante de la ruta sintética, ya que la formación de este precursor requiere hormona luteinizante (LH) para activar a los complejos mitocondriales 20,22-hidroxiilasa y 20,22-desmolasa del colesterol. Aparte de estos dos complejos proteicos, existen otros seis más en la síntesis de testosterona a partir de colesterol. Sin embargo, cronológicamente la síntesis de testosterona por el testículo fetal se realiza antes del inicio de la liberación de hormona luteinizante, por lo que esta función temprana es asumida por la gonadotropina coriónica placentaria, hCG (Kofman-Alfaro y cols., 1988). Se puede detectar producción de testosterona por el testículo desde la novena semana en el feto humano. La máxima concentración de esta hormona se produce durante la semana 13 y entonces desciende paulatinamente (Josso, 1992).

La testosterona promueve la maduración de los túbulos seminíferos y estimula a los ductos de Wolff primitivos para diferenciarse en epidídimo, vasos deferentes, vesículas seminales y conducto eyaculador. Jost demostró que la implantación de un cristal de testosterona adyacente al ovario fetal del conejo estimulaba la diferenciación de los ductos masculinos del lado del implante, pero con mucho menor grado en el lado contralateral (Grumbach y Conte, 1992).

La testosterona también se libera a la circulación fetal, en donde se une por interacciones débiles a proteínas plasmáticas transportadoras de esteroides sexuales. Las células sensibles a la hormona permiten su entrada por difusión y una vez dentro, se convierte en el sustrato de la 5 alfa-reductasa citoplasmática, reacción que origina la tercera de las hormonas responsables del fenotipo masculino: la 5 alfa -dihidrotestosterona o DHT (Kofman-Alfaro y cols., 1988). Cabe mencionar que la DHT no puede aromatizarse a estrógenos, por lo que sus efectos son netamente androgénicos. Existen dos isoenzimas 5 alfa-reductasa: una activa en medio alcalino (tipo 1) y aquella presente en la próstata con pH óptimo ácido (tipo 2). En los tejidos como la próstata equipados con 5 alfa-reductasa durante el período de diferenciación fenotípica, la DHT es el andrógeno activo y se sabe

que esta hormona viriliza por sí sola a los genitales externos masculinos (Josso, 1992).

Tanto la testosterona como la dihidrotestosterona se unen en el citoplasma de las células blanco a un receptor de andrógenos, aunque la DHT lo hace con mucho mayor afinidad y estabilidad que la testosterona. La síntesis del receptor de andrógenos está codificada por un gen localizado en el cromosoma X y tiene relevancia en algunas anomalías de la diferenciación fenotípica. El complejo macromolecular formado por el receptor-hormona, pasa al núcleo y se une directamente al ADN. Esta interacción dispara una serie de eventos celulares que se manifiestan como efectos virilizantes (Josso, 1992).

Por efecto de la DHT, los pliegues genitales se ordenan en la línea media, se alargan y se fusionan para formar la uretra y el cuerpo esponjoso del pene entre las semanas 12 y 14 de gestación. También por efecto de la DHT ocurre la fusión de los engrosamientos labioescrotales a los lados de la uretra para formar la bolsa escrotal. El tamaño del pene parece aumentar linealmente unos 0.7 mm por semana, desde la semana décima hasta el término normal (Grumbach y Conte, 1992).

El fenotipo femenino es un proceso pasivo que el embrión sigue en ausencia de hormonas y otros productos secretados por el testículo, ya que el ovario es irrelevante en diferenciación fenotípica. Los genitales externos femeninos muestran poca diferenciación comparados con sus equivalentes masculinos. El tubérculo genital intacto se transforma en el clitoris, los engrosamientos labioescrotales dan origen a los labios mayores y por rearrreglo de los pliegues genitales se forman los labios menores. El seno urogenital se invagina al contacto de los ductos müllerianos y forma la porción inferior de la vagina. La proliferación del septo vesicovaginal extiende el orificio vaginal hasta la estructura observada al nacimiento (Grumbach y Conte, 1985; Kofman-Alfaro y cols., 1988).

Un resumen de la diferenciación sexual normal masculina y femenina se encuentra en la figura 1.3.

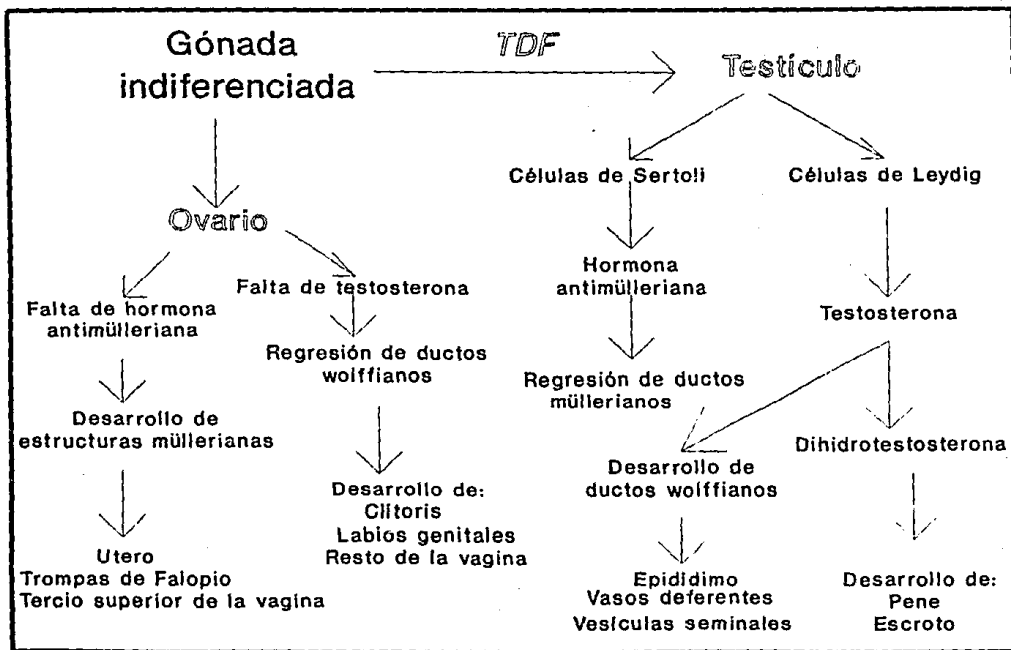


Figura 1.3 Diferenciación sexual normal masculina y femenina.

Tomado de Moore y Grumbach, 1992.

1.3 Diferenciación sexual patológica

Existen anomalías en el proceso de la diferenciación sexual normal que resultan en diferentes padecimientos como la disgenesia gonadal mixta, la disgenesia gonadal pura 46,XY y el hermafroditismo verdadero 46,XX que se describen a continuación.

1.3.1 Disgenesias gonadales

Antes del advenimiento del análisis citogenético, el término disgenesia gonadal describía a todos los individuos con genitales femeninos, estructuras müllerianas normales y estrías gonadales. De estos pacientes, algunos tenían estigmas del síndrome de Turner y otros carecían de ellos (Berkovitz, 1992).

En 1955, Swyer describió la disgenesia gonadal pura 46,XY caracterizada por un fenotipo femenino, estatura normal o alta, estrías fibrosas bilaterales, infantilismo sexual con amenorrea primaria y hábito eunucoide (Swyer, 1955).

En 1962 fue descrito el síndrome de diferenciación gonadal asimétrica por Bergadá y cols., y en 1964 Sohval lo denominó disgenesia gonadal mixta. Este padecimiento se define por la diferenciación gonadal anormal y asimétrica caracterizada por el desarrollo de testículo de un lado y una estría fibrosa contralateral (Bergadá y cols., 1994).

1.3.1.1 Disgenesia gonadal pura 46,XY

La disgenesia gonadal pura 46,XY (DGP 46,XY), se caracteriza por la presencia de genitales externos completamente femeninos, estructuras müllerianas bien desarrolladas y sustitución de gónadas funcionales por estrías fibrosas bilaterales (Berkovitz, 1992). Se ha estimado la incidencia de esta anomalía en 1:100000 recién nacidas (McElreavey y cols., 1993b). La detección de DGP 46,XY generalmente ocurre porque las pacientes acuden por amenorrea primaria y ausencia de desarrollo de caracteres sexuales secundarios (Kofman-Alfaro y cols., 1988).

Muchas mujeres con DGP 46,XY tienen ausencia de desarrollo mamario pero a cambio tienen vello púbico. Ocasionalmente, algunas pacientes tienen desarrollo mamario, e inclusive períodos menstruales esporádicos (Grumbach y Conte, 1992).

El perfil hormonal de individuos con DGP 46,XY muestra anestrogenismo y niveles de las hormonas luteinizante y folículo estimulante persistentemente elevados. Las concentraciones plasmáticas de andrógenos se encuentran en el rango de una mujer normal. En ocasiones, los andrógenos se encuentran moderadamente elevados, probablemente a causa del hipergonadotropismo y el subsecuente incremento en la producción de androstenediona por las células hilares de la estría gonadal (Grumbach y Conte, 1985). Esta podría ser responsable de la clitoromegalia observada en algunos de estos pacientes (Berkovitz, 1992).

Se realiza exploración y remoción quirúrgica de estrias fibrosas en DGP 46,XY para minimizar el riesgo de tumores gonadales. Puede iniciarse la terapia hormonal cíclica con estrógenos y progesterona durante la pubertad (Berkovitz y cols., 1991). Se ha reportado que algunas pacientes pueden embarazarse después de una fertilización *in vitro* con un donador del cigoto (Sauer y cols., 1989).

Después de que se descubrió el gen *SRY*, varios autores se interesaron en saber si se encontraba o no este gen en el genoma de individuos con DGP 46,XY (Ternes Pereira y cols., 1991; Tho y cols., 1992).

Cuando se estableció que la DGP 46,XY puede ser resultado de una mutación en *SRY* o en otro gen que invalide la función de éste, los investigadores procedieron al análisis molecular de *SRY* en búsqueda de mutaciones. En la literatura reportada, el 80% de las mujeres 46,XY con DGP tienen al gen *SRY* normal y sólo el resto presenta alteraciones en este gen (Hawkins, 1993). En la Tabla 1.1 se muestran las mutaciones reportadas hasta la fecha en casos de DGP 46,XY dentro del gen *SRY*. Cabe destacar que todas las mutaciones descritas excepto una, se encuentran en el dominio HMG y que supuestamente traen como consecuencia una deficiente interacción ADN-proteína. El hecho de que los reportes se limiten

Tabla 1.1 Mutaciones encontradas en el gen *SRY* en mujeres 46,XY con disgenesia gonadal pura.

CASO	MUTACION	ORIGEN	AMINOACIDO		REFERENCIA
			NUMERO	CAMBIO	
AA	ATG/ATA	<i>de novo</i>	64	M/I	Berta y cols, 1990
JN	GTG/CTG	HP	60	V/L	Berta y cols, 1990
JS	CCA/TTC del (ATTC)	<i>de novo</i>	122	CF	Jäger y cols, 1990a
Ca1	GGA/CGA	<i>de novo</i>	95	G/R	Hawkins y cols, 1992a
CHMO39	TGG/TAG	<i>de novo</i>	70	W/•	Hawkins y cols, 1992a
207	AAA/ATA	?	106	K/I	Hawkins y cols, 1992b
208	CCA (del A)	<i>de novo</i>	109	CF	Hawkins y cols, 1992b
213	ATC/ATG	HP	90	I/M	Hawkins y cols, 1992b
ML	TTC/TCC	HP	109	F/S	Jäger y cols, 1992
LG	ATG/ACC	<i>de novo</i>	68	I/T	McElreavey y cols, 1992b
AS	TAT/TAA	<i>de novo</i>	127	Y/•	McElreavey y cols, 1992b
NV	R				McElreavey y cols, 1992b
ZB	CAG/TAG	<i>de novo</i>	93	Q/•	McElreavey y cols, 1992c
XYF	AAG/TAG	<i>de novo</i>	92	K/•	Müller y cols, 1992B
SHM60	CGA/GGA	<i>de novo</i>	61	R/G	Affara y cols, 1993
WY57	CAG/TAG	HP	73	Q/•	Affara y cols, 1993
WC58	CAG/TAG	HP	73	Q/•	Affara y cols, 1993
HN31	ATG/ACG	<i>de novo</i>	77	M/T	Affara y cols, 1993
GA55	CGG/TGG	?	132	R/W	Affara y cols, 1993

HP = herencia paterna, • = codón de terminación, del = delección; CF = cambio de fase de lectura; R = delección (25-52 kb) a 1.7 kb del inicio del marco abierto de lectura de *SRY*. Los casos WY57 y WC58 son hermanos.

a la caja HMG, se debe a que no se han buscado alteraciones en otras partes del gen que pudieran ser importantes para su función (Bogan y Page, 1994). Se ha informado un caso de reversión sexual 46,XY asociada con una gran deleción (~ 25-52 kb) ubicada hacia 5' de *SRY*, iniciando a 0.8 kb del inicio de la transcripción del gen. En este caso, el gen *SRY* es normal y se piensa que la reversión sexual es consecuencia de alteraciones en los elementos reguladores de este gen (McElreavey y cols., 1992b).

Por otro lado, existe un reporte en el cual se estudió a ocho mujeres XY con DGP, en el cual no se encontraron mutaciones en el gen *SRY* (Pivnick y cols., 1992). Estos mismos resultados se obtuvieron del análisis molecular de 3 pacientes con DGP 46,XY (Pao y cols., 1993).

Ciertas mutaciones en *SRY* se han encontrado tanto en mujeres 46,XY con DGP, como en familiares masculinos normales (Berta y cols., 1990; Jäger y cols., 1991; McElreavey y cols., 1991; Harley y cols., 1992; Hawkins y cols., 1992b; Jager y cols., 1992; Vilain y cols., 1992b). Se han propuesto varias explicaciones a estos descubrimientos, siendo la más lógica aquélla que plantea que la variante de *SRY* puede interaccionar con cualquiera de los dos alelos de un segundo gen involucrado en determinación sexual. La característica importante del par de alelos, es que uno tiene secuencia normal, mientras que el otro porta una mutación. De esta manera, cuando la variante *SRY* interacciona con el alelo normal del segundo gen, se desarrolla un individuo masculino, mientras que si es el alelo mutante el que interacciona con la variante de *SRY*, se condiciona la reversión sexual (Vilain y cols., 1992b).

Otro grupo informó de un caso de DGP 46,XY, portador de una gran deleción de Yp. Este caso es importante, porque la paciente no muestra ningún estigma del síndrome de Turner ni al gen *RPS4Y*, supuesto preventor de los estigmas de este síndrome en individuos 46,XY normales (Müller y cols., 1992A).

En la gran mayoría de los casos, la estría gonadal se caracteriza por la presencia de un estroma ovárico ondulado, mezclado con tejido fibroso y sin folículos primordiales. Existe un amplio margen en cuanto a la abundancia de estroma ovárico

presente en las estrías gonadales. La apariencia histológica de la estria fibrosa de una DGP 46,XY es similar a la presente en mujeres con síndrome de Turner (Berkovitz y cols., 1991).

La incidencia de tumores gonadales es de aproximadamente 30% en sujetos con DGP 46,XY; siendo el más común el gonadoblastoma (Verp y Simpson, 1987). Los gonadoblastomas son neoplasias definidas histológicamente por colecciones de células germinales y granulosa, entre cúmulos de células de Sertoli inmaduras, de Leydig y lúteas (Page, 1987), que pueden tener calcificaciones internas (Berkovitz, 1992). Este tumor se origina principalmente en gónadas disgenéticas, es decir, aquéllas con desorganización de la arquitectura normal del ovario y testículo, y que están exentas de células germinales. Los gonadoblastomas frecuentemente son bilaterales y en la mayoría de los casos son benignos (Page, 1987).

Los disgerminomas pueden encontrarse también en la gónada de DGP 46,XY y se cree que provienen de un gonadoblastoma pre-existente. Aunque es capaz de dar metástasis, el disgerminoma es generalmente curable. Un tumor más amenazador que estos dos, es el carcinoma de células embrionarias, que también puede generarse en el remanente gonadal de DGP 46,XY. La estria fibrosa puede condicionar el desarrollo de teratomas malignos, aún cuando no exista un gonadoblastoma promotor (Seraj y cols., 1993). Una vez detectado el carcinoma embrionario o el teratoma, es necesario aplicar una terapia agresiva para evitar su progreso (Verp y Simpson, 1987).

Un artículo reciente menciona que la morfología microscópica de la estria fibrosa puede servir para conocer la existencia o ausencia de mutaciones en el gen *SRY*. Aquéllas estrías fibrosas compuestas exclusivamente por estroma ovárico, sin túbulos y con nódulos esclerohialinos; representan reminiscencias de la gónada de una DGP 46,XY debida a mutaciones en la determinación testicular. Por otro lado, si en la estria se encuentran túbulos y estroma indiferenciado, es probable que la reversión sexual sea consecuencia de alguna mutación en la vía de diferenciación testicular (Vilain y cols., 1993).

Existen familias con DGP 46,XY con herencia ligada al cromosoma X (Berkovitz y cols., 1991). Además de este hecho, se han reportado varios casos esporádicos de este síndrome en sujetos con duplicaciones del brazo corto del cromosoma X. El análisis de esta duplicación en individuos XY normales y XY con reversión sexual, sugiere la existencia de un gen entre Xp21.2 y Xp22.1 (Scherer y cols., 1989). Según Ogata y cols., (1992) este gen todavía no caracterizado, se encuentra sujeto a la inactivación y directamente involucrado en la génesis testicular. Tomando como base una paciente con reversión sexual 46,X,Yp+ y SRY(+), estos autores proponen que la presencia de dos copias activas del supuesto gen, interfieren con la determinación testicular y origina reversión sexual. Es interesante notar que estos pacientes con cromosomas X mutantes tienen además anomalías congénitas. Retomando la hipótesis de McElreavey y cols., (1993a) acerca del papel del gen SRY como regulador positivo de la determinación sexual masculina y a la proteína Z como el represor de este proceso en la etiología de la disgenesia gonadal pura 46,XY, puede ser posible que la secuencia con la que interacciona la proteína SRY tenga mutaciones y de esta manera evitar la represión de la síntesis de Z. En este caso, aún en presencia de SRY funcional, los individuos 46,XY tenderán a la reversión sexual y a la disgenesia gonadal pura. También puede ser posible que la proteína SRY polimórfica no actúe al 100% y no alcance el umbral necesario. Este modelo también explicaría la penetrancia incompleta de esas mutaciones (McElreavey y cols.; 1993b).

Sin embargo, la mayoría de los pacientes con DGP 46,XY no presentan alteraciones en el gen SRY. La reversión sexual observada en estos individuos puede atribuirse a mutaciones en loci del cromosoma X o autosomas que participan en la cascada de diferenciación testicular (Pivnick y cols., 1992).

1.3.1.2 Disgenesia gonadal mixta

Este síndrome está definido por la determinación testicular completa de un lado y por la presencia de una estria fibrosa en el otro lado. Este patrón gonadal se asocia con buen desarrollo de ductos müllerianos del lado de la estria y los respectivos wolffianos del lado donde se encuentra el testículo (Berkovitz, 1992).

El cariotipo más frecuente encontrado en la disgenesia gonadal mixta (DGM) es el 45,X/46,XY. El desarrollo gonadal asimétrico en sujetos con DGM 45,X/46,XY se considera relacionado a la proporción relativa de células 45,X y 46,XY presentes en la cresta genital. Sin embargo, existen otros complementos cromosómicos como 46,XY, 45,X/47,XY y 46,XX/47,XXY (Berkovitz, 1992; Méndez y cols., 1993). La causa del mosaicismo es considerada como la pérdida del cromosoma Y por no disyunción (Kofman-Alfaro y cols., 1984).

La mayoría de los pacientes se evalúan al nacer por ambigüedad genital. El grado de masculinización de los genitales externos del paciente depende de la extensión en la diferenciación testicular (Berkovitz y cols., 1991).

La producción de testosterona, determinada por los niveles basales de la hormona o después de la estimulación con gonadotropina coriónica humana es variable, pero frecuentemente se halla disminuida (Berkovitz, 1992; Méndez y cols., 1993).

De manera típica, los individuos afectados tienen una mezcla de estructuras müllerianas y wolffianas que reflejan la producción de la hormona antimülleriana y testosterona *in utero*. Un gran número de pacientes con DGM también presenta estigmas del síndrome de Turner (Berkovitz y cols., 1991; Méndez y cols., 1993).

Los individuos con DGM 45,X/46,XY presentan un rango amplio de fenotipos, aunque la mayoría presentan ambigüedad genital (Robboy y cols., 1982). Sin embargo, muchos individuos con DGM 45,X/46,XY tienen un fenotipo masculino normal y pueden ser fértiles, mientras algunos tienen un fenotipo completamente femenino y estrias fibrosas bilaterales. Más de la mitad de esos

sujetos tienen talla baja y en aproximadamente un tercio de ellos se encuentran estigmas del síndrome de Turner (Berkovitz, 1992).

El diagnóstico prenatal ha hecho posible determinar más precisamente la prevalencia de varias presentaciones clínicas entre individuos con mosaicismo 45,X/46,XY. En un estudio de 76 casos de DGM 45,X/46,XY, 72 de ellos tenían genitales externos masculinos normales. De entre los 4 restantes, todos tenían ambigüedad genital, 3 presentaron hipospadias y el último desarrolló genitales femeninos con moderada clitoromegalia. Los sujetos con genitales masculinos normales, se analizaron histológicamente y en 27 casos se hallaron anormalidades testiculares. Este estudio indica que la gran mayoría de casos de DGM 45,X/46,XY tienen fenotipo masculino normal, pero en muchos de ellos se esperan signos de disfunción gonadal (Chang y cols., 1990).

El diagnóstico de DGM se sospecha en un niño con genitales ambiguos, concentraciones plasmáticas subnormales de testosterona y ausencia de precursores de esta hormona acumulados en el plasma. La presencia de estructuras müllerianas y wolffianas en el ultrasonograma incrementa la sospecha de éste padecimiento. El diagnóstico se confirma por la histología gonadal (Berkovitz, 1992).

Como en todos los casos en que se encuentran gónadas disgenéticas o estrías fibrosas asociadas a la presencia de cromosoma Y, los individuos con DGM se encuentran muy propensos a desarrollar gonadoblastomas y disgerminomas. Se ha estimado la frecuencia de neoplasias gonadales en ~ 25% en estos pacientes (Robboy y cols., 1982). Se recomienda la realización temprana de una laparotomía, debido al alto riesgo de que las gónadas disgenéticas originen tumores, y porque se ha reportado gonadoblastoma en un niño con DGM a los 15 meses de edad (Olsen y cols., 1988).

Si el asignamiento de género es femenino, se remueve quirúrgicamente tanto el tejido gonadal como las estructuras wolffianas. Cuando se asigna sexo masculino, se recomienda eliminar las estructuras müllerianas junto con las estrías

fibrosas y los testículos intrabdominales para prevenir la aparición de neoplasias. Los testículos intraescrotales pueden preservarse dentro del escroto, aunque en estos casos deben ser vigilados periódicamente (Berkovitz, 1992).

La DGM puede resultar como consecuencia de defectos en el gen *SRY* que disminuyan pero no eliminen su función como *TDF*, o de mutaciones en otros genes involucrados en la cascada testículo-determinante (Berkovitz, 1992).

1.3.2 Hermafroditismo verdadero

El término hermafroditismo verdadero (HV) describe una condición clínica en la cual se desarrolla tejido testicular y ovárico en el mismo individuo (Kofman-Alfaro y cols., 1992).

Para tomar en cuenta una gónada como ovario, ésta debe poseer el estroma característico y folículos primordiales, mientras que el testículo debe incluir túbulos seminíferos con células germinales (Van Niekerk y Retief, 1981). Aunque se pueden observar varios patrones gonadales, la mayoría de los pacientes presentan un ovario en un lado del abdomen y del otro lado, un testículo. La combinación de un ovotestes y un ovario contralateral, y la presencia de ovotestes bilaterales son los patrones gonadales que siguen en frecuencia, respectivamente (Van Niekerk y Retief, 1981).

El desarrollo de estructuras wolffianas y müllerianas es variable y generalmente depende de la extensión del desarrollo testicular. También dependiendo de la cantidad de tejido testicular presente, varían los grados de masculinización de los genitales externos (Berkovitz y cols., 1992), aunque generalmente al nacer predominan los genitales virilizados, y tomando como referencia el tamaño del falo, se asigna el sexo masculino en la mayoría de los casos. La ambigüedad de los genitales internos y externos es consecuencia directa de la producción hormonal de las gónadas presentes. Por lo tanto, el espectro genital externo de los pacientes con HV va desde aquellos completamente masculinos hasta los totalmente femeninos, pasando por diversos grados de

ambigüedad genital (Kofman-Alfaro y cols., 1992).

La función endócrina y gametogénica en individuos con HV, proviene de la parte ovárica del ovotestes y del ovario mismo. Tanto el tejido testicular aislado, como el integrante del ovotestes, es inactivo en gametogénesis y en producción de hormonas masculinas. Algunos hermafroditas presentan hematuria cíclica, misma que puede tomarse como periodos menstruales debidos a ovulación espontánea o inducida (Kofman-Alfaro y cols., 1992).

La frecuencia de los cariotipos observados en HV varía en diferentes poblaciones: En Europa y Africa es más común el HV 46,XX, que ocurre en aproximadamente 58% de los casos (Ramsay y cols., 1988; Berkovitz y cols., 1992; Braun y cols., 1993), mientras que existe el predominio de HV 46,XY en Japón (Van Niekerk y Retief, 1981). En occidente, el quimerismo 46,XX/46,XY se observa en ~ 14% de los pacientes. Sólo en 12% de los casos de HV se encuentra cariotipo 46,XY y el porcentaje restante corresponde a mosaicos como 46,XY/47,XXY y 45,X/46,XY (Van Niekerk y Retief, 1981; Linskens y cols., 1992). En nuestra población dos terceras partes de los pacientes presentan un cariotipo 46,XX y el resto está conformado por HV 46,XX/46,XY, 46,XY y otros mosaicos cromosómicos (Kofman-Alfaro y cols., 1992). La presentación clínica es prácticamente la misma aún en casos de HV con diversas constituciones cromosómicas (Berkovitz, 1992).

La gónada más frecuentemente observada en los casos de HV es el ovotestes, con localizaciones inguinales, intrapélvicas o labioescrotales. En 80% de los casos, los tejidos ovárico y testicular se hallan dispuestos en forma término-terminal. La mayoría de estas gónadas mixtas, tienen una línea delimitante entre los dos tejidos (Van Niekerk y Retief, 1981).

El hecho de que el tejido ovárico es firme y el testículo es suave durante la palpación, es muy valioso en la localización de las gónadas de un recién nacido con genitales externos ambiguos. Casi todos los ovotestes tienen una apariencia macroscópica diagnóstica. La porción ovárica de esta gónada tiene una superficie rugosa, mientras que la región testicular tiene una apariencia lisa y brillante (Van Niekerk y Retief, 1981).

La morfología de la porción ovárica de un ovotestes, es prácticamente normal, aunque en niños puede encontrarse una reducción de la cantidad de folículos primordiales. Es interesante señalar que en aproximadamente la mitad de los ovotestes, la parte ovárica muestra señales de ovulación. En comparación, la porción testicular es histológicamente anormal, presentando esclerosis tubular, hiperplasia de células de Leydig y abundancia de células de Sertoli en el lumen de los túbulos seminíferos. La localización del ovotestes es una función directa de la cantidad de testículo presente (Van Niekerk y Retief, 1981).

Los genitales internos dependen del tipo de gónada presente, así, se encuentra principalmente trompa en el caso de ovario u ovotestes, y epidídimo junto al testículo. Sin embargo, en cuatro casos se halló epidídimo y/o conducto deferente junto a la trompa y próximos al ovotestes, lo que sugiere que el desarrollo de estas estructuras es interdependiente (Kofman-Alfaro y cols., 1992).

La razón por la que se extirpa quirúrgicamente el ovario durante la niñez en HV con sexo de asignación masculino, es para evitar que durante la pubertad se desarrolle ginecomastia. El desbalance existente entre la producción basal de testosterona y estradiol, así como la activación del ovario, son los responsables de la ginecomastia presente en todos los casos de HV (Kofman-Alfaro y cols., 1992).

1.3.2.1 Hermafroditismo verdadero 46,XX

Dos síndromes se caracterizan por determinación testicular en sujetos con un cariotipo aparentemente normal 46,XX: el varón XX (VX) y el hermafroditismo verdadero 46,XX. En la primera condición, la determinación testicular es completa mientras que en el hermafroditismo verdadero existe reversión sexual incompleta, lo que resulta en el desarrollo de ovario y testículo. La razón por la que se incluye el hermafroditismo verdadero 46,XX junto con el varón 46,XX es porque se piensa que tienen un origen común y representan manifestaciones alternativas del mismo defecto genético (Abbas y cols., 1990).

La mayoría de los VX tienen genitales externos masculinos normales, pero en el 10% de los casos existen hipospadias. Todos los varones XX son estériles (Fechner y cols., 1993). No se conoce con exactitud la incidencia de este desorden, aunque se estima que oscila en un VX por cada 20000-25000 recién nacidos (Numabe y cols., 1992). Por lo general, los VX se detectan al nacimiento por la presencia de ambigüedad genital y durante la pubertad, debido a que acuden a consulta por ginecomastia y retardo en los caracteres sexuales secundarios. El fenotipo del sujeto adulto es similar a los pacientes con síndrome de Klinefelter excepto por la talla baja. Aunque el falo y el escroto son normales, el tamaño testicular es menor. Antes de la pubertad, la ultraestructura testicular es normal, pero en adultos hay ausencia de espermatogonias, degeneración de túbulos seminíferos e hiperplasia de células de Leydig (Berkovitz, 1992).

Los mecanismos genéticos responsables del VX 46,XX y HV 46,XX no son muy claros. Con fines prácticos, puede clasificarse a los VX 46,XX y HV 46,XX en dos grupos: aquéllos que poseen secuencias del cromosoma Y en su genoma y los que carecen de ellas (McElreavey y cols., 1992a; Van der Auwera y cols., 1992; Fechner y cols., 1993).

Cuando ambos padecimientos están asociados con la presencia de cromosoma Y pueden explicarse por la hipótesis de Ferguson-Smith (1966). Este autor propuso que durante la recombinación entre los cromosomas sexuales en la meiosis paterna existe translocación de secuencias derivadas del Y al cromosoma X paterno, mismas que incluyen a *TDF*. La presencia de tal rearrreglo en varones 46,XX y hermafroditas verdaderos 46,XX podría explicar el desarrollo testicular. También plantea que la variación en la extensión de la inactivación del cromosoma X portador de las secuencias del Y, da como consecuencia sujetos con determinación testicular completa (VX) o en otros casos, determinación incompleta (HV 46,XX) (Ferguson-Smith, 1966). Se sabe que aproximadamente el 10% de HV 46,XX y el 80% de los XX contienen secuencias Y-específicas en su genoma (McElreavey y cols., 1993b).

Desde 1986, se han reportado por lo menos nueve estudios intentando encontrar secuencias de Yp y Yq en HV 46,XX. Durante este período, se han encontrado más de 30 pacientes negativos para secuencias del cromosoma Y mediante un gran número de sondas (Vergnaud y cols., 1986; Page y cols., 1987; Ramsay y cols., 1988; Abbas y cols., 1990; McElreavey y cols., 1992a; Tho y cols., 1992). A raíz del descubrimiento de SRY, Jäger y cols. (1990b), reexaminaron 7 casos de HV 46,XX que previamente se habían reportado negativos para secuencias del cromosoma Y. Se detectó la presencia de PABY y 75 kb proximales de ADN de este cromosoma en uno de los casos.

Con respecto a los VX portadores de material derivado del cromosoma Y, se ha demostrado que algunos pacientes incluyen al gen SRY en uno de sus cromosomas X (Boucekkine y cols., 1992; Fukutani y cols., 1993).

El grupo de VX 46,XX y HV 46,XX sin secuencias del cromosoma Y en su genoma son más complicados de explicar. Generalmente, en este grupo los pacientes tienen grados variables de ambigüedad genital (Abbas y cols., 1990). Asimismo, en este grupo pueden llegar a coexistir en la misma familia, casos de HV 46,XX y VX 46,XX con anomalías genitales. En una familia se encontraron 2 VX 46,XX que tenían un primo y un tío con diagnóstico de HV 46,XX (Skordis y cols., 1987). Al estudiar a un HV 46,XX con ovotestes bilaterales, Palmer y cols., (1989) encontró que un hermano del paciente mencionado tenía cariotipo 46,XX y testículos bilaterales. En otra familia se localizaron dos casos de VX. Estos descubrimientos, han permitido postular una etiología común para ambos padecimientos (Abbas y cols., 1990). Una teoría que intenta explicar la presencia de testículos en individuos 46,XX establece que en estos pacientes existe mosaicismo críptico con líneas celulares 46,XY o 47,XXY. Sin embargo, en la mayoría de estos casos, se ha descartado esta posibilidad mediante el empleo de técnicas moleculares, aunque la gran mayoría de reportes se limitan a buscar secuencias del cromosoma Y en ADN extraído de leucocitos, sin comparar con otros tejidos (Berkovitz y cols., 1992). Como consecuencia, la atención se ha enfocado en descubrir

otras posibles etiologías para la presencia testicular en estos pacientes (Fechner y cols., 1993).

La última teoría que trata de explicar los HV 46,XX y VX 46,XX asume que en estos pacientes con grados variables de reversión sexual existen mutaciones autosómicas dominantes o ligadas al X que permiten el desarrollo testicular en ausencia de TDF (Berkovitz y cols., 1992; Fechner y cols., 1993).

Esta última teoría ha cobrado fuerza actualmente y no sólo se aplica a casos de VX y HV 46,XX (ambos *SRY* -), sino a pacientes *SRY* + con DGP 46,XY. Las pruebas de esta teoría son : asociación de reversión sexual con el síndrome WAGR (Tumor de Wilm's, aniridia y retardo mental). El locus *WT-1* para este conjunto de anomalías se ha asignado en 11p13 (Van Heyningen y Hastie, 1992). El enanismo camptomélico es un síndrome de herencia autosómica dominante caracterizado por múltiples anomalías en la formación de cartilago y hueso. Esta patología se ha encontrado asociada a DGM (Berkovitz, 1992). Finalmente, existen casos de reversión sexual en individuos con cromosoma Y intacto y deleciones terminales de 9p. Estudios detallados permiten establecer la existencia de un gen en 9p24, involucrado en desarrollo testicular (Bennett y cols., 1993). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren el papel de al menos 3 loci autosómicos en testiculogénesis (Berkovitz, 1992).

1.3.2.2 Otros complementos cromosómicos en el Hermafroditismo Verdadero

Los mecanismos genéticos productores de HV asociado a cariotipos diferentes del 46,XX son distintos a los expuestos en el capítulo anterior. Por esta razón, se considera al HV como una condición genéticamente heterogénea con una variedad de etiologías (Berkovitz, 1992; Linskens y cols., 1992).

No se ha establecido hasta ahora la etiología del HV 46,XY. El grupo dirigido por Gary Berkovitz ha propuesto que el mecanismo responsable de esta anomalía de la diferenciación gonadal es similar al productor de la disgenesia gonadal mixta 46,XY (Berkovitz y cols., 1992).

Cuando existe determinación testicular parcial a causa de la mutación en un gen involucrado en las primeras fases del desarrollo testicular, varias regiones de la cresta gonadal pueden diferenciarse hacia testículo, mientras que otras áreas no alcanzan a ser estimuladas y se convierten en ovario. Bajo tales condiciones, los folículos primordiales en el tejido ovárico pueden entrar en una etapa previa de degeneración, seguida por un período rápido de muerte celular. En este modelo, el fenotipo podría depender del tiempo en el cual existe involución ovárica: si permanecen muchos folículos primordiales, la condición resultante se llama HV, pero si el parénquima ha desaparecido totalmente y sólo se encuentra tejido estromático, entonces se habla de disgenesia gonadal. Esto implica que un ovoteste y una gónada disgenética pueden ser diferentes presentaciones de un mismo proceso etiológico (Berkovitz, 1992).

Recientemente se reportó un caso muy interesante de HV 46,XY. El paciente con sexo de asignación femenino y ovotestes bilaterales imbricados, presentó dos mutaciones puntuales en la caja HMG del gen SRY en ADN obtenido de las gónadas. Una de las mutaciones era silenciosa, mientras que la otra (sustitución de leucina por histidina) se tomó como el mecanismo responsable del padecimiento. No se encontraron tales mutaciones cuando se analizó el ADN extraído de sangre del paciente y de su padre. Los autores plantean que este fenotipo es consecuencia directa de la citada mutación poscigótica, debida probablemente al efecto mutagénico de ciertos disolventes orgánicos, a los cuales estuvo expuesta la madre durante el embarazo (Braun y cols., 1993).

Los HV portadores de más de una línea celular permiten explicar más fácilmente el origen de las gónadas. El quimerismo 46,XX/46,XY hallado en un porcentaje de HV, puede provenir de una doble fertilización, intercambio de células entre gemelos dicigóticos de diferente sexo, o por errores mitóticos poscigóticos. En estos pacientes y en aquéllos con HV relacionado a mosaicismo 45,X/46,XY, la determinación gonadal anormal puede deberse a la relación entre el número de células que contienen un cromosoma Y y aquéllas que carecen del mismo (Linskens y cols., 1992). Por esta razón, existe la hipótesis de que la DGM 45,X/46,XY tiene una forma de HV *in utero* (Berkovitz, 1992).

1.4 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés "Polymerase Chain Reaction") ha venido a revolucionar la biología molecular, ya que permite la amplificación selectiva de una sola molécula de ADN o ARN en millones de veces en unas cuantas horas (Saiki y cols., 1985; Mullis y Faloona, 1987).

Esta metodología permite analizar *in vitro* secuencias específicas de un gen a partir de una gran variedad de fuentes biológicas como sangre deshidratada, tejidos frescos, raíces de cabello, muestras de tejidos incluidos en soportes sólidos e incluso muestras tan antiguas como momias y más aún, de animales hoy extintos.

1.4.1 Fundamento de la reacción

Este procedimiento está basado en la realización de ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN molde, el alineamiento de dos oligonucleótidos con las secuencias complementarias al ADN de interés, y la extensión de las cadenas de ADN a partir del extremo 3'-OH de cada oligonucleótido mediante la actividad de una ADN polimerasa. De esta manera, la amplificación de una secuencia determinada está definida por la función exponencial 2^n donde n es el número de ciclos (Mullis y Faloona, 1987).

1.4.2 Los ciclos

Si la secuencia a amplificar se localiza en ADN genómico, las dos cadenas se encuentran apareadas formando una doble hélice. La manera de separar las cadenas es el calentamiento a 95°C aproximadamente durante un minuto. Al enfriar y mantener la mezcla de reacción entre 40 y 60°C durante un minuto, los dos oligonucleótidos se alinean con las secuencias complementarias del ADN molde, lo que permite el inicio de la síntesis de la cadena complementaria por la ADN polimerasa cuando la solución se

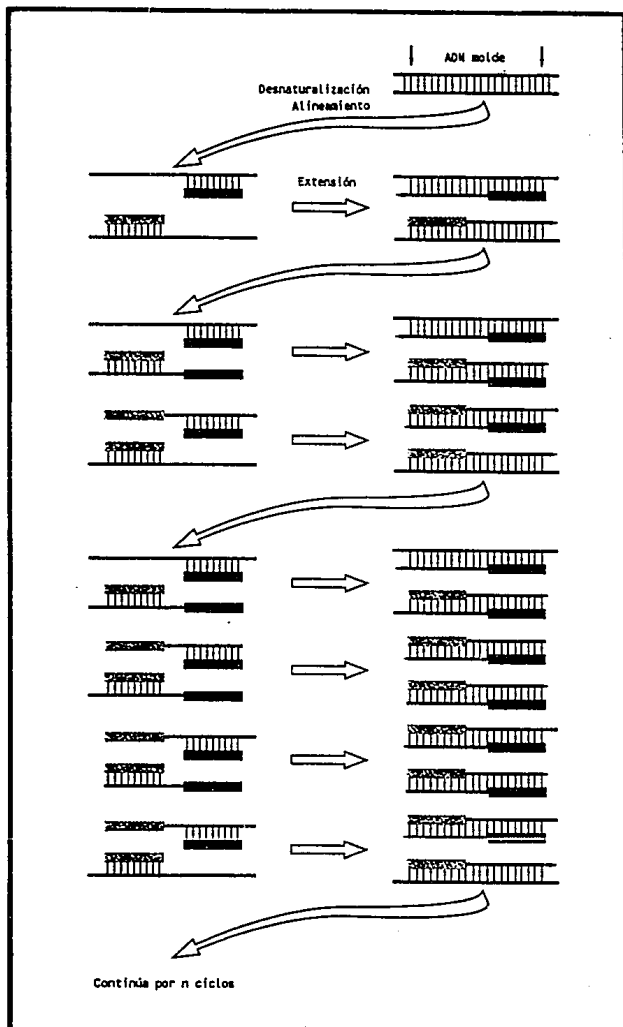


Figura 1.4 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Tomado de Thompson y cols, 1991.

calienta a 72°C y se mantiene así durante otro minuto. Al conjunto de estas etapas se le conoce como un ciclo de amplificación (Innis y cols., 1990).

El tiempo de incubación a 72°C varía de acuerdo a la longitud del producto deseado, aunque una regla empírica señala que por cada kilobase de secuencia esperada se debe incubar la mezcla de reacción un minuto en cada ciclo. Es posible eliminar el paso de extensión si la secuencia por amplificar es menor o igual a 150 pares de bases. La enzima retiene actividad significativa a bajas temperaturas y la síntesis completa puede ocurrir durante la transición entre el alineamiento y la desnaturalización (White, 1993).

Generalmente, el primer ciclo de amplificación es precedido por un paso de desnaturalización prolongado a 95°C por lo menos durante 5 minutos, con la finalidad de separar por completo las cadenas del ADN. Después de transcurrir el número deseado de ciclos de amplificación, la mezcla de reacción se incuba a 72°C entre 5 y 10 minutos para permitir que los fragmentos amplificados se encuentren como dobles cadenas (Innis y cols., 1990).

En la mayoría de los casos, las secuencias amplificadas se obtienen en cantidades suficientes para su análisis electroforético en geles de agarosa o poliacrilamida, dependiendo de la resolución deseada. Los geles de agarosa frecuentemente incorporan bromuro de etidio en su matriz y debido a esta característica, permiten la visualización de las bandas obtenidas bajo luz ultravioleta a ~ 300 nm. Sin embargo, en ocasiones los productos de PCR no pueden analizarse de esta manera debido a la baja cantidad de muestra. En estos casos debe realizarse hibridación con oligonucleótidos internos a la secuencia amplificada (White, 1993).

La desnaturalización es el paso crítico del ciclo típico de PCR, ya que de ella depende la disponibilidad de cadenas sencillas y por lo tanto, el apareamiento de los oligonucleótidos a las secuencias complementarias. Además la temperatura de alineamiento determina la especificidad de la reacción, debido a que las temperaturas bajas originan apareamientos inespecíficos, que traen

como consecuencia la amplificación de secuencias no deseadas; por otra parte, la temperatura de alineamiento demasiado alta evita la unión de los oligonucleótidos al ADN resultando en una falta de amplificación (Arredondo-Peter, 1993).

Ciertamente el número de copias generadas durante la reacción de PCR es muy grande, pero no es infinito. Después de un cierto número de ciclos, el producto deseado se acumula exponencialmente hasta que entra en una fase lineal o fase estacionaria. Lo anterior se conoce como efecto meseta. A partir de este punto, conforme aumenta el tiempo desaparece el producto amplificado debido fundamentalmente a la actividad exonucleasa 5'3' de la Taq polimerasa (Sardelli, 1993).

El desarrollo tecnológico y el uso de las ADN polimerasas termoestables han permitido la automatización de todo el proceso y en la actualidad se cuenta con una gran diversidad de equipos llamados termocicladores que efectúan los ciclos de temperatura de manera automática y con gran precisión (Perkin-Elmer, 1992).

1.4.3 Los componentes de la reacción

La composición básica de una mezcla de PCR incluye al ADN molde, el amortiguador de amplificación, los oligonucleótidos, ADN polimerasa y los trifosfatos de desoxirribonucleótidos.

a) ADN molde

Puede estar en forma pura o más comúnmente estar mezclado con otras biomoléculas y además puede presentar degradación parcial. Estas dos características han permitido el uso de ADN de diversas muestras como las ya señaladas (Arredondo-Peter, 1993).

Las secuencias ideales para someterse a PCR tienen entre 150 y 500 pb de longitud, aunque otras más grandes como 2 kb, pueden ser amplificadas eficientemente. Es conveniente que la secuencia elegida sea única, de esta manera se evitan competencias indeseables. Asimismo, se recomienda que esta secuencia única se encuentre en cantidades entre 0.1 y 1.0 microgramos para minimizar

el número de ciclos de amplificación requeridos. Aunque la sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa es muy grande, el riesgo de contaminación con trazas de ADN se incrementa cuando el número de copias originales es bajo (White, 1993).

b) El amortiguador

La solución amortiguadora estándar para PCR tiene la composición siguiente: KCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8.4; MgCl₂ 1.5 mM y 100 µg de gelatina por mililitro de solución (Innis y cols., 1990). Destaca de entre estos componentes la concentración de Mg²⁺ ya que la eficiencia y la especificidad de la reacción dependen de este parámetro, especialmente sobre la actividad de la ADN polimerasa. Los mejores resultados se obtienen cuando la concentración de este ion varía en el intervalo de 1.5 a 4 mM, considerando que la concentración de EDTA deberá ser baja porque puede complejar al Mg²⁺. Aunque en la composición del amortiguador de PCR no aparece el EDTA, se menciona porque se encuentra comúnmente en los amortiguadores de disolución de ADN (Erllich, 1989). Altas concentraciones de Mg²⁺ y de otros iones monovalentes inhiben a la *Taq* polimerasa: 40-50% de la enzima pierde su actividad cuando MgCl₂ ~ 10 mM. En cambio, se observa un incremento en la velocidad de síntesis de esta polimerasa cuando la concentración de KCl es de 50 mM, mientras que si este límite se rebasa, se presenta inhibición enzimática (Innis y cols., 1990).

c) Los oligonucleótidos

Para llevar a cabo cualquier amplificación por PCR deben diseñarse un par de oligonucleótidos sintéticos que hibriden con regiones del ADN molde y que se localicen en los extremos de la región de interés. Cada oligonucleótido se debe orientar con su extremo 3'OH hacia el otro, es decir, deben estar encontrados y ser complementarios para ambas cadenas del ADN molde. La longitud promedio de los oligonucleótidos oscila entre 15 a 30 nucleótidos

y su secuencia debe presentar la mayor similitud posible con la región que se pretende amplificar. Debe evitarse que ambos oligonucleótidos tengan secuencias complementarias entre sí principalmente en los extremos 3'-OH porque fomentan la concatenación entre ellos. Generalmente la distancia promedio de un oligonucleótido al otro oscila entre 100 y 1000 pb, delimitando así la secuencia por amplificar (Innis y cols., 1990).

El contenido de G+C en los oligonucleótidos es el principal determinante de la temperatura de fusión: un aumento en la proporción de estas dos bases es directamente proporcional al incremento de Tm o temperatura de fusión (Tm corresponde a la temperatura a la cual la mitad del ADN se encuentra como cadenas sencillas) (Sambrook y cols., 1989).

Es recomendable determinar el valor de Tm para cada par de oligonucleótidos, ya que este valor es necesario para calcular la temperatura teórica de alineamiento según la ecuación:

$$T_a = T_m - 5^{\circ}\text{C} = 2(A+T) + 4(G+C) - 5^{\circ}\text{C}$$

Donde Ta es la temperatura teórica de alineamiento (Arredondo-Peter, 1993). Normalmente el valor de Ta oscila entre 55-65°C, sin embargo según las características del sistema de amplificación, Ta puede variar significativamente hasta alcanzar valores fuera del intervalo mencionado. La práctica general consiste en mantener a los oligonucleótidos en la solución de amplificación a una concentración entre 0.1 y 1.0 mM de cada uno de ellos (Erich, 1989). En el diseño de los oligonucleótidos, pueden incluirse sitios de restricción, útiles para la clonación del producto amplificado en caso necesario (White, 1993).

d) ADN polimerasa

Durante la reacción de síntesis de una cadena de ADN, la ADN polimerasa incorpora desoxirribonucleótidos (dNTPs) al formar un enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo libre en el extremo 3' de la cadena naciente y el grupo fosfato en 5' del nucleótido

entrante. La energía para esta reacción proviene de la hidrólisis del fosfato gamma de cada dNTP que se incorpora (Ausubel y cols., 1990).

Todas las ADN polimerasas necesitan un oligonucleótido cebador que se encuentre en el lugar de inicio de la síntesis de la cadena complementaria al ADN molde. El oligonucleótido cebador es un pequeño fragmento iniciador de ARN que proporciona el extremo 3'-OH libre para que actúe la enzima. Asimismo, todas las ADN polimerasas trabajan en dirección 5'»3' (Sambrook y cols., 1989).

El grupo que desarrolló la metodología de PCR a mediados de la década pasada, empleó al fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* para catalizar la extensión del fragmento deseado a 37°C. Obviamente en el siguiente paso desnaturizante, la enzima perdía su actividad y en el próximo ciclo había la necesidad de agregar una nueva cantidad de enzima, lo cual resultaba en un procedimiento laborioso y costoso (Saiki y cols., 1985; Mullis y Faloona, 1987).

Poco después se utilizó la *Taq* ADN polimerasa, la enzima termoestable proveniente de *Thermus aquaticus*, una bacteria que crece en aguas termales a 70-75°C (Saiki y cols., 1988). A partir de este descubrimiento, *Taq* es la ADN polimerasa más utilizada en PCR, tanto en su forma nativa extraída de *T. aquaticus*, o la recombinante obtenida de *E. coli*, conocida como AmpliTaq ADN polimerasa (Innis y cols., 1990).

El nombre genérico de esta enzima es EC 2.7.7.7 desoxinucleósido trifosfato: ADN desoxinucleotidiltransferasa. La *Taq* polimerasa tiene 832 aminoácidos con un peso molecular de 93.91 kDa, y una actividad específica de 200000 U/mg [U es la cantidad de enzima requerida para incorporar 10 nanomoles de desoxirribonucleótidos en material ácido insoluble durante 30 minutos a 74°C, usando un ADN molde activado de esperma de salmón (Perkin-Elmer, 1992)]. Su temperatura óptima se encuentra entre los 75 y 80°C, y es una polimerasa con alta procesividad debido a que la velocidad de incorporación de nucleótidos K_{cat} , es de unos 150 nucleótidos por segundo (La procesividad es la capacidad de

una polimerasa para incorporar nucleótidos continuamente desde el cebador, sin disociarse del ADN molde). Como característica importante, la *Taq* polimerasa conserva el 50% de su actividad después de 130, 40 y 6 minutos a 92.5, 95 y 97.5°C, respectivamente. Además de los nucleótidos ordinarios, la *Taq* polimerasa puede incorporar análogos como 5'-trifosfato de 7-deaza-2'-desoxiguanosina (Innis y cols., 1990; White, 1993).

En los últimos años se han introducido nuevas ADN polimerasas termoestables para ser usadas en PCR. Tal es el caso de la enzima aislada de la bacteria termofílica *Thermus thermophilus* (*Tth*) o la *Tma* polimerasa proveniente de *Thermotoga maritima*, una bacteria que crece a temperaturas superiores a 90°C (Erich y Arnheim, 1992). Más recientemente se inició la comercialización de otra enzima termoestable: *Vent* polimerasa, purificada a partir de cepas de *Thermococcus litoralis* (Cease y cols., 1994).

Estas ADN polimerasas difieren en términos de su perfil de actividad, procesividad y resistencia a la temperatura. Algunas de estas enzimas como por ejemplo la *Taq* polimerasa, tiene actividad de exonucleasa 5'»3' pero carece de esta función en sentido 3'»5'; otras ADN polimerasas termoestables tienen actividad de exonucleasa en ambos sentidos (Erich y Arnheim, 1992). Recientemente se han lanzado al mercado variantes obtenidas por ingeniería genética, como ha sido el fragmento Stoffel de la *Taq* polimerasa, que no tiene la actividad de exonucleasa 5'»3' de la enzima nativa y es prácticamente insensible a concentraciones altas de Mg^{2+} (Perkin-Elmer, 1992).

La elección de la ADN polimerasa depende de las aplicaciones particulares y de las propiedades de cada enzima. Por ejemplo, la *Tth* polimerasa tiene actividad de transcriptasa reversa en presencia de manganeso divalente, permitiendo en un solo tubo de reacción la síntesis de ADNc a partir de un molde de ARN, seguido por PCR para amplificar el ADNc una vez que el manganeso ha sido reemplazado por iones magnesio (Erich y Arnheim, 1992).

Un parámetro importante de las ADN polimerasas es la fidelidad. Este parámetro mide la exactitud de la reacción de síntesis y por lo tanto, refleja los errores cometidos por la

polimerasa. Cuando se hace secuenciación usando PCR, la fidelidad es muy importante, ya que un error de la polimerasa puede observarse como una mutación en el ADN problema. En casos como éste, debe repetirse el ensayo con otra enzima antes de tener un resultado contundente. La alta fidelidad de algunas enzimas es consecuencia de la actividad de exonucleasa 3'»5' correctora de pruebas, por lo que estas enzimas pueden ser la elección para fines de secuenciación (Gelfand y Sninsky, 1993).

e) Los trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dNTPs)

Los trifosfatos de desoxirribonucleótidos son los monómeros que la ADN polimerasa incorpora en la cadena complementaria al molde de ADN.

Es importante la concentración de dNTPs en la reacción de amplificación, ya que a bajas concentraciones podría reducirse la eficiencia del proceso por reactivos limitantes. En cambio las concentraciones altas de dNTPs alteran significativamente los niveles de Mg^{2+} libres en la reacción, por la formación de complejos dNTP-Mg. Si la concentración de cada dNTP excede los 50 mM, hay inhibición total de la actividad de la Taq polimerasa (Erich y Arnheim, 1992).

La concentración recomendada para cada dNTP es de 200 μ M; sin embargo, es importante mantener la concentración equimolar entre los cuatro dNTPs, para evitar que la Taq polimerasa incorpore algún dNTP equivocado en determinadas posiciones, y de esta manera incrementar la tasa de error de la enzima por nucleótido polimerizado. La tasa de error de incorporación se calcula dividiendo la unidad entre el número de bases a la cual ocurre una mutación (Gelfand y Sninsky, 1993).

Se ha calculado la tasa de error experimental de la Taq polimerasa en 1.5×10 y 0.7×10 para sustituciones o cambios del marco de lectura, respectivamente (Erich, 1989).

En términos metodológicos, es importante definir lo que se conoce como condiciones estándares en PCR: Tris-HCl 10 mM, pH 8.3; KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 200 μ M/cada uno y 2.5 unidades de

Tag polimerasa, usando un termociclador con el siguiente perfil térmico: un minuto a 94°C para la desnaturalización, un minuto a 55°C para el alineamiento y un minuto a 72°C para la extensión (Gelfand y Sninsky, 1993).

Las condiciones antes expuestas no siempre dan los mejores resultados por lo que se debe optimizar cada una de las variables mencionadas anteriormente (Wages y Fowler, 1993).

Inicialmente, para el cloruro de magnesio deberá hacerse una curva de concentración creciente, empezando generalmente en 1.5 mM hasta 4 mM con un incremento de 0.5 mM cada vez y observando si en cada concentración existe o no amplificación. La concentración en la cual se observa mejor el producto deseado, es la que deberá usarse para posteriores reacciones. Cabe señalar que la optimización de la concentración de $MgCl_2$ deberá hacerse siempre que se usen nuevos oligonucleótidos o reactivos de otro fabricante (Wages y Fowler, 1993).

En cuanto a los dNTPs, frecuentemente basta con ajustar la concentración de cada nucleótido a 200 μM para tener los mejores resultados. En caso de no ser así, deberá buscarse la concentración óptima, que será la misma para los cuatro nucleótidos (Wages y Fowler, 1993).

El rendimiento de la reacción puede abatirse si se usan cantidades menores a 1.5 Unidades de enzima. Es conveniente usar entre 1.5 y 3.0 Unidades de Tag polimerasa para obtener los mejores resultados. Con altas concentraciones de enzima se fomenta la síntesis de productos inespecíficos e incluso la desaparición de la banda esperada si el número de ciclos es mayor a 40 (Sardelli, 1993).

Aunque no toma parte en la reacción de amplificación, el aceite mineral tiene una importante función en PCR. Evita que durante los pasos de desnaturalización se evapore el agua en la cual están disueltos todos los componentes de la reacción y se alteren las concentraciones de todos ellos. El aceite mineral puede adicionarse cuando todos los reactivos se encuentran en la solución de amplificación o antes de agregar la enzima, modalidad que se conoce como "Hot Start" PCR. Este procedimiento permite una

desnaturalización extensiva sin pérdida de actividad de la *Taq* polimerasa, misma que se incorpora a la mezcla de reacción cuando la temperatura desciende entre 70-80°C (D'Aquila y cols., 1991).

Una comunicación reciente menciona que el uso de aceite mineral como recubrimiento de las mezclas de PCR puede acarrear la formación de amplificadores inespecíficos y que tales contaminaciones pueden minimizarse si se emplea parafina de alta pureza (Hébert y cols., 1993). Las nuevas generaciones de termocicladores prescinden del aceite mineral como recubrimiento y en su lugar se emplean ceras inertes (Perkin-Elmer, 1992).

Además del análisis electroforético convencional, es posible realizar detecciones colorimétricas de los productos amplificados si los oligonucleótidos acarrear ligandos tales como la biotina. En tal procedimiento, el ADN amplificado se transfiere a un soporte sólido que tiene en su superficie proteínas de anclaje para el oligonucleótido y se adiciona avidina conjugada con peroxidasa. La alta afinidad de la avidina por la biotina permite una unión específica. Finalmente se adiciona un cromógeno junto con H_2O_2 para el desarrollo de color (Kemp y cols., 1989).

Una manera más fina de detección es realizar secuenciación para saber si el producto amplificado es la secuencia esperada y para analizar la presencia de posibles mutaciones (Bevan y cols., 1992).

La gran sensibilidad de PCR representa su principal ventaja aunque también acarrea algunos problemas. Permite debido a esta característica tanto la amplificación de secuencias que se encuentran repetidas varias veces dentro de un genoma, como la detección de secuencias de copia única. También por esta razón, puede amplificar moldes no deseados que se encuentran como contaminantes en el medio ambiente o en el material de laboratorio usado durante la preparación de las muestras. Se ha aconsejado que el lugar donde se mezclan los componentes de PCR esté separado físicamente del sitio donde se encuentra el termociclador, y que a su vez el análisis de los productos de la reacción se lleve a cabo en otro laboratorio, para así disminuir en lo posible la contaminación. Se han usado varios métodos para eliminar el ADN

extraño de la mezcla de reacción, como la irradiación gamma o con luz ultravioleta, esterilización en autoclave y mediante tratamiento enzimático de la solución reactiva sin el ADN molde con varias nucleasas, todos ellos sin resultados absolutamente convincentes (Bélak y Ballagi-Pordány, 1993).

1.4.4 Aplicaciones de PCR

El impacto de esta metodología en las ciencias biológicas ha sido de tal magnitud, que descripciones detalladas de cada una de las aplicaciones de PCR, se encuentran en libros dedicados sólo a esta tecnología (Erlich 1989, Innis y cols., 1990; White, 1993). Aquí sólo se mencionan brevemente algunos usos de PCR.

Con justa razón, entre un 70 y 80% de las aplicaciones de PCR reportadas en la literatura, están enfocadas a la detección de agentes patógenos, en particular virus y bacterias. Esto es posible debido a que se ha caracterizado de manera total en algunos casos y parcial en otros, el genoma de los patógenos más frecuentes; tomando en consideración durante el diseño de los oligonucleótidos aquellas secuencias conservadas a través de la evolución (Erlich, 1989). Este procedimiento tiene la gran ventaja de ser versátil, sencillo, sensible y rápido cuando se compara con los métodos tradicionales de análisis que implican reacciones metabólicas, tinciones específicas, serología e inclusive algunos procedimientos histológicos (Arredondo-Peter, 1993).

Uno de los campos principales de PCR en el diagnóstico clínico es la detección de secuencias del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) que causa SIDA. Otro virus ocupa también un campo importante de aplicación de PCR: el papilomavirus humano (HPV), asociado a ciertos tipos de cáncer cérvico-uterino (Arredondo-Peter, 1993).

Recientemente, estas aplicaciones clínicas de PCR se han favorecido en gran medida con el desarrollo de procedimientos que permiten llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de interés, inclusive a partir de muestras que se han procesado histológicamente y que se conservan como laminillas. La variante

que permite estas aplicaciones se conoce como PCR *in situ*, y resulta de mucha utilidad para el análisis retrospectivo (Bagasra y cols., 1992; Gressens y Martin, 1994).

No sólo puede amplificarse ADN por PCR, sino que es posible extender esta metodología también al ARN. En estudios de expresión génica es conveniente saber si existe o no algún ARNm de interés, y en caso de existir transcrito, es deseable conocer el nivel de expresión del gen codificante. Ambas interrogantes pueden ser resueltas por PCR. En la primera de ellas, el ARNm de interés se incuba en un medio apropiado con transcriptasa reversa, para sintetizar el correspondiente ADNc. La molécula de ADNc puede servir de molde en la reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos adecuados. El proceso de retrotranscripción acoplado a PCR se conoce con las siglas RT-PCR. El sistema de detección puede ser tan simple como la observación bajo luz UV de los productos separados por electroforesis o en casos necesarios, puede realizarse hibridación con oligonucleótidos internos que sirven como sondas (Innis y cols., 1990).

Con respecto al estudio de niveles de expresión, existe una metodología diseñada para este propósito y que se denomina PCR cuantitativo (Innis y cols., 1990). Inicia con un proceso de retrotranscripción, seguido por amplificación del ADNc con el par de oligonucleótidos adecuados. El producto de la reacción se separa en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se fotografía. De manera alternativa, se hibrida el fragmento que se amplificó, con una sonda marcada complementaria con alguna región interna. De esta manera, cuando la amplificación de la muestra problema se lleva a cabo simultáneamente con controles de concentración conocida, es posible determinar el nivel de expresión de un gen. Este procedimiento ha sufrido muchas modificaciones, entre las cuales sobresale la amplificación de un ADN molde que compete con el fragmento de interés, de manera que al adicionarlo en cantidades variables a las mezclas de PCR que contienen una cantidad fija de ADN de interés, y al utilizar el mismo par de oligonucleótidos para ambos fragmentos de ADN, puede calcularse el nivel de amplificación de este último, al comparar

densitométricamente la intensidad de las bandas generadas. La distinción entre ambos amplificados está dada por los diferentes tamaños al resolver la mezcla en gel de agarosa. El número de moléculas de la muestra inicial se determina para aquella coamplificación en donde la proporción del gen competitivo con el molde sea igual a 1 (Arredondo-Peter, 1993). Esta modalidad cuantitativa ha sido denominada PCR competitivo (Innis y cols., 1990; White, 1993).

Una vez amplificada cierta región, en el paso siguiente se procede a su análisis, con métodos tales como secuenciación o clonación del fragmento en algún vector. Este último procedimiento puede facilitarse si durante el diseño de los oligonucleótidos se incorporan sitios de restricción en los extremos 5' de tal manera que después de realizar PCR es posible clonar las secuencias amplificadas aprovechando estos sitios de restricción en el vector (Erlich y Arnheim, 1992).

La aplicación de PCR en terrenos forenses y legales está basada en la variabilidad genética que existe entre los individuos, además de la gran sensibilidad del método, lo que ha permitido amplificar fragmentos a partir de cantidades tan pequeñas de ADN como las que se encuentran en sangre seca, células epiteliales, semen e incluso de raíces de cabello. Con esta metodología ha sido posible exonerar o culpar a un individuo entre un grupo de sospechosos de haber cometido algún crimen (Innis y cols., 1990).

Otras aplicaciones de PCR incluyen la detección de secuencias de enterobacterias, durante los análisis de contaminantes del agua, y estudios de variabilidad genética entre poblaciones de la misma especie (White, 1993).

1.5 La técnica histológica de la parafina

Independientemente de la razón, siempre que se extirpa un tejido de un individuo se realiza un examen histológico de rutina y se conserva la pieza. En la gran mayoría de los casos, el tejido se somete a una fijación inicial seguida de otros procedimientos

para concluir en la inclusión en un soporte sólido, generalmente parafina. La técnica histológica de la parafina se encuentra resumida en la Figura 1.5.

Dentro del contexto metodológico, la fijación del bloque de tejido es uno de los pasos cruciales. La fijación se refiere al proceso de conservación morfológica y estructural propiciado por una solución fijadora, la cual permite analizar morfológicamente al tejido después de la muerte celular. Los fijadores deben poseer varias características para usarse en el laboratorio de Histología. Deben inactivar los sistemas enzimáticos, especialmente aquéllos que causan autólisis, como los contenidos lisosomales. Un buen fijador favorece la deshidratación y la tinción del tejido, ya que vuelve insolubles los componentes tisulares y además actúa como mordente. Posee además la capacidad de impedir las alteraciones osmóticas y por este hecho previene la ruptura de las estructuras durante el procedimiento. Al desnaturalizar y precipitar las proteínas provoca el endurecimiento del tejido, y así facilita el corte. Los fijadores químicos se clasifican de acuerdo a su poder oxidorreductor en oxidantes como los compuestos de osmio y mercurio, además de algunos ácidos orgánicos, y en reductores como el etanol, acetona y formaldehído. Algunos fijadores son específicos para determinadas estructuras celulares y tisulares, por ejemplo la solución de Bouin es usada para la fijación de tejidos embrionarios (CPEP, 1988).

El fijador más utilizado en Histología es el formaldehído diluido al 10%, solución conocida como formalina. Este fijador se introduce a la célula por difusión y a través de su grupo carbonilo provoca una gran cantidad de reacciones con las biomoléculas (CPEP, 1988). El formaldehído produce en los ácidos nucleicos la formación de bases de Schiff con los grupos amino libres de los nucleótidos y la exposición de nucleoproteínas a este agente químico provoca enlaces cruzados entre el ADN y las proteínas. El hecho de que estos procesos son reversibles en solución acuosa, sugiere que el ADN puede recuperarse del tejido fijado con formaldehído (Dubeau y cols., 1986).

Bloque de tejido (obtenido por biopsia o necropsia)

Fijación (con formalina neutra)

Lavado (con agua)

Deshidratación (con etanol 80%, 96% y 100%)

Aclaramiento (con xileno)

Infiltración (con parafina fundida)

Inclusión (con parafina fundida)

Corte (entre 5-10 μm en un microtomo)

Tinción (con hematoxilina y eosina)

Figura 15 La técnica histológica de la parafina.

Entre paréntesis se encuentran las condiciones empleadas generalmente.

Tomado de CPEP, 1988.

Generalmente, todos los pasos de la técnica histológica de la parafina excepto la inclusión y el corte, se efectúan en un aparato llamado Histokinette, equipado con varios recipientes donde se colocan los reactivos necesarios y además, puede programarse para realizar los cambios del tejido de un frasco a otro de manera automática (CPEP, 1988).

El último paso consiste en el corte. Este se efectúa en aparatos llamados microtomos. Tres aspectos son importantes para un buen corte: el tipo y condiciones de la cuchilla, la velocidad de corte y el espesor del tejido cortado. La cuchilla deberá estar limpia, sin muescas y fría para evitar la fusión de la parafina ocasionada por altas velocidades de corte. Para fines histológicos el espesor del corte es muy importante, siendo el intervalo usado entre 5 y 10 mm (CPEP, 1988).

El destino acostumbrado de los cortes es teñirse con hematoxilina y eosina, y ser analizado bajo los objetivos de un microscopio. Una vez que el diagnóstico histológico se ha realizado, el tejido pasa a ser un bloque más dentro del archivo biológico (CPEP, 1988). Por esta razón, la contribución de Goelz es muy importante, porque marcó la pauta para realizar estudios retrospectivos a nivel molecular en tejidos incluidos en parafina (Goelz y cols., 1985; Shibata y cols., 1988a).

1.6 Extracción de ADN de tejido incluido en parafina

En 1985 Goelz y colaboradores intentaron con buen éxito la extracción de ADN de tejidos fijados en formaldehído e incluidos en parafina por los procesos histológicos ordinarios. Este estudio pretendía estudiar el genoma en células de carcinoma colorectal humano y la idea original de usar los bloques de tejido incluido en parafina surgió como consecuencia de la baja frecuencia de recolección de tejido fresco y de la posibilidad de realizar estudios retrospectivos. Una gran cantidad de muestras de este tumor y muchos otros, se encontraban almacenadas en los archivos patológicos de los hospitales, hecho que motivó a este grupo a buscar un método para extraer ADN genómico de estos tejidos y

usarlo primero en hibridación ADN-ADN tipo Southern y tipo "dot blot", y posteriormente en hibridación *in situ* (Goelz y cols., 1985).

Los procedimientos convencionales para extraer ADN de bloques embebidos en parafina incluyen varios pasos, el primero de los cuales corresponde a la eliminación de la parafina. El número de cortes y el grosor de los mismos varían de acuerdo a las necesidades de cada autor (Goelz y cols., 1985; Dubeau y cols., 1986; Impraim y cols., 1987; Shibata y cols., 1988a; Greer y cols., 1991; Kallio y cols., 1991). La desparafinización puede realizarse de 2 maneras principalmente, aunque la más usada y recomendada es la disolución de la parafina en un disolvente apropiado como n-octano o xileno (Crisan y cols., 1990; Greer y cols., 1991; Braun y cols., 1993). El otro método de desparafinización se basa en la fusión de la parafina a 65°C y el congelamiento súbito del corte en nitrógeno líquido. Además de extraer ADN, con este procedimiento puede obtenerse ARN de buena calidad para efectuar RT-PCR (Santos y Osório-Almeida, 1993). De entre estos métodos de desparafinización, la gran mayoría de autores eligen el uso de disolventes y el xileno goza de mayor popularidad sobre el n-octano. Después del uso de xileno, se eliminan los restos de este disolvente efectuando lavados con etanol (Goelz y cols., 1985; Crisan y cols., 1990; Greer y cols., 1991; Kallio y cols., 1991; Braun y cols., 1993).

En algunos protocolos para extraer ADN de tejido incluido en parafina se realizan digestiones proteolíticas. Con más frecuencia, los tejidos se tratan con proteinasa K en medio desnaturizante, aunque también puede usarse pronasa con resultados similares. El tiempo de incubación, las concentraciones de proteasa y la composición del amortiguador de digestión dependen de cada autor (Innis y cols., 1990). Una simplificación metodológica evita los tratamientos enzimáticos y las extracciones con fenol y cloroformo. En esta técnica, el tejido desparafinado se hierve en agua por diez minutos y el sobrenadante es usado directamente para la reacción de amplificación por PCR (Shibata y cols., 1988a; Shibata y cols., 1988a; Kallio y cols., 1991). Sin

embargo, al hervir la muestra pueden solubilizarse componentes inhibitorios de PCR haciendo sinergismo con trazas de fijadores remanentes (Innis y cols., 1990; Kallio y cols., 1991).

Si se realiza digestión proteolítica, se eliminan los restos de proteínas por extracciones con fenol-cloroformo, y finalmente se realiza una precipitación etanólica del ADN (Goelz y cols., 1985; Imprim y cols., 1987; Braun y cols., 1993).

Inicialmente, el ADN extraído se usó para hibridación ADN-ADN tipo Southern y tipo "dot blot" con muy buenos resultados. Con la aparición de PCR, se empezó a extraer ADN para usarlo como molde en las reacciones de amplificación enzimática (Shibata y cols., 1988a; Shibata y cols., 1988b; Crisan y cols., 1990; Greer y cols., 1991; Kallio y cols., 1991; Braun y cols., 1993). Aunque el ADN obtenido no se encuentra intacto, se sabe desde 1985 que se extrae como doble cadena, es sensible al corte por endonucleasas de restricción e hibrida eficazmente con sondas marcadas con compuestos radiactivos. La movilidad electroforética del ADN extraído de tejido incluido en parafina es ligeramente menor que la del ADN aislado de muestras frescas. Además, el ADN extraído de tejido fijado en formalina e incluido en parafina puede clonarse en vectores plasmídicos (Goelz y cols., 1985).

Con respecto a la degradación observada en el ADN extraído de bloques de parafina, se propone que puede ser causa del fijador o de otras razones. Una de ellas puede ser la acción de las nucleasas entre el tiempo de extracción de la pieza y la fijación, aunque en un estudio se mostró que no hay degradación significativa entre el tejido fijado inmediatamente y aquél que permaneció 24 horas a 4°C antes de la fijación (Greer y cols., 1991). Esto podría no ser cierto en todos los casos. Una posibilidad es que existan niveles variables de nucleasas entre los tejidos de un mismo individuo, máxime si son neoplásicos. Se cree además que el almacenamiento del bloque por períodos prolongados puede traer como consecuencia la degradación paulatina del ADN presente (Goelz y cols., 1985). Aunque se ha extraído ADN de tejido incluido en parafina de 40 años y se ha usado exitosamente como molde para amplificación por PCR (Shibata y

cols., 1988b), no necesariamente significa que el ADN permanece intacto indefinidamente en los bloques incluidos en soportes sólidos. Entre más tiempo transcurre desde el montaje, se amplifican sólo secuencias de bajo peso molecular por PCR (Greer y cols., 1991).

Como ya se mencionó, la fijación es el paso de la técnica histológica que tiene más efectos sobre las reacciones de amplificación enzimática a partir de ADN extraído de tejido incluido en parafina. No todos los métodos de preservación o fijación proporcionan ADN apropiado para usarse en PCR. El efecto de la fijación se evalúa por la capacidad del ADN del tejido tratado para servir como molde en la amplificación. De este modo, mientras se encuentren productos amplificados de gran tamaño, significará que el fijador no causó mayores daños al ADN. Greer y cols., (1991) probaron el efecto de varios fijadores en tejidos a los cuales se les extrajo el ADN, mismo que se sometió a PCR. Los mejores resultados se observaron en los tejidos fijados con etanol al 95% y acetona. El uso de formalina neutra provoca una ausencia apreciable de ADN de alto peso molecular. Fijadores como el paraformaldehído y la mezcla ácido acético-etanol-formalina, comprometen la eficiencia de la amplificación, pero no en las proporciones inhibitorias de soluciones fijadoras muy ácidas como las de Carnoy y Zenker. No sólo influye el fijador usado, sino también el tiempo de fijación. En un ensayo con los fijadores arriba mencionados, se probó el efecto de 24 horas de fijación. Los resultados mostraron la incapacidad del ADN molde para dirigir la síntesis de productos mayores a 1 kb con todos los fijadores analizados, excepto la acetona. Con estos estudios se ha comprobado que el tiempo de fijación es muy importante. Cabe señalar que en ocasiones las muestras permanecen mucho tiempo en soluciones fijadoras, antes de procesarlas, como por ejemplo en expediciones zoológicas. Muestras como éstas, tendrán una notable ausencia de ADN de alto peso molecular. La Taq polimerasa comete errores cuando sintetiza una hebra complementaria a un ADN dañado por efecto del fijador, lo cual se traduce en mutaciones del producto amplificado por PCR (Greer y cols., 1991).

2. Planteamiento del Problema y Objetivos

La disgenesia gonadal mixta, la disgenesia gonadal pura 46,XY y el hermafroditismo verdadero 46,XX, son síndromes originados por anomalías en la diferenciación sexual. Las gónadas son diferentes en cada uno de estos padecimientos. La aplicación de técnicas de biología molecular al ADN obtenido de las gónadas presentes en cada uno de estos padecimientos, permite comprender con más claridad el desarrollo gonadal patológico. En este sentido, el primer paso a seguir en el estudio molecular del genoma gonadal consiste en la extracción de ADN a partir de gónadas fijadas en formaldehído e incluidas en parafina.

El presente trabajo consiste en la estandarización de una técnica para extraer ADN a partir de gónadas incluidas en parafina tanto de individuos normales como de pacientes con DGM, DGP 46, XY y HV 46,XX, así como el empleo de este ADN para realizar estudios de amplificación enzimática de secuencias centroméricas de los cromosomas X y Y.

Los objetivos particulares de este trabajo son:

1) Establecer una metodología que permita la extracción de ADN a partir de tejido gonadal normal incluido en parafina.

2) Realizar un análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído de los bloques de ovario y testículos normales incluidos en parafina..

3) Extraer ADN a partir de tejido gonadal incluido en parafina de pacientes con diferentes anomalías de la diferenciación sexual.

4) Obtener ADN a partir de sangre de individuos normales (controles) y de pacientes con diferentes anomalías de la diferenciación sexual.

5) Amplificar secuencias alfoides de los cromosomas sexuales por PCR en el ADN extraído de sangre de los controles y de los pacientes, así como en ADN extraído de las gónadas controles y de las gónadas de los pacientes.

3. Parte experimental

3.1 Soluciones empleadas

- a) NaCl 5.0 M.
- b) Tris (hidroximetilaminometano) 1.0 M, pH 7.6.
- c) SDS (dodecilsulfato de sodio) al 10%.
- d) Amortiguador de extracción: Tris 100.0 mM, NaCl 100.0 mM, EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetracético) 10.0 mM. Esterilizar por filtración.
- e) Amortiguador de digestión: Tris 50.0 mM pH 7.5, EDTA 10.0 mM, NaCl 150.0 mM. Esterilizar por filtración.
- f) Amortiguador Tris-EDTA (TE) pH 8.0 : Tris 10.0 mM, EDTA 1.0 mM. Esterilizar en autoclave.
- g) Amortiguador de lisis de eritrocitos (ALE): Tris 10.0 mM, NaCl 10.0 mM y $MgCl_2$ 5.0 mM. Esterilizar en autoclave.
- h) Amortiguador de lisis de leucocitos pH 7.6-8.0 (ALL): Tris 10.0 mM, EDTA 10.0 mM, NaCl 50.0 mM y 0.2% de SDS. Esterilizar en autoclave.
- i) Acetato de sodio 3.0 M. Esterilizar por filtración.
- j) Solución de proteinasa K (de *Tritirachium album*) (20 mg/ml) en agua estéril. Conservar a -20°C.
- k) Solución concentrada de oligonucleótido 50 mM en agua estéril (grado cultivo celular).
- l) Amortiguador de carga para electroforesis: azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y 15.0 % de Ficoll. Conservar a 4°C.
- m) Amortiguador de corrida para electroforesis TBE 1X (solución concentrada 5X: Tris 0.4 M, H_3BO_3 0.4 M y EDTA 0.01 M).

3.2 Equilibración del fenol

Las finalidades de la equilibración del fenol son la neutralización de su acidez y la saturación con agua. Usar solamente fenol redestilado grado biología molecular, sin productos derivados de su oxidación, ya que éstos provocan daños a los ácidos nucleicos.

1. Fundir el fenol a 65°C por calentamiento en baño maría.

2. Adicionar un volumen de Tris 1.0 M pH 8.0 y 0.5 g de 8-hidroxiquinoleína como antioxidante. Mezclar con agitación magnética durante dos horas protegiendo de la luz con papel, o en frasco ámbar.

3. Dejar en reposo hasta la separación de las fases. Medir el pH de la fase superior (acuosa). En caso de que el pH < 7.6, aspirar la fase acuosa y eliminarla.

4. Adicionar un nuevo volumen de Tris 1.0 M pH 8.0. Agitar nuevamente protegiendo el recipiente de la luz.

5. Repetir el paso 3. Concluir la operación cuando $7.6 < \text{pH} < 8.0$. Almacenar el fenol a 4°C en frasco ámbar.

3.3 Extracción de ADN a partir de bloques de gónadas fijadas en formaldehído e incluidas en parafina.

Las gónadas de individuos normales y de los pacientes estudiados fueron proporcionadas por los Servicios de Patología del Hospital General de México, SSA; del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", SSA; y del Hospital General "Manuel Gea González", SSA.

Se describen a continuación 4 métodos para extraer ADN de bloques de gónada incluidos en parafina.

En todos los métodos probados el material de laboratorio debe ser nuevo y estéril. Tocar los bloques de tejido sólo con guantes.

3.3.1 Método A.

Este método incluye digestión proteolítica y extracciones con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (Erickson, 1992).

1. Cortar el tejido a 10 μm en un microtomo. Depositar 3 cortes en un microtubo de 1.5 ml y guardar hasta su uso.

2. Eliminar el exceso de parafina de cada corte mediante un bisturí.

3. Desparafinizar el tejido con 400 μ l de xileno. Agitar el microtubo suavemente al menos durante 5 minutos.

4. Centrifugar a 16400 g en una microcentrifuga durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante por inversión del tubo.

5. Adicionar 500 μ l de etanol absoluto y agitar suavemente.

6. Repetir secuencialmente los pasos 4, 5 y nuevamente el 4.

7. Calentar el microtubo a 48°C en baño maría para evaporar el etanol remanente.

8. Agregar 100 μ l de amortiguador de extracción, 10 μ l de SDS 10% y 2.0 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). Agitar suavemente. El amortiguador de extracción proporciona la fuerza iónica y pH necesarios para la acción proteolítica de la enzima y las propiedades tensoactivas del SDS permiten eliminar membranas.

9. Incubar a 42°C toda la noche.

10. Adicionar 150 μ l de fenol equilibrado y agitar. El fenol desnaturaliza los polipéptidos remanentes y permite que los restos de proteínas pasen a la fase orgánica.

11. Centrifugar a 10500 g por 10 minutos para separar las fases. Tomar la fase superior y depositarla en otro microtubo.

12. Repetir los pasos 10 y 11.

13. Añadir 150 μ l de fenol-cloroformo 1:1 y agitar suavemente. Repetir el paso 11.

14. Adicionar 150 μ l de cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 (CHCl_3 -AIA) y agitar suavemente. Repetir el paso 11. La mezcla CHCl_3 -AIA, además de actuar como disolvente de restos de proteínas, permite una mayor definición de la interfase y previene la formación de espuma.

15. Agregar 15 μ l de acetato de sodio 3 M y agitar.

16. Adicionar 330 μ l de etanol absoluto frío. Mantener a -20°C durante 12 horas.

17. Centrifugar a 16400 g durante 15 minutos.

18. Añadir 10 μ l de amortiguador Tris-EDTA y almacenar a -20°C.

3.3.2 Método B.

Este método de extracción de ADN prescinde de la digestión enzimática y de las extracciones con fenol y cloroformo (Kallio y cols, 1991).

1. Cortar el tejido a 5 μm en un microtomo. Depositar 5 cortes en un microtubo de 1.5 ml y guardar hasta su uso.

2. Desparafinizar el tejido con 500 μl de xileno. Agitar el microtubo suavemente por 10 minutos.

3. Centrifugar a 12000 g en una microcentrífuga durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante por inversión del tubo.

4. Repetir los pasos 2 y 3.

5. Adicionar 500 μl de etanol absoluto y agitar suavemente. Repetir el paso 3.

6. Repetir los pasos 5 y 3.

7. Agregar 2 gotas de acetona y dejar abierto el microtubo a temperatura ambiente hasta una total evaporación.

8. Adicionar 50 μl de agua destilada estéril y homogenizar el contenido.

9. Colocar el microtubo en un baño de ebullición a 93°C por 10 minutos.

10. Depositar el microtubo en un baño de hielo por 5 minutos.

11. Centrifugar a 12000 g durante 5 minutos.

12. Usar inmediatamente o conservar a -20°C hasta su uso.

3.3.3 Método C.

Además de la digestión enzimática y la extracción con disolventes orgánicos, esta técnica incluye una hidratación gradual del tejido y la sustitución del etanol por 2-propanol en el paso de precipitación (Braun y cols, 1993).

1. Cortar el tejido a 30 μm en un microtomo. Depositar 8 cortes en un microtubo de 1.5 ml y guardar hasta su uso.

2. Desparafinizar el tejido con 1 ml de xileno. Agitar el microtubo suavemente durante 30 minutos.

3. Centrifugar a 12000 g en una microcentrifuga durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante por inversión del microtubo.
4. Repetir los pasos 2 y 3.
5. Añadir 1 ml de etanol al 96% y agitar suavemente durante 15 minutos.
6. Repetir el paso 3.
7. Agregar 1 ml de etanol al 90% y agitar suavemente durante 15 minutos.
8. Repetir el paso 3.
9. Adicionar 1 ml de etanol al 70% y agitar suavemente durante 15 minutos.
10. Repetir el paso 3.
11. Evaporar el etanol a temperatura ambiente.
12. Adicionar 350 μ l de amortiguador de digestión (Tris-HCl 50.0 mM pH 7.5; EDTA 10.0 mM, NaCl 150.0 mM) y SDS hasta el 1%. Agitar suavemente.
13. Agregar 10 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y agitar suavemente.
14. Incubar a 55°C por un mínimo de 12 horas.
15. Añadir 350 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y agitar por 10 minutos.
16. Centrifugar a 12000 g durante 10 minutos.
17. Transferir la fase superior a otro microtubo sin arrastrar material de la interfase.
18. Adicionar 350 μ l de cloroformo y agitar por 10 minutos.
19. Repetir los pasos 16 y 17.
20. Repetir los pasos 18, 16 y 17.
21. Adicionar 350 μ l de isopropanol y agitar suavemente.
22. Dejar a -20°C durante una noche.
23. Centrifugar a 12000 g durante 20 minutos. Eliminar el isopropanol por inversión del microtubo.
24. Evaporar el isopropanol a 80°C durante 10 minutos.
25. Adicionar 20 μ l de amortiguador Tris-EDTA.

3.3.4 Método D.

Es una técnica modificada a base de las técnicas A y C.

1. Cortar el tejido a 10 μm en un microtomo. Depositar 3 cortes en un microtubo de 1.5 ml y guardar hasta su uso.
2. Desparafinizar el tejido con 1.0 ml de xileno ultrapuro. Agitar el microtubo suavemente por lo menos durante 5 minutos.
3. Centrifugar a 16400 g en una microcentrifuga durante 10 minutos. Desechar el sobrenadante por inversión del microtubo.
4. Añadir 0.5 ml de xileno ultrapuro y agitar. Repetir el paso 3.
5. Adicionar 1.0 ml de etanol absoluto para eliminar el xileno residual. Agitar suavemente y repetir el paso 3.
6. Agregar 0.5 ml de etanol absoluto y agitar suavemente. Repetir el paso 3.
7. Sellar la boca del microtubo con Parafilm. Perforar el Parafilm con una aguja y colocar el microtubo en baño maría a 80°C durante 5-7 minutos para evaporar el etanol remanente.
8. Retirar el Parafilm, dejar enfriar, agregar 200 μl de amortiguador de extracción, 20 μl de SDS 10% y agitar.
9. Adicionar 7.5 μl de proteinasa K (20 mg/ml), agitar suavemente e incubar a 48°C toda la noche en baño maría.
10. Añadir (después de 16 horas de incubación) 50 μl de amortiguador de extracción, 2.5 μl de proteinasa K e incubar hasta que el contenido del tubo sea incoloro.
11. Colocar el microtubo en un bloque de calentamiento a 97°C por 10 minutos para inactivar la proteinasa K. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
12. Adicionar 140 μl de fenol equilibrado y 140 μl de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 v/v (CHCl_3 -AIA). Agitar durante 5 minutos hasta formar una emulsión.
13. Centrifugar a 16400 g por 10 minutos para separar las fases. Tomar la fase superior (sin material de la interfase) y depositarla en otro microtubo.
14. Agregar 280 μl de la mezcla CHCl_3 -AIA y agitar por 5 minutos. Repetir el paso 13.
15. Adicionar 25 μl de acetato de sodio 3.0 M para alcanzar una fuerza iónica adecuada para el paso 16.

16. Precipitar el ADN con 460 μ l de 2-propanol. Agitar suavemente y dejar toda la noche a 4°C.

17. Centrifugar a 16400 g durante 30 minutos para sedimentar el ADN precipitado.

18. Eliminar el exceso de isopropanol por inversión del microtubo y evaporación del remanente a 85°C por 5 minutos.

19. Disolver el ADN en 30 μ l de amortiguador Tris-EDTA (TE) y almacenar a -20°C.

3.4 Extracción de ADN a partir de leucocitos totales

Se usa la técnica propuesta por Escobar y Zamora (1992).

Todo el material de vidrio debe estar limpio y estéril.

1. Extraer aproximadamente 20 ml de sangre venosa y mezclar con el anticoagulante (EDTA tripotásico).

2. Centrifugar a 330 g durante 25 minutos para separar los leucocitos.

3. Aspirar la capa de leucocitos con una pipeta Pasteur y depositar en dos tubos de 13 x 100. De preferencia tomar sólo el paquete blanco.

4. Adicionar a cada tubo aproximadamente 4 ml de amortiguador de lisis de eritrocitos (ALE), sellar con Parafilm y agitar. El ALE es una solución hipotónica que provoca la ruptura selectiva de la membrana eritrocitaria por choque osmótico.

5. Centrifugar a 330 g durante 10 minutos para sedimentar el paquete de leucocitos. Eliminar el sobrenadante por inversión del tubo sobre una solución de hipoclorito de sodio al 5%.

6. Repetir los pasos 4 y 5 hasta que el paquete celular tienda hacia el color blanco.

7. Suspender el botón celular de cada tubo en el siguiente medio de digestión: 0.5 ml de ALE + 2.5 ml de amortiguador de lisis de leucocitos (ALL) + 15 μ l de proteinasa K de 20 mg/ml. Agitar suavemente.

8. Sellar con Parafilm e incubar en baño maría con agitación

a 42°C durante toda la noche. Finalizar la incubación cuando el líquido de los tubos sea incoloro.

9. Añadir 1.5 ml de fenol equilibrado y 1.5 ml de cloroformo por tubo, sellar y agitar suavemente para mezclar las dos fases.

10. Centrifugar a 580 g durante 20 minutos para depositar los restos de proteínas en la interfase.

11. Aspirar la fase superior con una pipeta Pasteur y depositarla en un tubo de 13 x 100. No tomar material de la interfase.

12. Repetir los pasos 9, 10 y 11 dependiendo de la cantidad de restos proteicos depositados en la barrera interfásica.

13. Adicionar 3.0 ml de CHCl_3 -AIA, sellar y agitar suavemente hasta formar una emulsión.

14. Centrifugar a 330 g por 5 minutos. Transferir la fase superior de ambos tubos a un tubo de 50 ml.

15. Ajustar la fuerza iónica para precipitar el ADN con 150 μl de NaCl 5 M.

16. Agregar 2 volúmenes (12 ml) de etanol absoluto a -20°C. Cubrir con Parafilm y agitar muy suavemente por inversión del tubo hasta que aparezca el ADN precipitado.

17. Pescar el ADN con una pipeta Pasteur de punta curva.

18. Sumergir el ADN por lo menos 10 veces en una solución de etanol al 70% a -20°C. Contaminantes solubles en esta solución se eliminan mediante estos lavados.

19. Dejar secar el ADN sobre la pipeta Pasteur a temperatura ambiente por espacio de 5 minutos.

20. Disolver el ADN en amortiguador Tris-EDTA (TE). El volumen de amortiguador TE usado varía de acuerdo a la cantidad de ADN extraído, siendo el rango entre 200 y 400 μl . Conservar a -20°C.

3.5 Determinación cuantitativa del ADN extraído

a) ADN extraído de gónadas incluidas en parafina.

1. Diluir 30 μl de muestra con 470 μl de amortiguador TE. Esta dilución se justifica por la baja cantidad de muestra y por

la disponibilidad de un espectrofotómetro que emplea volúmenes mayores a 0.5 ml (Beckman DU-50 Spectrophotometer).

2. Determinar la absorbancia de esta dilución a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. A 260 nm absorben los componentes aromáticos de los nucleótidos y por lo tanto, a ésta longitud de onda se determinan ácidos nucleicos. El hecho de que los tres aminoácidos aromáticos absorban luz UV de longitud de onda de 280 nm, permite detectar la presencia de proteínas (Ausubel y cols, 1990).

3. Obtener la concentración de ADN presente en la muestra, tomando en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale aproximadamente a 50 μg de ADN bicatenario/ml:

$$[\text{ADN}] = A_{260} * 50 \mu\text{g/ml} * \text{FD} * (1 \text{ ml} / 1 \times 10^3 \mu\text{l})$$

Donde [ADN] son los microgramos de ADN presentes por microlitro, A_{260} es la absorbancia registrada a 260 nm y FD es el factor de dilución.

4. Determinar la cantidad extraída de ADN según el siguiente algoritmo:

$$m = ([\text{ADN}] * V_f) / 1 \mu\text{l}$$

donde V_f es el volumen de disolución (30 μl).

b) ADN extraído de leucocitos circulantes.

El procedimiento es el mismo que en a), sólo que la dilución es 1:100 (10 μl de muestra + 990 μl de amortiguador TE) y el volumen de amortiguador TE (V_f), es diferente.

3.6 Amplificación de secuencias centroméricas de los cromosomas sexuales por reacción en cadena de la polimerasa.

Usar microtubos de polipropileno de 0.5 ml de capacidad. Todo el material usado debe ser nuevo y estéril.

Tomar las precauciones pertinentes cuando el experimento lo

realice un varón (debido a la amplificación de secuencias sexo-específicas): trabajar siempre tras un acrílico limpio, usar doble guante, bata abotonada y cubrebocas.

1. Exponer las micropipetas a luz ultravioleta (304 nm) por 30 minutos para inactivar ADN contaminante.

2. Hacer los cálculos de las cantidades de los reactivos que se usan de acuerdo a la siguiente distribución:

Reactivo	Volumen (μ l)	Concentración final (μ M)
Amortiguador de PCR 10X: Tris-HCl 100.0 mM pH 8.3, KCl 500.0 mM, MgCl ₂ 15.0 mM, gelatina 0.01% p/v (*)	10.0	1X
MgCl ₂ 50 mM	1.0	2.5
dATP (10 mM) (*)	1.0	200
dCTP (10 mM) (*)	1.0	200
dGTP (10 mM) (*)	1.0	200
dTTP (10 mM) (*)	1.0	200
oligonucleótido 1 (50 μ M) (**)	0.5	0.5
oligonucleótido 2 (50 μ M) (**)	0.5	0.5
Perfect match polymerase enhancer (PMPE) (***)	0.5	-
ADN		
H2O	cbp 50.0 μ l	

Perkin-Elmer Cetus (*), Bio-Synthesis (**) y Stratagene (***)

Para amplificar secuencias centroméricas del cromosoma X, usar el par de oligonucleótidos X1 y X2; para secuencias centroméricas Y-específicas emplear los oligonucleótidos Y1 y Y2 (Witt y Erickson, 1989; Witt y Erickson, 1991):

X1: 5'-AATCATCAAATGGAGATTTG-3'

X2: 5'-G TTCAGCTCTGTGAGTGAAA-3'

Y1: 5'-ATGATAGAAAACGGAAATATG-3'

Y2: 5'-AGTAGAATGCAAAGGGCTCC-3'

(): - Emplear 5 µl de muestra para amplificar ADN extraído de gónadas incluidas en parafina.

():- Usar un microgramo de muestra, para amplificar ADN extraído de leucocitos circulantes (calculado en base a la concentración obtenida de la lectura a 260 nm).

3. Preparar una mezcla de preamplificación con los reactivos, excepto el ADN y el agua: adicionar secuencialmente el amortiguador de PCR 10X, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, los oligonucleótidos y finalmente el PMPE. Agitar muy bien. Los reactivos se mantienen en hielo durante esta operación.

En la preparación de la mezcla de preamplificación, tomar en cuenta el número de reacciones de amplificación (n) y hacer mezcla de preamplificación para n+1 tubos, con el objeto de tener un tubo como control negativo de la amplificación.

4. Emplear el par de oligonucleótidos controles #1 y #2 (2.5 µl de cada uno) para amplificar una secuencia de 500 pb del genoma del bacteriófago lambda (5 ng). De manera simultánea a las muestras, procesar este tubo que sirve como control de los reactivos de amplificación.

Control #1: 5'-GATGAGTTCGTGTCCTACAACCTGG-3' (Perkin Elmer-Cetus)

Control #2: 5'-GGTTATCGAAATCAGCCACAGCGCC-3' (Perkin Elmer-Cetus)

5. Adicionar el volumen calculado de agua a cada tubo de reacción.

6. Agregar el volumen de muestra a cada tubo y agitar en un Vórtex a baja velocidad.

7. Centrifugar a 16400 g por 30 segundos para sedimentar el volumen.

8. Adicionar el volumen calculado de la mezcla de preamplificación a cada tubo (n+1/n microlitros). Agitar en Vórtex.

9. Repetir el paso 7.

10. Depositar 2 gotas de aceite mineral ultrapuro en cada tubo para prevenir la evaporación del agua durante el proceso de amplificación.

11. Acomodar los tubos en el termociclador (Techne PHC-1) situado detrás de un acrílico para minimizar en lo posible la contaminación al abrir los tubos en el paso 12). Activar el programa desnaturalizante: 95°C / 9.9 minutos; 72°C / 7 minutos.

12. Adicionar 2.5 Unidades de AmpliTag polimerasa (Perkin-Elmer Cetus) a través de la capa de aceite mineral, durante el lapso de 7 minutos a 72°C. En este paso deben de tomarse en cuenta las siguientes precauciones: manejar la enzima siempre en hielo y trabajar detrás del acrílico.

13. Utilizar el siguiente programa para amplificar secuencias centroméricas de ambos cromosomas sexuales (X y Y): 40 ciclos (95°C / 1 minuto; 48°C / 2 minutos; 72°C / 3 minutos) y un paso de extensión de 9.9 minutos a 72°C.

3.7 Análisis de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa.

1. Sellar ambos extremos de un portagel con cinta adhesiva.
2. Colocar el peine sobre el portagel como molde para los pozos.
3. Colocar el portagel sobre una superficie horizontal nivelada.
4. Pesar la cantidad de agarosa necesaria para preparar 50 ml de gel al 1.5%.
5. Depositar el polvo en un matraz erlenmeyer de 250 ml, adicionar 40 ml de agua destilada y agitar.
6. Calentar en horno de microondas para disolver la agarosa tomando precaución de restituir el volumen evaporado de agua.
7. Adicionar 10 ml de amortiguador Tris-boratos-EDTA (TBE 5X) una vez que la agarosa se encuentra soluble. Agitar y dejar enfriar.
8. Añadir 5 µl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) y agitar.
9. Vaciar esta solución al portagel sellado, cuidando de no dejar burbujas, principalmente en el área del peine. Esperar a la formación del gel.

10. Retirar el peine con precaución para no romper los pozos.
11. Diluir 1:5 una solución de TBE 5X para tener el amortiguador de corrida (TBE 1X).
12. Depositar el portagel con el gel dentro de la cámara de electroforesis y adicionar suficiente TBE 1X hasta cubrir el gel.
13. Distribuir varias alícuotas de 3 μ l de amortiguador de carga para electroforesis en una tira de Parafilm.
14. Tomar alícuotas de 15 μ l de los productos amplificados por PCR y mezclar con 3 μ l de amortiguador de carga para electroforesis. Incluir un marcador de peso molecular en el rango del producto esperado.
15. Transferir cuidadosamente los 18 μ l de la mezcla a un pozo del gel de agarosa. Si se tienen varias muestras, hacer este paso rápidamente para prevenir la difusión de los productos en el gel.
16. Cerrar la cámara de electroforesis y aplicar un voltaje de 60 V durante 2 horas.
17. Terminada la corrida, analizar el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta de longitud de onda \sim 300 nm.
18. Si se va a fotografiar el gel, usar un filtro rojo.

4. Resultados

Se probaron 3 métodos (A, B y C) para extraer ADN a partir de bloques de gónadas normales incluidas en parafina. Se utilizaron 3 bloques de testículo en cada técnica y el ADN obtenido fue usado en reacciones de PCR con los oligonucleótidos X1 y X2. Además se probó el efecto de las cantidades iniciales de ADN molde en cada tubo de PCR. Los volúmenes de muestra ensayados fueron de 5 y 10 μ l para el método A; 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μ l con el método B y finalmente 5, 10, 15 y 20 μ l en el método C.

El empleo del método A (con 10 μ l de muestra) permitió amplificar muy débilmente la secuencia esperada del cromosoma X (130 pb) junto con varios productos inespecíficos presentes en altas concentraciones.

La técnica directa (B) no funcionó ya que no se encontró el fragmento específico (130 pb) ni bandas adicionales en ninguno de los casos.

El procedimiento experimental a base de la metodología C (empleando 5 y 10 μ l) condujo a la formación del producto específico (130 pb) y a una gran cantidad de bandas intensas de tamaños variables.

Estos hallazgos dieron la pauta para efectuar modificaciones a las técnicas A y C para establecer una metodología nueva (D). La utilidad de cada paso fue evaluada por la amplificación del producto de 130 pb y por la presencia o ausencia de bandas inespecíficas. Cada paso metodológico fue probado en cuatro muestras de ADN obtenidas de 4 bloques de testículo.

El primer paso de la técnica D se tomó del paso inicial del método A. Para el proceso de desparafinización se realizaron varias pruebas con xileno químicamente puro y ultrapuro. Además se ensayó el volumen ideal del xileno empleado y el tiempo de desparafinización. Los mejores resultados se obtuvieron con dos pasos de desparafinización (empleando 1 ml y 0.5 ml de xileno ultrapuro respectivamente) durante 5 minutos, alternados con dos pasos de centrifugación (16400 g/10 minutos) y eliminación del disolvente.

Se estableció que la mejor medida para eliminar el xileno residual en las muestras es el uso de etanol de acuerdo al esquema técnico utilizado para la desparafinización (pasos 5 y 6 del método D). Además se determinaron las condiciones óptimas de la evaporación del etanol remanente en la muestra (baño maría a 80°C durante 5-7 minutos).

En el paso de digestión de proteínas con proteinasa K se probaron varias soluciones amortiguadoras, concentración de enzima y de SDS, tiempo y temperatura de incubación, y finalmente el efecto de la adición de más enzima después de un período de incubación. Además, para cada solución amortiguadora, se probó el efecto de varios volúmenes de la misma. Los resultados finales de estas pruebas son los pasos 8, 9 y 10 de la técnica D. Una vez terminada la digestión, se estableció un paso de inactivación enzimática a 97°C durante 10 minutos.

Se efectuaron varias extracciones con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, variando en cada ocasión los disolventes empleados en cada paso, así como sus proporciones relativas, tiempo de extracción y las condiciones de centrifugación. Así, se establecieron los pasos 12, 13 y 14 de la metodología D.

También se probó el efecto de la fuerza iónica en la precipitación del ADN. Se emplearon diferentes volúmenes de dos soluciones diferentes: NaCl 5 M y acetato de sodio 3 M, junto con tubos no tratados. Los resultados indicaron la utilidad de 25 μ l de acetato de sodio 3 M antes de la adición del alcohol.

Para el paso de precipitación, se probó el efecto de los alcoholes usados en las técnicas A y C. Sin embargo, el 2-propanol resultó más efectivo en este paso. La sedimentación del ADN se consiguió con éxito con una centrifugación prolongada (30 minutos) a 16400 g. La evaporación del alcohol resultó óptima bajo las siguientes condiciones: baño maría a 85°C durante 5 minutos.

Se determinó el volumen de amortiguador Tris-EDTA a razón de 10 μ l de solución por cada corte procesado de 10 μ m. Finalmente, se obtuvieron buenos resultados con el empleo de 5 μ l de muestra de ADN por cada reacción de amplificación de 50 μ l (Figuras 4.1 a 4.6).

Para la reacción en cadena de la polimerasa, se estableció la variante "Hot-Start PCR". Los primeros resultados de la amplificación de secuencias centroméricas del cromosoma X con los oligonucleótidos X1 y X2 demostraron la presencia de dos bandas: la específica de 130 pb y una inespecífica de ~ 310 pb. El empleo del aditivo PMPE (Perfect match polymerase enhancer) permitió amplificar únicamente el producto específico de 130 pb (Figura 4.1, 4.2 y 4.3).

En la Tabla 4.1 se presentan las características clínicas, citogenéticas e histológicas de 5 pacientes con anomalías de la diferenciación sexual. Dos de los pacientes corresponden a disgenesias gonadales mixtas con sexo fenotípico masculino y con presencia de cromosomas Y anormales (DG-1 y DG-3). La paciente DP-2 es una disgenesia gonadal pura 46,XY con reversión sexual completa. También se presentan los datos de dos casos de hermafroditismo verdadero 46,XX con diferentes sexos fenotípicos (HV-8 masculino y HV-12 femenino). Se incluye además el año de extirpación de las gónadas. En todos los casos, las gónadas disponibles para el análisis se encuentran subrayadas.

Los resultados del análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído de 10 bloques de ovario normal y 10 bloques de testículo normal utilizando el método D, se muestran en las Tablas 4.2 y 4.3, respectivamente. Estas tablas incluyen los datos de las lecturas espectrofotométricas de una dilución 1:16.6 a longitudes de onda de 260 y 280 nm, la relación A_{260}/A_{280} , la concentración del ADN (en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la cantidad de ADN extraída por cada 30 μm de tejido. Además se incluye en cada tabla la relación A_{260}/A_{280} promedio y la cantidad promedio de ADN extraído.

El análisis espectrofotométrico en las muestras de ADN extraídas de sangre de 5 mujeres normales y 5 varones normales se presentan en las Tablas 4.4 y 4.5, respectivamente. Estas muestras se usaron como controles masculinos y femeninos en amplificaciones de ADN por PCR.

En el caso del ADN extraído de gónadas de los pacientes con anomalías de la diferenciación sexual, no se realizó el análisis espectrofotométrico por insuficiencia de muestra.

La Tabla 4.6 muestra el análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído de muestras de sangre de 5 pacientes con anomalías de la diferenciación sexual: dos pacientes con disgenesia gonadal mixta (DG-1 y DG-3), un caso de disgenesia gonadal pura 46,XY (DP-2) y 2 pacientes con hermafroditismo verdadero 46,XX (HV-8 y HV-12).

Usando PCR con los oligonucleótidos X1 y X2, se amplificó con éxito el producto específico de 130 pb a partir del ADN extraído de cuatro muestras de testículos humanos normales incluidos en parafina (Figura 4.1). Esta figura también muestra la amplificación de esta secuencia en ADN extraído de cuatro ovarios humanos normales incluidos en parafina y en ADN extraído de leucocitos de controles normales (femenino y masculino).

La Figura 4.2 presenta la amplificación de secuencias centroméricas del cromosoma X a partir de ADN obtenido de ovario y testículo normales incluidos en parafina, muestras de varios tejidos de dos disgenesias gonadales mixtas (DG-1 y DG-3), y en leucocitos y estría gonadal de un caso de disgenesia gonadal pura, 46,XY (DP-2). En todos los carriles se muestra una banda de 130 pb.

En la Figura 4.3 se presenta la amplificación de la secuencia de 130 pb delimitada por los oligonucleótidos X1 y X2 partiendo de ADN extraído de sangre de controles normales (masculino y femenino) y de muestras de ovario, testículo y sangre de dos casos de hermafroditismo verdadero 46,XX (HV-8 y HV-12). El producto de 130 pb se observa en todos los casos.

Después de establecer las precauciones indicadas en la metodología de PCR y empleando el par de oligonucleótidos Y1 y Y2, se logró amplificar un fragmento centromérico del cromosoma Y en los cuatro carriles correspondientes al ADN extraído de testículos normales y en el carril del control masculino. El producto de 170 pb no se encontró en los carriles con ADN extraído de ovarios normales ni en el control femenino (Figura 4.4).

La amplificación de secuencias repetidas del centrómero del cromosoma Y en controles y en pacientes con disgenesia gonadal mixta y pura 46,XY se muestran en la Figura 4.5. La banda de 170

pb sólo se observó en los carriles correspondientes al ADN extraído del control masculino (testículo), en los dos casos de disgenesia gonadal mixta y en el caso de disgenesia gonadal pura 46,XY.

La Figura 4.6 presenta la amplificación de secuencias centroméricas Y-específicas usando el par de oligonucleótidos Y1 y Y2 a partir de ADN extraído de controles y de dos casos de hermafroditismo verdadero 46,XX. El producto de 170 pb se encontró en los controles masculinos (sangre y testículo). Esta banda no estuvo presente en los carriles correspondientes a los tejidos analizados de los dos casos de HV 46,XX.

Tabla 4.1 Características clínicas, citogenéticas e histológicas de 5 pacientes con anomalías de la diferenciación sexual.

Caso	Diagnóstico	Cariotipo	Gónada izquierda	Gónada derecha	Fecha biopsia
DG-1	DGM	45,X/46,Xdic(Y)	<u>estria</u>	<u>testículo</u>	1985
DG-3	DGM	45,X/46,Xidic(Y)	estria	<u>testículo</u>	1988
DP-2	DGP 46,XY	46,XY	<u>estria</u>	estria	1993
HV-8	HV 46,XX	46,XX	<u>ovario</u>	<u>testículo</u>	1992
HV-12	HV 46,XX	46,XX	<u>ovario</u>	<u>testículo</u>	1989

Abreviaturas: DGM= Disgenesia gonadal mixta

DGP 46,XY= Disgenesia gonadal pura 46,XY

HV 46,XX= Hermafroditismo verdadero 46,XX

^ Realizado en el Servicio de Genética, Hospital General de México, SSa.

* Las gónadas disponibles para este estudio se encuentran subrayadas.

Tabla 4.2 Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído de 10 bloques de ovarios humanos normales.

Ovario*	A260	A280	A260/280	[ADN] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	ADN total (μg)
1	0.278	0.203	1.37	0.23	6.96
2	0.292	0.215	1.36	0.24	7.29
3	0.310	0.231	1.34	0.26	7.74
4	0.371	0.291	1.28	0.31	9.27
5	0.328	0.247	1.33	0.27	8.19
6	0.297	0.218	1.36	0.25	7.41
7	0.245	0.176	1.39	0.20	6.12
8	0.451	0.377	1.20	0.38	11.28
9	0.302	0.228	1.32	0.25	7.56
10	0.357	0.275	1.30	0.30	8.91

* 3 cortes de 10 μm por ovario

A 260 = Absorbancia a 260 nm.

$\bar{X} = 1.32$

$\bar{X} = 8.07 \mu\text{g}$

A 280 = Absorbancia a 280 nm.

Tabla 4.3 Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído de 10 bloques de testículos humanos normales.

Testículo*	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	[ADN] µg/µl	ADN total (µg)
1	0.402	0.348	1.16	0.34	10.05
2	0.529	0.500	1.06	0.47	14.22
3	0.424	0.353	1.20	0.35	10.59
4	0.455	0.407	1.12	0.38	11.37
5	0.491	0.454	1.08	0.44	13.20
6	0.401	0.335	1.20	0.33	10.02
7	0.439	0.376	1.17	0.37	10.98
8	0.469	0.402	1.17	0.39	11.73
9	0.369	0.303	1.22	0.35	10.59
10	0.397	0.325	1.22	0.33	9.93

* 3 cortes de 10 µm por testículo

$$\bar{X} = 1.16$$

$$\bar{X} = 11.27 \mu\text{g}$$

A₂₆₀ = Absorbancia a 260 nm.

A₂₈₀ = Absorbancia a 280 nm.

Tabla 4.4 Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído de leucocitos de 5 mujeres normales.

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	[ADN] µg/µl	ADN total (µg)
CF-1	0.205	0.126	1.63	1.02	307.5
CF-2	0.230	0.128	1.80	1.15	345.0
CF-3	0.214	0.113	1.89	1.07	160.5
CF-4	0.105	0.055	1.91	0.52	157.5
CF-5	0.360	0.205	1.76	1.80	540.0
Dilución 1:100					
A ₂₆₀ = Absorbancia a 260 nm.			$\bar{X} = 1.80$		$\bar{X} = 302.1 \mu\text{g}$
A ₂₈₀ = Absorbancia a 280 nm.					

Tabla 4.5 Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído de leucocitos de 5 varones normales.

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	[ADN] µg/µl	ADN total (µg)
CM-1	0.050	0.027	1.85	0.25	200.0
CM-2	0.287	0.156	1.84	1.44	574.0
CM-3	0.209	0.121	1.73	1.05	365.8
CM-4	0.146	0.077	1.90	0.73	292.0
CM-5	0.146	0.077	1.90	0.73	292.0
Dilución 1:100			$\bar{X} = 1.80$	$\bar{X} = 345.6 \mu\text{g}$	
A 260 = Absorbancia a 260 nm.					
A 280 = Absorbancia a 280 nm.					

Tabla 4.6 Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído de leucocitos de 5 pacientes con anomalías de la diferenciación sexual.

Muestra	A260	A280	A260/280	[ADN] µg/µl	ADN total (µg)
DG-1	0.430	0.307	1.40	2.15	645.0
DG-3	0.292	0.176	1.66	1.46	584.0
DP-1	0.106	0.058	1.83	0.53	159.0
HV-8	0.212	0.119	1.78	1.06	315.0
HV-12	0.107	0.048	2.23	0.54	214.0

Abreviaturas: DG = Disgenesia gonadal mixta
 DP = Disgenesia gonadal pura 46,XY
 HV = Hermafrodita verdadero 46,XX

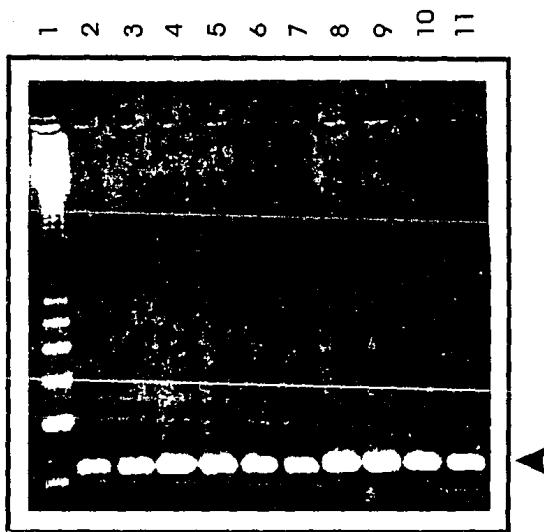


Figura 4.1 Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos X1 y X2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1: escalera de 123 pb; 2,3,4,5: testículo normal; 6,7,8,9: ovario normal; 10: Control Femenino (sangre); 11: Control Masculino (sangre). Todos los carriles muestran una banda de 130 pb correspondiente a secuencias centroméricas del cromosoma Y (◄).

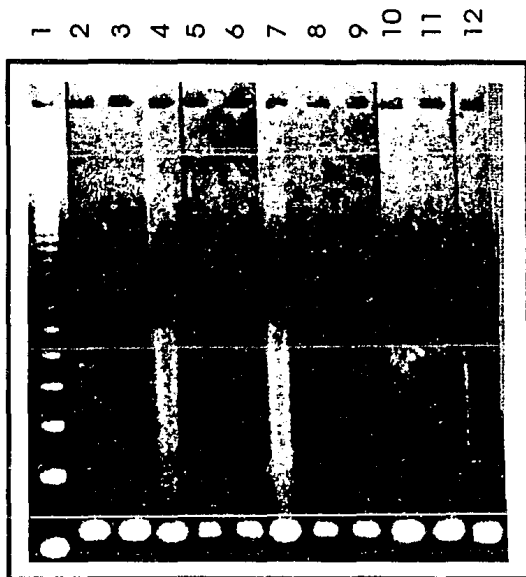


Figura 4.2 Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos X1 y X2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1: escalera de 123 pb; 2: ovario normal; 3: testículo normal ; 4: DG-1 (sangre); 5: DG-1 (estría); 6: DG-1 (testículo); 7: DG-3 (sangre); 8: DG-3 (testículo); 9: DP-2 (sangre); 10: DP-2 (estría); 11: control femenino (sangre); 12: control masculino (sangre). Los carriles 2-12 muestran una banda de 130 pb correspondiente a secuencias centroméricas del cromosoma X (◄).

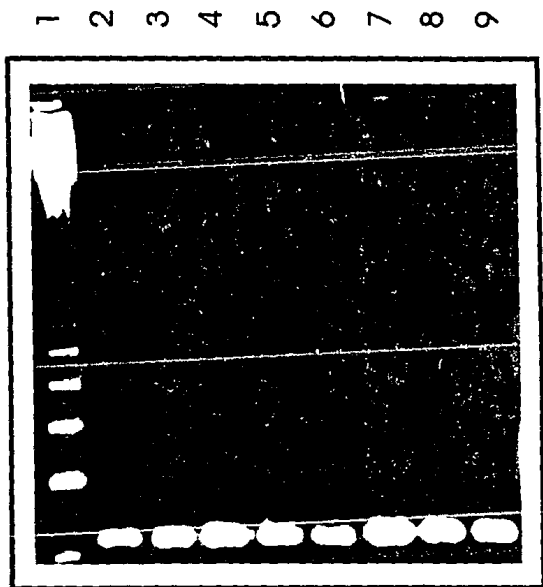


Figura 4.3 Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos X1 y X2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1: escalera de 123 pb; 2: control femenino (sangre); 3: control masculino (sangre); 4: HV-8 (sangre); 5: HV-8 (ovario); 6: HV-8 (testículo); 7: HV-12 (sangre); 8: HV-12 (ovario); 9: HV-12 (testículo). Todos los carriles excepto el 1, muestran una banda de 130pb correspondiente a secuencias centroméricas del cromosoma X (◄).

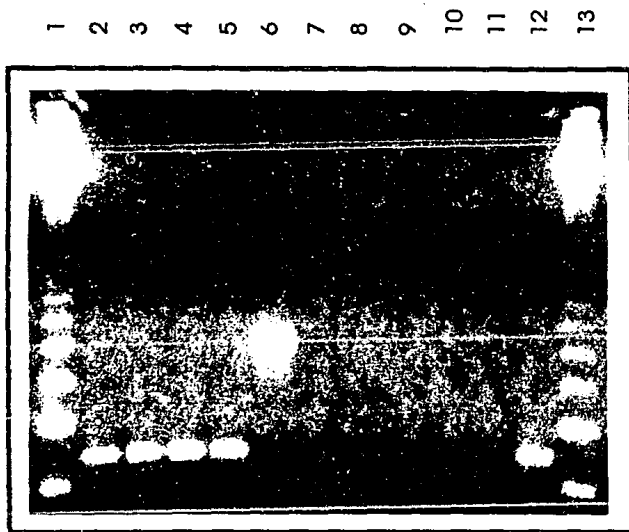


Figura 4.4 Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Y1 y Y2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 y 13: escalera de 123 pb; 2,3,4,5: testículo normal; 6: bacteriófago "lambda"; 7,8,9,10: ovario normal; 11: control femenino (sangre); 12: control masculino (sangre). Los carriles 2,3,4,5, y 12 muestran una banda de 170 pb correspondiente a secuencias centroméricas del cromosoma Y (◄).

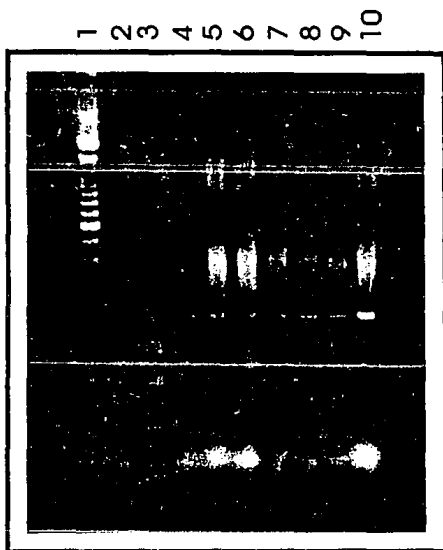


Figura 4.5 Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Y1 y Y2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1: escalera de 100 pb; 2: testículo normal; 3: ovario normal; 4: DG-1 (sangre); 5: DG-1 (estría); 6: DG-1 (testículo); 7: DG-3 (sangre); 8: DG-3 (testículo); 9: DP-2 (sangre); 10: DP-2 (estría). Los carriles 2,4,5,6,7,8,9 y 10 muestran una banda de 170 pb correspondiente a secuencias centroméricas del cromosoma Y (◄).

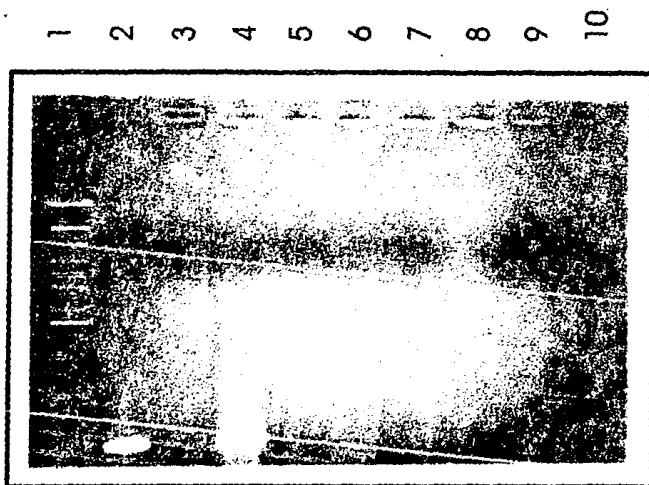


Figura 4.6 Análisis de los productos amplificados mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Y1 y Y2 en gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio.

Carriles 1: escalera de 100 pb; 2: control masculino (sangre); 3: control femenino (sangre); 4: testículo normal; 5: HV-8 (sangre); 6: HV-8 (ovario); 7: HV-8 (testículo); 8: HV-12 (sangre); 9: HV-12 (ovario); 10: HV-12 (testículo). Los carriles 2 y 4 muestran una banda de 170 pb correspondiente a secuencias centroméricas del cromosoma Y (◄).

5. Discusión

La diferenciación sexual es un proceso complejo determinado a varios niveles (cromosómico, gonadal y fenotípico) y probablemente resultado de la interacción de muchos factores (Bergadá y cols., 1994).

La diferenciación cromosómica está determinada por la constitución cromosómica, particularmente por los cromosomas sexuales. En el varón, el cariotipo corresponde a 46,XY y en la mujer 46,XX. En el cromosoma Y se localiza el gen *TDF*, que dispara los eventos iniciales de la cascada de la diferenciación testicular. La evidencia experimental actual permite establecer que el gen *SRY* corresponde a *TDF* (Berta y cols., 1990; Jäger y cols., 1990; Sinclair y cols., 1990; Koopman y cols., 1991). En ausencia del cromosoma Y, la gónada indiferenciada se convierte en un ovario. La diferenciación gonadal corresponde a la estructura histológica de las gónadas (testículo u ovario) de los individuos. Finalmente, la diferenciación fenotípica es la suma de las características sexuales secundarias y la apariencia de los genitales internos y externos (Bergadá y cols., 1994).

El proceso de la diferenciación sexual puede tener anomalías que se expresan clínicamente en síndromes como la disgenesia gonadal mixta, la disgenesia gonadal pura 46,XY y el hermafroditismo verdadero 46,XX (Kofman-Alfaro y cols., 1984).

Las gónadas en cada uno de estos padecimientos son diferentes: en la DGM generalmente se encuentra una estria fibrosa y un testículo contralateral (Robboy y cols., 1982); en la DGP 46,XY se presentan estrias fibrosas bilaterales (Swyer, 1955) y en el HV 46,XX existe tejido ovárico y testicular en gónadas separadas o formando ovotestes (Van Niekerk y Retief, 1981; Kofman-Alfaro y cols., 1992).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite realizar estudios retrospectivos a nivel molecular en diferentes tejidos embebidos en parafina (Goelz y cols., 1985; Impraim y cols., 1987; Greer y cols., 1991), incluyendo gónadas (Braun y cols., 1993).

El análisis molecular de las gónadas de pacientes con

anomalías de la diferenciación sexual permite entender el desarrollo gonadal patológico. Recientemente, se describió un caso de HV 46,XY con ovotestes bilaterales y sexo de asignación femenino. El análisis por PCR del gen SRY en el ADN extraído de sangre del paciente y de su padre, reveló que en ambos la secuencia génica era normal. Sin embargo, el estudio realizado en el ADN del tejido gonadal del paciente, permitió identificar dos mutaciones puntuales: una silenciosa y la otra, una sustitución de leucina por histidina en la posición 44 del dominio HMG de SRY. Esta última mutación fue considerada como el factor etiológico del padecimiento y se asumió que se originó de novo en una etapa poscigótica (Braun y cols., 1993).

Para el caso de la DGP 46,XY se han reportado mutaciones en el gen SRY en algunos pacientes (Tabla 1.1). Además se ha sugerido que la morfología histológica de la gónada puede orientar sobre la presencia o ausencia de mutaciones en SRY (Vilain y cols., 1993). En la bibliografía consultada, no se encontraron estudios moleculares en la DGM.

Los centrómeros de los cromosomas de mamíferos contienen diversas clases de secuencias repetidas, que en su conjunto abarcan varias megabases de longitud (Tyler-Smith y Willard, 1993). Estas secuencias se denominan ADN satélite (Cooper y cols., 1992). Se han encontrado varias clases de ADN satélite, definidas por las unidades básicas de repetición: 5, 42, 48, 68 y 170 pares de bases. El ADN alfoide, cuya unidad monomérica es de 170 pb, se encuentra en las regiones pericentroméricas de todos los cromosomas humanos (Cooper y cols., 1992). El ADN alfoide es el principal grupo de secuencias repetidas en "tandem" específico de primates, y a pesar de similitudes en secuencia, ésta es la única familia de ADN repetitivo que muestra especificidad cromosómica significativa. Este grupo de secuencias comprenden del 3 al 5% del ADN en cada cromosoma (Tyler-Smith y Willard, 1993). En experimentos de dosis génica se ha demostrado que existen unas 100 copias de ADN alfoide Y-específico, mientras que la secuencia equivalente en el cromosoma X se encuentra repetida aproximadamente 5000 veces (Witt y Erickson, 1989).

El par de oligonucleótidos X1 y X2 delimita un fragmento de 130 pb de ADN satélite alfa específico del cromosoma X, mientras que el par Y1 y Y2 flanquea al monómero alfoide de 170 pb del cromosoma Y (Witt y Erickson, 1989).

En el presente trabajo se estandarizaron las condiciones experimentales para extraer exitosamente ADN de gónadas incluidas en parafina, algunas de ellas normales (empleadas como controles) y otras correspondientes a 5 pacientes con diversas anomalías de la diferenciación sexual.

La técnica estandarizada (D) comparte algunos pasos con las otras metodologías probadas. Entre estos se encuentran la desparafinización, eliminación del xileno, digestión proteolítica, extracciones con fenol-cloroformo y precipitación del ADN (Kallio y cols., 1991; Braun y cols., 1993). Las diferencias entre estos pasos comunes son los volúmenes, tiempos y temperaturas de incubación y proporciones relativas de disolventes empleados.

Se considera que una unidad de absorbancia a 260 nm de una muestra de ADN de doble cadena corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$ (Sambrook y cols., 1989).

La cantidad promedio de ADN obtenido de 30 micrómetros de ovario normal incluido en parafina fue de 8.07 μg , mientras que en el caso de 30 μm de testículo fue de 11.27 μg (Tablas 4.2 y 4.3). Comparativamente, las áreas de corte de los bloques de ovario y testículo son diferentes, debido al mayor tamaño de este último. Esta diferencia morfológica explicaría los rendimientos de ADN obtenidos en ambos tejidos. Tomando en cuenta el tamaño de la muestra (30 micrómetros), puede asumirse que el rendimiento es bajo pero suficiente para utilizarse en PCR. No fue posible comparar estos rendimientos ya que en la literatura consultada no se informa la cantidad de ADN extraída de tejido incluido en parafina.

El criterio de pureza de una preparación de ácidos nucleicos es la relación A_{260}/A_{280} : un valor superior a 1.7 indica ADN o ARN altamente purificado (Ausubel y cols., 1990).

En el ADN extraído de bloques de ovario incluido en parafina el cociente A_{260}/A_{280} promedio fue de 1.32, en cambio esta

relación fue de 1.16 en el caso de los bloques de testículo (Tablas 4.2 y 4.3). Estos valores podrían parecer bajos e indicar contaminación proteica en las muestras. Sin embargo, estas relaciones son resultado del tamaño de la muestra y por ende, de la cantidad de ADN obtenida. Además la dificultad técnica para realizar extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en volúmenes tan pequeños disminuye la eficiencia de la eliminación de restos proteicos. Por otro lado, un mayor número de extracciones resulta en una pérdida considerable del ADN. A pesar de la contaminación proteica de la muestra, el ADN dirige con eficiencia la amplificación de secuencias repetidas de los cromosomas sexuales. Esto es debido a que la metodología de PCR puede efectuarse a partir de ADN de alta pureza o contaminado con otras macromoléculas (Arredondo-Peter, 1993). En la literatura no se ha descrito un estudio de pureza en ADN de tejidos incluidos en parafina.

Aunque el ADN de tejido incluido en parafina no se extrae intacto, puede emplearse para procedimientos como la hibridación ADN-ADN tipo Southern (Goelz y cols., 1985), hibridación tipo "dot blot" (Dubeau y cols., 1986) y análisis molecular por PCR (Impraim y cols., 1987; Shibata y cols., 1988a; Shibata y cols., 1988b; Greer y cols., 1991; Kallio y cols., 1991; Braun y cols., 1993). La degradación del ADN puede ser debida principalmente a 2 causas: la acción de las nucleasas entre el intervalo transcurrido desde la remoción del tejido hasta su fijación en formalina o al tiempo de almacenamiento del bloque incluido en parafina (Goelz y cols., 1985).

Los rendimientos y las relaciones A_{260}/A_{280} de las muestras de ADN obtenidas de 20 ml de sangre, tanto de controles como de pacientes, estuvieron dentro de los valores esperados (Tablas 4.4, 4.5 y 4.6) (Sambrook y cols., 1989; Escobar y Zamora, 1992).

En la amplificación enzimática del ADN extraído de gónadas normales incluidas en parafina utilizando los oligonucleótidos X1 y X2, se observó una banda inespecífica de ~ 310 pb además de la banda específica de 130 pb.

En un estudio anterior en el que se utilizó este par de

oligonucleótidos también se encontró una banda inespecífica con un tamaño aproximado de 300 pb (Witt y Erickson, 1989). Debido a la homología del ADN alfoide (Tyler-Smith y Willard, 1993), posiblemente en ambos estudios la banda de ~ 310 pb es producto de la amplificación inespecífica de los oligonucleótidos X1 y X2 con secuencias centroméricas de otros cromosomas.

El empleo del reactivo "Perfect match polymerase enhancer" (PMPE) permitió la eliminación significativa de la banda inespecífica, además de elevar el rendimiento del producto específico deseado. El fabricante no establece la naturaleza de este aditivo, pero refiere que es capaz de desestabilizar los complejos ADN-oligonucleótido apareados incorrectamente, aumentando la especificidad de la amplificación.

Uno de los mayores problemas en la técnica de PCR es la contaminación exógena (Bélak y Ballagi-Pordány, 1993). En el presente trabajo se tomaron una serie de medidas precautorias considerando que se amplificaron secuencias sexo-específicas. Los resultados obtenidos en los controles demuestran la eficiencia de estas medidas (Figuras 4.1 y 4.4).

Cabe señalar que el hecho de encontrar la banda de 170 pb con los oligonucleótidos Y1 y Y2 en líneas celulares con cromosomas marcadores, indica invariablemente la presencia de cromosoma Y (Witt y cols., 1993).

En el paciente DG-1 se identificó la presencia de cromosoma Y en la estría fibrosa y en el testículo, mientras que en el caso DG-3 sólo se determinó su presencia en el testículo (Figura 4.5). El cariotipo efectuado en cultivo de linfocitos permitió establecer la presencia de cromosomas Y anormales (dicéndrico en DG-1 e isodicéntrico en DG-3). Sin embargo, en ambos casos no se determinó citogenéticamente la proporción de células 45,X y 46,XY en las gónadas de cada paciente.

Se ha propuesto que el desarrollo gonadal asimétrico en la disgenesia gonadal mixta podría ser consecuencia directa de la proporción de células 45,X y 46,XY presentes en la gónada indiferenciada: así, se desarrolla testículo en la cresta genital poblada preferentemente por células 46,XY, mientras que la estría

fibrosa puede ser resultado del predominio de células 45,X en el primordio gonadal (Bergadá y cols., 1994). En un estudio posterior, sería importante analizar la existencia del gen *SRY* en las gónadas de ambos pacientes. La presencia de este gen en la gónada con predominio de células 46,XY podría explicar el desarrollo del testículo mediante la cascada de diferenciación testicular normal. En ausencia de *SRY* el tejido testicular se explicaría por mutaciones en loci autosómicos o ligados al cromosoma X que permiten la diferenciación testicular en ausencia de *TDF*.

La paciente DP-2 con disgenesia gonadal pura 46,XY tiene cromosoma Y según el análisis citogenético (Tabla 4.1). Por PCR se demostró que el genoma de la paciente presenta secuencias centroméricas del cromosoma Y aún en la estria fibrosa (Figura 4.5). El 80% de las mujeres XY con DGP presentan el gen *SRY* normal (Hawkins, 1993). En estos casos, se ha sugerido que la reversión sexual es debida a mutaciones en genes localizados en cromosomas diferentes al Y, que invalidan la función de *TDF* (McElreavey y cols., 1993b). El porcentaje restante de pacientes con DGP 46,XY han sido atribuidas a mutaciones en *SRY* (Tabla 1.1). En el caso de la paciente DP-2, la reversión sexual completa podrá explicarse con mayor claridad cuando se tengan los resultados de la secuenciación del gen *SRY*.

Los dos casos de hermafroditismo verdadero 46,XX (HV-8 y HV-12) carecen de cromosoma Y tanto en leucocitos como en sus respectivas gónadas (Figura 4.6). Las alternativas etiológicas en estos pacientes son dos: la hipótesis de Ferguson-Smith (1966) y la teoría de mutaciones en loci (ubicados en cromosoma X o autosomas) que permiten la diferenciación testicular en ausencia de *TDF* (Berkovitz y cols., 1992). Se ha demostrado que la mayoría de los HV 46,XX no presentan material derivado del cromosoma Y, incluyendo al gen *SRY* (McElreavey y cols., 1992a).

En todos los pacientes estudiados (DG-1, DG-3, DP-2, HV-8 y HV-12) sería importante analizar la presencia o ausencia de los genes *ZFY* y *SRY*.

Los ovarios y testículos empleados eran tejidos normales de

procesamiento reciente (máximo 3 meses de edad). No obstante, el tiempo de almacenamiento del bloque no afectó de ninguna manera a esta metodología ya que se amplificó con eficiencias similares el ADN extraído de los controles normales y el ADN extraído de bloques de hasta 9 años de edad. El análisis por PCR de ADN genómico extraído de tejido neoplásico incluido en parafina, ha demostrado la amplificación exitosa a partir de un bloque con una edad de 40 años (Shibata y cols., 1988b).

6. Conclusiones

Los objetivos propuestos inicialmente se cumplieron satisfactoriamente desde el punto de vista experimental.

1) Se logró la estandarización de una técnica para extraer ADN de gónadas incluidas en parafina que puede emplearse en estudios retrospectivos a nivel molecular.

2) Se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído de gónadas incluidas en parafina.

3) El rendimiento promedio del ADN extraído de testículo incluido en parafina es significativamente mayor que la cantidad obtenida de ovarios. El ADN extraído de ambas gónadas normales está contaminado con restos de proteínas, encontrándose en las muestras de testículo las relaciones A_{260}/A_{280} más bajas. Tanto la pureza como el rendimiento están directamente relacionadas con las áreas de las gónadas y las diferencias estructurales entre ellas.

4) El empleo de los oligonucleótidos X1, X2 y Y1, Y2 permitió la amplificación de secuencias alfoides centroméricas de los cromosomas sexuales en el ADN extraído de gónadas incluidas en parafina. Por tanto, se demostró que este ADN es cualitativa y cuantitativamente adecuado para funcionar como molde en reacciones de amplificaciones enzimáticas.

5) El tiempo transcurrido desde la fijación e inclusión del tejido hasta el procesamiento de la muestra para extraer el ADN, no afectó de ninguna manera a las amplificaciones: se analizaron satisfactoriamente bloques con 9 años de edad.

6) Los datos obtenidos de la amplificación de ADN extraído de leucocitos y de gónadas incluidas en parafina mostraron los mismos hallazgos moleculares. Estos resultados revelaron la presencia de una línea celular con cromosoma Y aún en la estría fibrosa.

7) Se descartó el mosaïcismo críptico con cromosoma Y como etiología de la presencia de testículo en los hermafroditas verdaderos 46,XX estudiados. Su condición puede explicarse por el planteamiento de Ferguson-Smith o bien mediante la teoría de las mutaciones autosómicas o ligadas al X que permiten la determinación testicular en ausencia de *TDF*.

8) Dentro de la línea de investigación sobre biología molecular aplicada a la diferenciación sexual, esta tesis es un resultado preliminar y representa la metodología a seguir para el análisis del factor testículo-determinante *SRY* en aquéllos pacientes con diagnósticos de disgenesias gonadales mixtas, disgenesias gonadales puras 46,XX y hermafroditas verdaderos 46,XX directamente en gónada.

7. Bibliografía

Abbas NE, Toublanc JE, Boucekkine C, Toublanc M, Affara NA, Job JC, Fellous M. 1990. A possible common origin of "Y-negative" human XX males and XX true hermaphrodites. *Hum Genet*; 84: 356-60.

Affara NA, Chalmers IJ, Ferguson-Smith MA. 1993. Analysis of the SRY gene in 22 sex-reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. *Hum Mol Genet*; 2: 785-9.

Arredondo-Peter R. 1993. La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: Un impacto reciente en la biología molecular. *Boletín de Educación Bioquímica*; 12: 3-14.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DE, Seidman JG, Smith JA, Kevin S (eds). 1990. Current protocols in molecular biology. Vol 2. John Wiley & Sons, USA.

Bagasra O, Hauptman SP, Lischner HW, Sachs M, Pomerantz RJ. 1992. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by *in situ* polymerase chain reaction. *N Engl J Med*; 326: 1385-91.

Belák S, Ballagi-Pordány A. 1993. Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. *Mol Cell Probes*; 7: 241-8.

Bennett CP, Docherty Z, Robb SA, Ramani P, Hawkins JR, Grant D. 1993. Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet*; 30: 518-20.

Bergadá C, Coco R, Chemes H. 1994. Asymmetric gonadal differentiation, en: Martínez-Mora J (ed): Intersexual states. Disorders of sex differentiation. Ed. Doyma, Barcelona, España; p 283-9.

Berkovitz GD. 1992. Abnormalities of gonadal determination and differentiation. *Sem Perinatol*; 16: 289-98.

Berkovitz GD, Fechner PY, Zacur HW. 1991. Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: Its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine*; 70: 375-83.

Berkovitz GD, Fechner PY, Marcantonio SM, Bland G, Stetten G, Goodfellow PN, Smith KD, Migeon CJ. 1992. The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Hum Genet*; 88: 411-6.

Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*; 348: 448-50.

Bevan IS, Rapley R, Walker MR. 1992. Sequencing of PCR-amplified DNA. *PCR Methods and Applic*; 1: 2228.

Bogan JS, Page DC. 1994. Ovary? Testis?- A mammalian dilemma. *Cell*; 76: 603-7.

Boucekkine C, Toublanc JE, Abbas N, Semrouni M, Vilain E, McElreavey K, Mugnered 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: 236-40.

Braun A, Kammerer S, Cleve H, Löhns U, Schwarz HP, Kuhnle U. 1993. True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male gonadal sex-determining locus (SRY): Molecular genetics and histological findings in a sporadic case. *Am J Hum Genet*; 52: 578-85.

Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL. 1991. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*; 349: 38-44.

Bull JJ, Hillis DM, O'Steen S. 1988. Mammalian ZFY sequences exist in reptiles regardless of sex-determining mechanism. *Science*; 242: 567-9.

Cease KB, Potcova CA, Lohff CJ, Zeigler ME. 1994. Optimized PCR using Vent polymerase. *PCR Methods Applic*; 3: 298-300.

Chang HJ, Clark RD, Bachman H. 1990. The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: An analysis of 92 prenatally diagnosed cases. *Am J Hum Genet*; 46: 156-67.

Cooper KF, Fisher RB, Tyler-Smith C. 1992. Structure of the pericentric long arm region of the human Y chromosome. *J Mol Biol*; 228: 421-32.

CPEP: Curso Piloto Experimental Premédico. 1988. Manual de prácticas.

Crisan D, Cadoff EM, Mattson JC, Hartle KA. 1990. Polymerase chain reaction: amplification of DNA from fixed tissue. *Clin Biochem*; 23: 489-95.

Cuevas-Covarrubias SA, Kofman-Alfaro SH. 1990. El cromosoma Y humano. *Rev Inv Clin*; 42: 290-7.

D'Aquila RT, Bechtel LJ, Videler JA, Eron, JJ, Gorczyca P, Kaplan JC. 1991. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res*; 19: 3749.

Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW, Jones PA. 1986. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res*; 46: 2964-9.

Ellis NA, Goodfellow PJ, Pym B, Smith M, Palmer M, Frischauf AM, Goodfellow PN. 1982. The pseudoautosomal boundary in man is defined by an Alu repeat sequence inserted on the Y chromosome. *Nature*; 337: 81-4.

Erickson RP. 1992. Universidad de Arizona. Comunicación personal.

Erich HA. 1989. PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, USA.

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

Escobar MLM, Zamora FA. 1992. Elaboración de un banco de DNA de pacientes con anomalías de la diferenciación sexual. Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM.

Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD. 1993. The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness. *J Clin Endocrinol Metab*; 76: 690-5.

Ferguson-Smith MA. 1966. X-Y chromosomal interchange in the aetiology of true hermaphroditism and of XX Klinefelter's syndrome. *Lancet*; 2: 475-6.

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: 4497-506.

Fincham JRS. 1987. Genética. Editorial Omega, Barcelona, España.

Fisher EMC, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Bentley LJ, Willard HF, Bieber FR, Page DC. 1990. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell*; 63: 1205-18.

Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. 1992. Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science*; 258: 1784-7.

Fukutani K, Kajiwara T, Nagafuchi S, Nakahori Y, Nakagome Y. 1993. Detection of the testis determining factor in an XX man. *J Urol*; 149: 126-8.

Giese K, Cox J, Grosschedl R. 1992. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*; 69: 185-95.

Gelfand DH, Sninsky JJ. 1993. Fidelity questions and answers. *Amplifications*; Número 11: 16-9.

Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. 1985. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun*; 130: 118-26.

Goodfellow PN, Hawkins JR, Sinclair AH. 1991. Cloning the mammalian sex-determining gene, *TDF*. En Davies KE, Tilghman S, (eds): *Genome Analysis, Volume 3: Genes and phenotypes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

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

Greer CE, Lund JK, Manos MM. 1991. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Applic*; 1: 46-50.

Gressens P, Martin JR. 1994. *In situ* polymerase chain reaction: localization of HSV-2 DNA sequences in infections of the nervous system. *J Virol Methods*; 46: 61-83.

Grosschedl R, Giese K, Pagel J. 1994. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *TIG*; 10: 94-100.

Grumbach MM, Conte FA. 1985. Desórdenes de la diferenciación sexual; En Williams RH (ed): *Tratado de Endocrinología*, 6ª edición, Ed. Interamericana, Madrid, España, p. 454-551.

Grumbach MM, Conte FA. 1992. Disorders of sex differentiation; En Wilson JD, Foster D.W. (eds): *Williams Textbook of Endocrinology*, 8ª. edition, W.B. Saunders Co. USA.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Mtsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, 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: 245-50.

Haqq CM, King CY, Donahoe PK, Weiss MA. 1993. *SRY* recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90: 1097-101.

Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1992. DNA binding activity of recombinant *SRY* from normal males and XY females. *Science*; 255: 453-6.

Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow PN. 1992a. Mutational analysis of *SRY*: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet*; 88: 471-4.

Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD. 1992b. Evidence for increased prevalence of *SRY* mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet*; 51: 979-84.

Hawkins JR. 1993. Mutational analysis of *SRY* in XY females. *Hum Mutation*; 2: 347-50.

Hébert B, Bergeron J, Potworowski EF, Tijssen P. 1993. Increased PCR sensitivity by using paraffin wax as a reaction mix overlay. *Mol Cell Probes*; 7: 249-52.

Hodgkin J. 1992. Genetic sex determination mechanisms and evolution. *BioEssays*; 14: 253-61.

Impraim CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL. 1987. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun*; 142: 710-6.

Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (eds). 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications; Academic Press, San Diego, USA.

Jäger RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. 1990a. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene *SRY*. *Nature*; 348: 452-4.

Jäger RJ, Ebensperger C, Fraccaro M, Scherer G. 1990b. A *ZFY*-negative 46,XX true hermaphrodite is positive for the Y pseudoautosomal boundary. *Hum Genet*; 85: 666-8.

Jäger RJ, Pfeiffer RA, Scherer G. 1991. A familial amino acid substitution in *SRY* can lead to conditional XY sex inversion. *Am J Hum Genet (Suppl)*; 49: 219.

Jäger RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G. 1992. A familial mutation in the testis-determining gene *SRY* shared by both sexes. *Hum Genet*; 90: 350-5.

Josso N. 1992. Hormonal regulation of sexual differentiation. *Sem Perinatol*; 16: 279-88.

Kallio P, Syrjänen S, Tervahauta A, Syrjänen K. 1991. A simple method for isolation of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded samples for PCR. *J Virol Methods*; 35: 39-47.

Kemp DJ, Smith DB, Foote SJ, Samaras N, Peterson MG. 1989. Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86: 2423-7.

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

Kofman-Alfaro S, Ulloa-Aguirre A, Larrea F, Pérez-Palacios G. 1988. Diferenciación sexual normal y patológica; En Guizar-Vázquez JJ. (ed). *Genética clínica: Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*, Ed. El Manual Moderno, México, D.F; p. 396-420.

Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Pérez-Palacios G. 1992. Estudios clínicos, citogenéticos, endocrinológicos e histológicos en hermafroditas verdaderos. *Rev Inv Clin*; **44**: 229-34.

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**: 940-2.

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**: 450-2.

Koopman P, Ashworth A, Lovell-Badge R. 1991a. The ZFY gene family in humans and mice. *TIG*; **7**: 132-6.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1991b. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*; **351**: 117-21.

Kvaloy K, Galvagni F, Brown WRA. 1994. The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum Mol Genet*; **3**: 771-8.

Linskens RK, Odink, RJH, Van der Linden, JC, Ekkelkamp, S, Delemarre-Van de Waal, HA. 1992. True hermaphroditism in 45,X/46,XY mosaicism. *Horm Res*; **37**: 241-4.

Lyon MF. 1992. Some milestones in the history of X-chromosome inactivation. *Annu Rev Genet*; **26**: 17-28.

McElreavey KM, Vilain E, Abbas N, Brauner R, Nihoul-Fekete C, Richaud F, Rappaport R, Raymond JP, Toublanc JE, Fellous M. 1991. Conditional mutation in the testis-determining region suggests a second sex-determining gene in humans. *Am J Hum Genet (Suppl)*; **49**: 413.

McElreavey K, Rappaport R, Vilain E, Abbas N, Richaud F, Lortat-Jacob S, Berger R, LeConiat M, Boucekkine C, Kucheria K, Téntamy S, Nihoul-Fekete C, Brauner R, Fellous M. 1992a. A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY. *Hum Genet*; **90**: 121-5.

McElreavey K, Vilain E, Abbas N, 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**: 11016-20.

McElreavey KD, Vilain E, Boucekkine C, Vidaud M, Jaubert F, Richaud F, Fellous M. 1992c. XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. *Genomics*; **13**: 838-40.

McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. 1993a. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA*; **90**: 3368-72.

McElreavey K, Vilain E, Cotinot C, Payen E, Fellous M. 1993b. Control of sex determination in animals. *Eur J Biochem*; **278**: 769-83.

McLaren A. 1988. Sex determination in mammals. *TIG*; **4**: 153-7.

Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mutchinick O, Fernández del Castillo C, Reyes E, Pérez-Palacios G. 1993. Mixed gonadal dysgenesis: clinical, cytogenetic, endocrinological, and histopathological findings in 16 patients. *Am J Med Genet*; **46**: 263-7.

Mittwoch U. 1992. Sex determination and sex reversal: genotype, phenotype, dogma and semantics. *Hum Genet*; **89**: 467-79.

Moore CCD, Grumbach MM. 1992. Sex determination and gonadogenesis: A transcription cascade of sex chromosome and autosome genes. *Sem Perinatol*; **16**: 266-78.

Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*; **155**: 335-50.

Münsterberg A, Lovell-Badge R. 1991. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*; **113**: 613-24.

Müller U, Kirkels VGHJ, Scheres JMJ. 1992A. Absence of Turner stigmata in a 46,XYp- female. *Hum Genet*; **90**: 239-42.

Müller J, Schwartz M, Skakkebekk NE. 1992B. Analysis of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in sex reversed patients: point-mutation in SRY causing sex-reversion in a 46,XY female. *J Clin Endocrinol Metab*; **75**: 331-3.

Nasrin N, Buggs C, Kong XF, Carnazza J, Goebel M, Alexander-Bridges M. 1991. DNA-binding properties of the product of the testis-determining gene and a related protein. *Nature*; **354**: 317-20.

Numabe H, Nagafuchi S, Nakahori Y, Tamura T, Kiuchi H, Namiki M, Kohda N, Fukushima Y, Fuse H, Kusano M, Arai T, Matsuzaki Y, Fukutani K, Isurugi K, Kuroki Y, Ikeuchi T, Yoshida M, Minowada S, Nakagome Y. 1992. DNA analysis of XX and XX-hypospadiac males. *Hum Genet*; 90: 211-4.

Ogata T, Matsuo N. 1992. Comparison of adult height between patients with XX and XY gonadal dysgenesis: support for a Y specific growth gene(s). *J Med Genet*; 29: 539-41.

Ogata T, Hawkins JR, Taylor A, Matsuo N, Hata J, Goodfellow PN. 1992. Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype: support for the existence of a gene(s), located in distal Xp, involved in testis formation. *J Med Genet*; 29: 226-30.

Olsen MM, Caldamone AA, Jackson CL. 1988. Gonadoblastoma in infancy: indications for early gonadectomy in 46,XY gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg*; 23: 270-1.

O'Reilly AJ, Affara NA, Simpson E, Chandler P, Goulmy E, Ferguson-Smith MA. 1992. A molecular deletion map of the Y chromosome long arm defining X and autosomal homologous regions and the localisation of the HYA locus to the proximal region of the Yq euchromatin. *Hum Mol Genet*; 1: 379-85.

Page DC. 1987. Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development (Suppl)*; 101: 151-5.

Page DC, Mosher R, Simpson EM, 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: 1091-104.

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: 279-81.

Page DC, Alagappan R, Beer-Romero P, Bogan J, Bonkovsky J, Brown L, Foote S, Lee T, Luch SW, Mosher R, Pringle J, Simpson E, Vollrath D, Zinn A. 1991. The roles of Y chromosomal genes in mammalian development. *Am J Hum Genet (Suppl)*; 49: 88.

Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas NE, Fellous M. 1989. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature*; 342: 937-9.

Pao CC, Kao SM, Hor JJ, Chang SY. 1993. Lack of mutational alteration in the conserved regions of ZFY and SRY genes of 46,XY females with gonadal dysgenesis. *Hum Reprod*; 8: 224-8.

Perkin-Elmer Corporation. 1992. Biotechnology catalog.

Pivnick EK, Wachtel S, Woods D, Simpson JL, Bishop CE. 1992. Mutations in the conserved domain of SRY are uncommon in XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet*; 90: 308-10.

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: 315-24.

Rastan S. 1994. X chromosome inactivation and the XIST gene. *Curr Op Genet Dev*; 4: 292-7.

Robboy SJ, Miller T, Donahoe PK, Jahre C, Welch WR, Haseltine FP, Miller WA, Atkins L, Crawford JD. 1982. Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis: Perspective derived from a clinicopathologic analysis of twenty-one cases. *Hum Pathol*; 13: 700-16.

Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Geremia R. 1993. Direct evidence that the mouse sex-determining gene Sry is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. *Mol Reprod Dev*; 34: 369-73.

Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis KM, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*; 230: 1350-4.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*; 239: 487-91.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Santos AC, Osório-Almeida L. 1993. Simultaneous extraction of RNA and DNA from paraffin-embedded tissues. *TIG*; 9: 231.

Sardelli AD. 1993. Plateau effect-understanding PCR limitations. *Amplifications*; Numéro 9: 1-5.

Sauer MV, Lobo RA, Paulson RJ. 1989. Successful twin pregnancy after embryo donation to a patient with 46,XY gonadal dysgenesis. *Am J Obstet Gynecol*; 161: 380-1.

Scherer G, Schempp W, Baccichetti C. 1989. Duplications of an Xp segment that includes the ZFX locus causes sex inversion in man. *Hum Genet*; 81: 291-4.

Schneider-Gädicke A, Beer-Romero P, Brown LG, Nussbaum R, Page DC. 1989. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*; 57: 1247-58.

Seraj IM, Chase DR, Chase RL, King A, Jacokes A. 1993. Malignant teratoma arising in a dysgenetic gonad. *Gynecol Oncol*; 50: 254-8.

Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. 1988a. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med*; 167: 225-30.

Shibata D, Martin WJ, Arnheim N. 1988b. Analysis of forty-year-old paraffin-embedded thin tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Res*; 48: 4564-6.

Simpson E, Chandler P, Goulmy E, Disteche CM, Ferguson-Smith MA, Page, DC. 1987. Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on human Y chromosome. *Nature*; 326: 876-8.

Sinclair AH, Foster JW, Spencer JA, Page DC, Palmer M, Goodfellow PN, Marshall Graves JA. 1988. Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature*; 336: 780-3.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*; 346: 240-4.

Skordis NA, Stetka DG, MacGillivray MH, Greenfield SP. 1987. Familial 46,XX males coexisting with familial 46,XX true hermaphrodites in same pedigree. *J Pediatr*; 110: 244-8.

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.

Stratagene cloning systems. 1993. Product catalog.

Swyer GIM. 1955. Male pseudohermaphroditism: a hitherto undescribed form. *BMJ*; 2: 709-12.

Ternes Pereira E, Cabral de Almeida JC, Gunha 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: 591-5.

Tho, SPT, Layman LC, Lanclos KD, Plouffe L, Byrd JR, McDonough PG. 1992. Absence of the testicular determining factor gene *SRY* in XX true hermaphrodites and presence of this locus in most subjects with gonadal dysgenesis caused by Y aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol*; 167: 1794-802.

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. 1991. Genetics in medicine, Fifth edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. pp. 111.

Tyler-Smith C, Willard HF. 1993. Mammalian chromosome structure. *Curr Op Gen Dev*; 3: 390-7.

Van der Auwera B, Van Roy N, De Paepe A, Hawkins JR, Liebaers I, Castedo S, Dumon J, Speleman F. 1992. Molecular cytogenetic analysis of XX males using Y-specific DNA sequences, including *SRY*. *Hum Genet*; 89: 23-8.

Van Heyningen V, Hastie ND. 1992. Wilm's tumor: Reconciling genetics and biology. *TIG*; 8: 16-21.

Van Niekerk WA, Retief AE. 1981. The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet*; 58: 117-22.

Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, de la Chapelle A, Weissenbach J. 1986. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet*; 38: 109-24.

Verp MS, Simpson JL. 1987. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet*; 25: 191-218.

Vilain E, McElreavey K, Jaubert F, Raymond JP, Richaud F, ssFellous M. 1992a. Familial case with sequence variant in the testis-determining region associated with two sex phenotypes. *Am J Hum Genet*; 50: 1008-11.

Vilain E, Fellous M, McElreavey K. 1992b. Characterisation and sequence of the 5' flanking region of the human testis-determining factor, *SRY*. *Methods Mol Cell Biol*; 3: 128-34.

Vilain E, Jaubert F, Fellous M, McElreavey K. 1993. Pathology of 46,XY pure gonadal dysgenesis: absence of testis differentiation associated with mutations in the testis-determining factor. *Differentiation*; 52: 151-9.

Wages JM, Fowler AK. 1993. Amplification of low copy number sequences. *Amplifications*; Número 11: 1-3.

White BA (ed). 1993. PCR protocols: current methods and applications. *Methods in Molecular Biology* Vol. 15. Humana Press, New Jersey, USA.

Witt M, Erickson, RP. 1989. A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Hum Genet*; 82: 271-4.

Witt M, 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.

Witt M, Michalczak K, Latos-Bielenska A, Jaruzelska J, Kuczora I, López M. 1993. An improved, non-isotopic method of screening cells from patients with abnormalities of sexual differentiation for Y chromosomal DNA content. *J Med Genet*; 30: 304-7.

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: 814-7.