

11282
I



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**
División de Estudios de Posgrado Investigación
Doctorado en Ciencias Médicas

**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN SRY EN PACIENTES
CON DIAGNOSTICO DE DGM O MOSAICO DE SINDROME DE
TURNER CON PRESENCIA DE SECUENCIAS DE ADN DERIVADAS
DEL CROMOSOMA Y**

ALUMNA: M en C. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

TUTOR: DR. JUAN PABLO MENDEZ BLANCO
Unidad de Investigación Médica
en Biología del Desarrollo
Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional
Siglo XXI, IMSS

277783

MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor y a mis compañeras de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca 95947.

ABREVIATURAS

FDT:	Factor determinante testicular.
ZFY:	Gen que codifica para las proteínas de dedos de Zinc del cromosoma Y.
Kb:	Kilobases.
SRY:	Gen determinante del sexo del cromosoma Y humano.
aa:	Aminoácidos.
HMG:	Proteínas de alta movilidad.
Sry:	Gen determinante del sexo del cromosoma Y murino.
pb:	Pares de bases.
HIM:	Hormona inhibidora de estructuras Mülllerianas.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
T:	Testosterona.
DHT:	Dihidrotestosterona.
DG:	Disgenesia gonadal.
ST:	Síndrome de Turner.
DGM:	Disgenesia gonadal mixta.
MST:	Mosaico de síndrome de Turner.
ddH ₂ O:	Agua desionizada.
nt:	Nucleótido.

INDICE

INTRODUCCION.....	1-16
OBJETIVO E HIPOTESIS.....	17
SUJETOS.....	18,19
METODOS.....	19-28
Extracción de ADN de sangre periférica.....	19,20
Extracción de ADN de tejido gonadal.....	21
Extracción de ADN de tejido gonadal incluido en parafina.....	22,23
Síntesis de oligonucleótidos.....	23
Reacción en cadena de la polimerasa.....	24,25
Secuenciación automática.....	26,27
Secuenciación manual.....	27,28
RESULTADOS.....	29,30
DISCUSION.....	31-36
BIBLIOGRAFIA.....	37-47

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- TABLA 1: Mutaciones en el gen SRY en pacientes con DG 46,XY.
- TABLA 2: Características clínicas de las pacientes con MST.
- TABLA 3: Características clínicas de los pacientes con DGM.
- TABLA 4: Características citogenéticas de las pacientes con MST.
- TABLA 5: Características citogenéticas de los pacientes con DGM.
- FIGURA 1: Gen SRY.
- FIGURA 2: Cascada de la diferenciación sexual.
- FIGURA 3: Extracción de ADN de sangre periférica.
- FIGURA 4: Extracción de ADN de gónadas frescas.
- FIGURA 5: Extracción de ADN de gónadas fijadas en parafina.
- FIGURA 6: Reacción en cadena de la polimerasa.
- FIGURA 7: Secuenciación automática.
- FIGURA 8: Secuenciación manual.
- FIGURA 9: Reacción en cadena de la polimerasa del exón del gen SRY (del ADN extraído de sangre periférica) de las pacientes con MST.
- FIGURA 10: Reacción en cadena de la polimerasa del exón del gen SRY (del ADN extraído de sangre periférica) de los pacientes con DGM.
- FIGURA 11: Reacción en cadena de la polimerasa del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada fresca) de los pacientes con MST y DGM.
- FIGURA 12: Reacción en cadena de la polimerasa del fragmento de 420 pb del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada incluida en parafina) de los pacientes con MST y DGM.
- FIGURA 13: Reacción en cadena de la polimerasa del fragmento de 432 pb del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada incluida en parafina) de los pacientes con MST y DGM.

- FIGURA 14:** Secuenciación manual, en dirección 5' del exón del gen SRY (del ADN extraído de sangre periférica) de las pacientes con MST.
- FIGURA 15:** Secuenciación automática, en dirección 3' del exón del gen SRY (del ADN extraído de sangre periférica) de la paciente MST1.
- FIGURA 16:** Secuenciación automática, en dirección 3' del exón del gen SRY (del ADN extraído de sangre periférica) de la paciente MST3.
- FIGURA 17:** Secuenciación automática, en dirección 5' del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada fresca) de la paciente MST1.
- FIGURA 18:** Secuenciación automática, en dirección 3' del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada fresca) de la paciente MST1.
- FIGURA 19:** Secuenciación automática, en dirección 5' del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada fresca) de la paciente MST3.
- FIGURA 20:** Secuenciación automática, en dirección 3' del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada fresca) de la paciente MST3.

SUMMARY

Sexual differentiation involves a cascade of events initiated by the presence of the SRY gene (testis determining gene). Mutations of SRY constitute the cause of XY sex reversal in approximately 10-15% of females with gonadal dysgenesis. Most of these mutations have been located in the HMG box of the gene, which is the region responsible for DNA binding and bending; however, various mutations outside the HMG box have been reported. Turner syndrome (TS) is one of the most common chromosomal abnormalities in humans the presence of a Y chromosome or Y-derived material has been documented in frequencies ranging from 4% to 61%. Mixed gonadal dysgenesis (MGD) is a gonadal sex abnormality where generally a streak gonad and a testis are observed.

We performed molecular studies of the SRY gene in 3 patients with TS with Y chromosome or Y-derived material and in 10 patients with MGD. We demonstrated a missense mutation in the 5'-non HMG region of the SRY gene in 2 patients with TS with mosaicism. This mutation induced a change from serine to asparagine (S18N). We analyzed the DNA from the father and older brother of one of the patients with TS. In both cases the SRY gene was normal, demonstrating that the mutation was "de novo". This mutation was not identified in 75 normal males, making the possibility of polymorphism very unlikely. The other patient with TS as well as, the 10 patients with MGD had a normal SRY sequence. The fact that this mutation has been reported in a patient with 46,XY gonadal dysgenesis demonstrates that a single genetic abnormality can result in a wide range of phenotypic expression.

RESUMEN

La diferenciación sexual masculina comprende una cascada de eventos iniciada por la presencia y acción del gen SRY (factor determinante testicular). Se ha descrito que del 10% al 15% de los sujetos con disgenesia gonadal 46,XY presentan mutaciones en el gen SRY, las cuales interfieren con el desarrollo testicular. La mayoría de esas mutaciones se localizan en la región que codifica para la caja HMG, la cual corresponde al dominio de unión de la proteína SRY al ADN; asimismo, se han informado mutaciones fuera de la caja HMG. El síndrome de Turner es una de las alteraciones del sexo cromosómico más frecuentes y trabajos previos llevados a cabo en este tipo de pacientes con diferentes cariotipos, han demostrado que del 4 al 61% presentan en su genoma un cromosoma Y o material derivado del cromosoma Y. La disgenesia gonadal mixta es una alteración del sexo cromosómico al sexo gonadal en la cual generalmente se observan una estría gonadal y un testículo contralateral con un fenotipo ambigüo.

Se llevó a cabo el estudio molecular del gen SRY en 3 pacientes con mosaico de síndrome de Turner con presencia de cromosoma Y normal o anormal y en 10 pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta. En dos pacientes con mosaico de síndrome de Turner se demostró la presencia de una mutación en sentido erróneo en la región aminoterminal del gen SRY fuera de la caja HMG, esta mutación da lugar al cambio S18N. La secuencia del gen SRY del padre y de un hermano de una de las pacientes mosaico de síndrome de Turner no presentó alteraciones, lo que demostró que la mutación, en dicho caso, fue *de novo*. Esta mutación no se identificó en ninguno de los 75 controles masculinos, lo cual hace poco probable que este cambio de base represente un polimorfismo. No se encontraron mutaciones en el marco de lectura del gen SRY en la otra paciente con mosaico de síndrome de Turner así como en ninguno de los 10 pacientes con disgenesia gonadal mixta. El hecho de que esta mutación se había reportado previamente en un sujeto con disgenesia gonadal parcial 46,XY sugiere que una misma alteración génica puede expresarse en fenotipos diferentes.

INTRODUCCION

DIFERENCIACION SEXUAL NORMAL

La diferenciación sexual constituye uno de los fenómenos biológicos de mayor trascendencia y complejidad, el cual permite la perpetuación de las especies con reproducción sexual. El dimorfismo sexual es consecuencia de una serie de eventos que se presentan en las etapas más tempranas de la vida, requiriéndose un alto grado de precisión en sus mecanismos de regulación. Este se presenta en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica. La diferenciación cromosómica se inicia con la fertilización, al momento en que un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza a un óvulo que aporta un cromosoma X. De esta forma, se establece el dimorfismo sexual que caracteriza a los mamíferos, en los cuales la hembra presenta un complemento cromosómico sexual XX y el macho XY; los eventos posteriores en la diferenciación sexual, dependerán de la presencia de factores determinantes de masculinización (1). La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma (2,3).

En el humano, el dimorfismo sexual gonadal se inicia en la sexta semana de la vida intrauterina (4,5). Desde el punto de vista embriológico, la gónada primitiva se forma por dos tipos de células: las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales (6). La gónada primitiva se transformará en testículo si está

presente y actúa el factor determinante testicular (FDT) localizado en el cromosoma Y; de no existir éste, la gónada primitiva se diferenciará hacia ovario (7,8).

Han transcurrido más de 30 años desde que por primera vez se trató de caracterizar al FDT. A lo largo de este lapso de tiempo se han postulado diversas secuencias y genes que supuestamente correspondían al FDT. Entre ellos se encuentran el antígeno H-Y (9,10), las secuencias Bkm ("Bandad Krait minor") (11) y el gen ZFY (gen que codifica para las proteínas de los dedos de Zinc del cromosoma Y) (12). Por más de 10 años se consideró al antígeno H-Y como el FDT; sin embargo, el hallazgo de ratones XX con testículos y antígeno H-Y negativo llevó a rechazar dicha hipótesis (13,14). Las secuencias Bkm que se encontraban conservadas en el genoma de diversos vertebrados, no se localizaban en la región sexo específica en el hombre, motivo por el cual fueron también descartadas como el FDT (11). En 1987 Page y cols. (12) analizaron las secuencias del ADN de una subregión del intervalo 1 (1A2) de la región determinante del sexo del cromosoma Y, las cuales se encontraron presentes en un varón XX y ausentes en una mujer XY con translocación Y;22, identificándose entonces al gen ZFY, el cual codificaba una proteína con 13 motivos de "dedos de Zn". Este dominio de unión al ADN era similar a aquellos informados en los factores de transcripción; asimismo, se observó que este gen se encontraba conservado en los mamíferos euterios. Con base en los datos anteriores, se propuso al ZFY como el FDT. Evidencias posteriores como fueron: la presencia de un gen homólogo en el cromosoma X (ZFX) que escapaba a la inactivación (15); que ZFY en los mamíferos metaterios se encontraba en los autosomas (16); el hallazgo de la expresión de los genes Zfy-1 y Zfy-2 (homólogos murinos de ZFY)

en células germinales, normalmente no relacionadas con la diferenciación testicular (17) y la presencia en tres varones XX y en un hermafrodita verdadero 46,XX de un fragmento del cromosoma Y de 60 kilobases (Kb) que no incluía al ZFY (18,19), demostraron que tampoco ZFY era el FDT.

En 1990 Sinclair y cols. (7) identificaron finalmente al gen que induce la diferenciación de la gónada primitiva en testículo, denominándosele gen determinante del sexo del cromosoma Y (SRY). Para ello, se utilizaron diversas sondas generadas de una región cromosómica, compuesta por 35 kb de ADN, adyacente a la región pseudoautosómica. Los resultados demostraron una banda de 2.1 kb sexo-específica que se encontraba conservada en todas las especies animales estudiadas. La secuencia nucleotídica del fragmento de 2.1 kb reveló dos marcos de lectura, con dirección de transcripción de 5' a 3', de centrómero a telómero, la cual codificaba dos proteínas una de 99 y otra de 223 aminoácidos (aa) respectivamente. El marco de lectura de 99 aa no indicó la existencia de homología con ninguna proteína; sin embargo, sí se encontró homología del polipéptido mayor con la proteína Mc codificada por el gen mat-3M de *Schizosaccharomyces pombe*, al igual que con un motivo conservado con capacidad de unión al ADN, presente en proteínas no histónicas de las familias HMG1 y HMG2 (grupo de alta movilidad); a este motivo de unión al ADN conservado se le denominó caja o dominio HMG. Por medio del uso de la sonda pY53.3, se clonó y se describió el homólogo murino de SRY, denominándosele Sry. Este gen está constituido por 237 pares de bases (pb) y un marco de lectura para una proteína con un dominio HMG (20).

El gen SRY presenta una estructura muy sencilla, está formado por un sólo exón y no tiene intrones. El transcrito del SRY es de 1.1 kb y la región traducida está constituida por una proteína de 204 aa con un peso molecular de 23.9 kilodaltones que se localiza en el núcleo (Figura 1). La localización nuclear depende de la integridad de señales específicas de la caja HMG por lo cual esta caja es una parte fundamental de la proteína SRY (21-23).

La unidad transcripcional del gen SRY se encuentra precedida por dos pequeñas zonas ricas en G-C que cubren parte de la región 5' no traducida. Dentro de estas zonas se han identificado diversos sitios de unión a factores de transcripción (como el Sp1 y otros) además de secuencias que incrementan la transcripción. Por otro lado, no se han identificado secuencias consenso TATA o CCAAT "corriente arriba" del sitio de inicio de la transcripción; sin embargo, si se han observado secuencias parciales homólogas a las cajas TATA, CATA, GATA y TACA. Asimismo, se han identificado tanto en la región 5' como en la 3' no traducida la presencia de segmentos ricos en A-T (Figura 1) (21).

La estructura tridimensional del complejo de unión de la caja HMG al ADN sugiere que la interacción de esta proteína es exclusivamente con el surco menor de la hélice de ADN. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la caja HMG de la proteína SRY se une específicamente a la secuencia AACAAAG, e induce el doblamiento del ADN en un ángulo de 70° (24-28). Esta propiedad de alterar significativamente la estructura del ADN, sugiere que dicha proteína participa en la arquitectura de la diferenciación testicular, al promover la interacción proteína-proteína y/o en la unión de complejos de proteínas de alto orden con el ADN a través del desdoblamiento del mismo (29-31).

El dominio de unión de la proteína SRY al ADN reconoce de manera específica y con gran afinidad a los elementos promotores de los genes de la hormona inhibidora de las estructuras Müllarianas (HIM) y de la aromatasa P450, lo que sugiere que la proteína SRY controla el desarrollo masculino a través de la regulación de genes blanco (32,33).

Aún no se ha podido establecer el momento preciso en el que las estirpes celulares gonadales se diferencian para el desarrollo femenino o masculino. Se ha sugerido que la determinación testicular coincide con la expresión del SRY (34) y esta expresión se observa principalmente en la cresta genital durante el período que corresponde al inicio de la formación del testículo, es decir en la sexta semana de edad gestacional en el humano y entre los días 10.5 y 12.5 poscoito en el ratón (35-37). En la actualidad los estudios sobre los transcritos de SRY son escasos y han aportado poca información debido a las limitantes para realizarlos (38). Estudios llevados a cabo en embriones humanos y murinos previos a la implantación, muestran que la transcripción del SRY y del Sry se presenta en el estado de blastocisto (38,39). Tampoco se ha esclarecido el momento en que finaliza la determinación sexual, pero se ha demostrado que los transcritos del Sry ya no son detectados por la técnica de RT-PCR en el RNA gonadal a los 13.5 días poscoito (35), aunque se desconoce con precisión hasta cuando persiste la expresión de la proteína Sry (34). Todos los estudios de expresión de este gen en el ratón y en el humano han sido llevados a cabo a nivel de la transcripción y no de la traducción, debido a que la proteína sintetizada se encuentra en concentraciones bajas para poder ser detectada por anticuerpos específicos (40).

Existen diversas evidencias en la literatura que confirman que el gen SRY es el FDT; algunas de éstas son las siguientes: 1) está localizado en Yp, adyacente a la región pseudoautosómica y es capaz de inducir la diferenciación testicular en el ratón (7) y, como ha sido confirmado por nuestro grupo de trabajo, en el hombre (8); 2) algunas disgenesias gonadales puras XY (padecimiento en el cual los testículos se encuentran sustituidos por estrías gonadales) presentan mutaciones en el gen SRY (Tabla 1) (41-66), estas mutaciones condicionan que la proteína del SRY presente un defecto en la unión al ADN y/o una alteración en el doblamiento del mismo (27,55,67-70); 3) en el ratón, la expresión del gen Sry se correlaciona con el inicio de la determinación testicular (35); 4) la inserción de un fragmento de ADN de 14 kb, que incluye al gen Sry del cromosoma Y a ratones transgénicos XX, puede inducir la diferenciación testicular (36) y 5) éste es un gen evolutivamente conservado en el cromosoma Y de mamíferos metaterios y euterios (7,71).

A pesar de que la evidencia a favor del SRY como el factor determinante testicular es sólida, la observación de que algunas alteraciones de la diferenciación sexual no están ligadas al cromosoma Y, ha llevado a suponer que otros genes, autosómicos y/o ligados al cromosoma X, participan en la gonadogénesis (72). Los fragmentos autosómicos, previamente mencionados detectados por la sonda pY53.3, (7) han sido identificados como genes autosómicos ligados al cromosoma X relacionados con SRY. A la familia de genes que presentan la caja HMG con una homología mayor al 60% con la caja HMG del SRY, se les ha denominado genes SOX (genes relacionados con la caja HMG del SRY) (73,74). Estos genes se encuentran muy conservados y han sido descritos en diversos

vertebrados. La relación entre el gen SRY y los genes SOX ha suscitado un gran interés desde el punto de vista del origen y la evolución del gen SRY en los mamíferos (75).

Existen algunas alteraciones de la diferenciación sexual en las cuales se ha observado desarrollo testicular en ausencia del SRY, como son los varones XX y hermafroditas verdaderos 46,XX. Con base en lo anterior, se ha propuesto la existencia de numerosos genes que intervienen en el desarrollo gonadal constituyéndose como componentes de una cascada génica responsable de los programas de morfogénesis y diferenciación gonadal (34,72,76-85) (Figura 2).

En ausencia del gen determinante del testículo, el primordio gonadal posee una tendencia inherente a desarrollarse como ovario siempre y cuando existan células germinales, continuándose con la proliferación del epitelio celómico y el desarrollo de las células germinales que se transforman en ovogonias. En el caso de que no existan células germinales se formarán estrías fibrosas incapaces de producir hormonas sexuales femeninas durante la pubertad (86-88).

En la novena semana de edad gestacional el *rete ovarii* se origina de los túbulos mesonéfricos hiliares y se infiltra en la gónada como un sincicio de túbulos y cordones. Entre la décima primera y la décima segunda semana de edad gestacional (etapa de 80 mm), se lleva a cabo la transición de las ovogonias hacia ovocitos primarios (primera profase meiótica) y marca el comienzo de la diferenciación ovárica. Las ovogonias que se encuentran en la parte central del ovario se ponen en contacto con el *rete ovarii* y entran en meiosis. Entre la vigésima y vigésima quinta semana de edad gestacional se alcanza tanto el pico de formación de los folículos primarios como el de la concentración

plasmática de la hormona estimulante del folículo (FSH) hipofisiaria fetal; asimismo, en este período la gónada ya presenta las características morfológicas del ovario. Una vez que se ha alcanzado el número máximo de células germinales (de 6 a 7 millones), se inicia la disminución de las mismas hasta alcanzar aproximadamente 2 millones (88). En la séptima semana de edad gestacional la ovogonia entra en meiosis, deteniéndose en la etapa de dictioteno hasta la pubertad, momento en el cual la acción de la FSH en el folículo induce la progresión de la meiosis (88,89).

La formación de los fenotipos masculino o femenino está determinada por la acción de las hormonas sintetizadas por cada gónada específica. El mecanismo que induce este dimorfismo en los mamíferos fue descrito originalmente por Jost (90,91) quien demostró, que al diferenciarse la gónada primitiva a testículo su producción hormonal induce el desarrollo del fenotipo masculino; en cambio, si la diferenciación gonadal se da hacia ovario, el fenotipo, aparentemente de manera pasiva, será femenino. La ausencia temprana de gónadas fetales también induce un fenotipo femenino, lo cual apoya el concepto de inactividad endócrina del ovario fetal (88). Los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamientos labioescrotales) (92).

Las estructuras primordiales del tracto genital que dan origen a los genitales internos, incluyen dos sistemas de conductos que se encuentran presentes en todos los embriones: los conductos Wolffianos (mesonéfricos) y los conductos Müllerianos (paramesonéfricos) (92).

El desarrollo del fenotipo masculino está determinado por el efecto de tres hormonas fetales sobre los primordios genitales. La primera de ellas, secretada por las células de Sertoli del testículo, es la HIM que se encarga de inducir la involución de los conductos Mülllerianos, proceso que se observa entre la sexta y la octava semana de la gestación y concluye en la décima primera con la desaparición de estas estructuras (88). Inmediatamente después de iniciada la síntesis de la HIM las células intersticiales del testículo fetal se citodiferencian en células de Leydig. Estas servirán como sustrato anatómico para la síntesis y secreción de testosterona (T), que es la segunda hormona fetal. El efecto virilizante de la T se ejerce sobre los conductos Wolffianos que se diferencian a epidídimo, vas deferens, vesículas seminales y conducto eyaculador. La biosíntesis *de novo* de testosterona en el testículo fetal se lleva a cabo a partir del colesterol teniendo como sustrato al acetato o a las lipoproteínas de baja densidad del plasma por un mecanismo de endocitosis mediado por el receptor (93,94). La síntesis de T a partir de colesterol requiere de la presencia de diversos sistemas enzimáticos diferentes, que poseen regulación génica autosómica independiente. La actividad endócrina de la célula de Leydig en etapas tan tempranas de la gestación, representa una excepción en la economía fetal ya que el feto posee medidas de protección, las cuales no permiten la síntesis de hormonas esteroideas activas que podrían poner en peligro su homeostasis (95).

La T es el precursor de la tercera hormona fetal virilizante, la dihidrotestosterona (DHT). Esta, se forma en la célula blanco por la acción de la 5α -reductasa extragonadal y

es la mediadora intracelular de la gran mayoría de las acciones de los andrógenos. Dicha hormona, es la única responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata durante la embriogénesis (96-98) (Figura 2).

La T se une a dos proteínas: a la globulina transportadora de testosterona (SHBG) y a la albúmina (99). El paso de la T libre hacia las células no es dependiente de energía y probablemente está dado por un fenómeno de difusión pasiva (100). Tanto la T como la DHT se unen, con la misma afinidad, a las proteínas receptoras. El complejo andrógeno-receptor sufre una reacción de transformación que promueve su unión al ADN. El complejo testosterona-receptor es el responsable de la virilización de los conductos Wolffianos en la gestación (96-98).

Durante la embriogénesis, el ovario no secreta HIM ni T. La ausencia de estas dos hormonas ocasiona la persistencia de los conductos Müllerianos y la regresión de los conductos Wolffianos (88).

ALTERACIONES DE LA DIFERENCIACION SEXUAL

Las alteraciones en cualquier estadio de la diferenciación sexual, durante la embriogénesis, conducen a la presencia de malformaciones en el desarrollo sexual. Estas pueden ser clasificadas de acuerdo con la etapa de desarrollo en la que se presenten; ésto es, en errores cromosómicos, errores del sexo gonadal o errores en el sexo fenotípico. (88,101-103). Las disgenesias gonadales (DG), el hermafroditismo verdadero y el síndrome de varón XX se encuentran clasificadas dentro de las alteraciones en la

traducción del sexo cromosómico al sexo gonadal. En estas alteraciones no se ha podido dilucidar con precisión, en un gran porcentaje de ellas, las causas que las determinan (104-107).

Las disgenesias gonadales abarcan a un grupo heterogéneo de enfermedades con *diversas anomalías cromosómicas, gonadales y fenotípicas*. Para su estudio, han sido divididas en varios grupos: *síndrome de Turner (ST)*, *disgenesias gonadales mixtas (DGM)* y *las disgenesias gonadales 46,XX y 46,XY (88)*.

La DG 46,XY puede ser completa (*pura*) o parcial. Los sujetos con DG completa se caracterizan por presentar un fenotipo femenino y *estrías gonadales bilaterales*; mientras que en la forma parcial, el fenotipo depende tanto del momento específico de la gestación en la cual se produce el daño gonadal, como del grado de afección existente en cada uno de los compartimientos testiculares (108-112). Una explicación plausible para la génesis de la DG sería la presencia de mutaciones en el gen SRY que interfieren con el desarrollo testicular (68,112). Sin embargo, sólo del 10% al 15% de los sujetos con DG 46,XY presentan mutaciones en este gen, las cuales pueden ser en sentido erróneo, sin sentido, cambios en el marco de lectura y deleciones (68). La gran mayoría de esas mutaciones se localizan en la región del gen que codifica para la caja HMG, el cual corresponde al dominio de unión de la proteína SRY al ADN (45,47-52,55-57,60-63,66); sin embargo, en un reducido número de casos de pacientes tanto con DG completa como parcial (46,53,58,59,64,65), así como también en una mujer 46,XY con función ovárica parcial (113) y en una mujer con mosaicismo 45,X/47,XYY (114), se han descrito mutaciones fuera de la caja HMG. De igual forma, se han reportado mutaciones

heredadas en el gen SRY por *mosaicismo paterno* (56) y otras en las que el padre es portador con fenotipo normal y fertilidad conservada, pero transmite la mutación a su descendencia XY (45,115). Con base en los datos existentes se ha sugerido que la actividad de la proteína requiere un umbral para su función normal, así como que otros *determinantes genéticos* que interaccionan con SRY permiten o no la expresión de la mutación (68,116,117).

SINDROME DE TURNER

El fenotipo atribuible a la *monosomía del cromosoma X* o a sus variantes fue descrita por primera vez en 1930 por Ullrich (118). Posteriormente, Turner (119) describió 7 *pacientes con fenotipo femenino, infantilismo sexual, talla baja, cuello alado y cubitus valgus*. La primera evidencia del fundamento cromosómico del síndrome de Turner fue el hallazgo de Polani y cols. (120) de que estas pacientes no presentaban cromatina X. Posteriormente, Ford y cols. (121) informaron que la constitución cromosómica en una paciente de 14 años con ST era 45,X.

Diversos estudios realizados en linfocitos de sangre periférica han demostrado que del 40 al 60% de las pacientes con ST son *monosómicas para el cromosoma X*, mientras que el resto de las pacientes tienen un cromosoma X o Y *estructuralmente anormal*, o son *mosaicos con una segunda línea celular que contiene un cromosoma sexual normal o anormal* (122). Con el mejoramiento de las *técnicas citogenéticas* y la aplicación de la *biología molecular*, se observó la presencia de una alta frecuencia de *mosaicismo*

(66.7%) debido a la existencia de marcadores cromosómicos (18.4%) (123). Los estudios recientes llevados a cabo en pacientes con ST con diferentes cariotipos (45,X, mosaicos y pacientes con marcadores cromosómicos) demostraron que del 4 al 61% *presentan cromosoma Y o material derivado del cromosoma Y en su genoma* (124-129). Con base en lo anterior, podemos *definir al síndrome de Turner* como aquella entidad patológica en la cual se observa la presencia de una línea celular 45,X (exclusivamente o en conjunto con otras líneas celulares) y dos estrías gonadales; aunque en ocasiones se ha observado la presencia de tejido ovárico funcional.

Se ha estimado que 99% de los embarazos 45,X se abortan espontáneamente, por lo que se calcula que del 5 al 10% de los abortos espontáneos y del 1 al 2% de los embarazos corresponden a monosomías del X (129,130). Un estudio de abortos espontáneos, reveló mediante análisis citogenético, una incidencia de mosaicos de 1%; dicha incidencia aumentó al 6.3% al llevar a cabo estudios de hibridación del ADN (131). El estudio citogenético y molecular en linfocitos y fibroblatos de 87 pacientes con ST demostró que 66.7% eran mosaicos, 20.7% eran 45,X y 12.6% tenían aberraciones estructurales (123). Estos datos han llevado a sugerir que el mosaicismo ejerce un efecto fetoprotector y que los casos 45,X que sobreviven a la vida embrionaria y fetal corresponden a mosaicos crípticos con pérdida gradual de la segunda línea cromosómica (125,130).

Actualmente, se han descrito muchas otras anomalías somáticas además de las observadas por Turner. Entre ellas están: *baja viabilidad in útero, linfedema congénito en manos y pies, implantación baja del cabello, implantación baja de pabellones*

auriculares, paladar alto y arqueado, múltiples nevos pigmentados, clinodactilia del quinto dedo, cuarto metacarpiano corto, coartación de la aorta y anomalías renales (132,133).

Con respecto al proceso de degeneración gonadal, las pacientes con ST presentan *in útero* proliferación mitótica de las oogonias; sin embargo, los oocitos sufren una degeneración acelerada durante la primera meiosis, lo que lleva a la pérdida de todos los oocitos en la infancia tardía. Al parecer esta pérdida es un proceso progresivo, ya que se han observado en embriones femeninos con ST células germinales primordiales, no es sino hasta después del tercer mes que se observa un incremento en el tejido conectivo del estroma. Este proceso de degeneración gonadal es variable, dado que en algunas pacientes con cariotipo 45,X se han llegado a observar folículos primordiales con la consecuente presencia de ovulación y menstruación a partir de la pubertad. Ahora bien, en los casos en los que se observa este proceso, pudieran tratarse en realidad de mosaicos ocultos de esta entidad (133).

La detección del cromosoma Y o material derivado del cromosoma Y en pacientes con ST, se ha correlacionado con un riesgo del 10 al 20% de desarrollar gonadoblastoma o disgerminoma en las estrías gonadales (134).

DISGENESIA GONADAL MIXTA

La DGM es un estado intersexual que Sohval en 1963 (135), Davidoff y Federman en 1973 (136) y Zah y cols. en 1975 (137) clasificaron con base en las características

gonadales: testículo de un lado y la existencia de una estría contralateral. Asimismo, la presencia de un testículo con un tumor contralateral (generalmente gonadoblastoma), un testículo con ausencia gonadal contralateral o incluso un ovario con una estría contralateral han sido clasificadas como variantes de esta entidad patológica (138). En la mayoría de los sujetos afectados, se encuentra un mosaico en el complemento cromosómico (generalmente 45,X/46,XY), aunque en diversos casos se ha identificado solamente una línea celular a pesar de haber investigado el mosaico en 5 o más tejidos (139). La presencia de un complemento cromosómico determinado, no condiciona siempre la presencia de un mismo tipo de gónada. Originalmente, se propuso que la DGM tenía su origen en el mosaico cromosómico existente; ésto es, al haber dos líneas celulares diferentes se originarían dos gónadas diferentes (generalmente una estría por la presencia de una línea celular 45,X y un testículo por la presencia de una línea celular 46,XY) (138). Sin embargo, se ha observado que en la mayoría de los casos ambas líneas celulares se encuentran presentes en ambas gónadas; es por ello que se sugirió que la proporción de cada línea celular determinaría la gónada presente (140). Esto último tampoco constituye una regla, ya que en algunos pacientes estudiados por nuestro grupo de trabajo (139), podemos apreciar, que individuos que habían formado estría y testículo tenían solamente una línea 46,XY en ambas gónadas; individuos que formaron un testículo normal, tenían en dicha gónada, un complemento cromosómico 45,X/46,XY y sujetos que desarrollaron un testículo a pesar de que solamente existía una línea celular 45,X en esa gónada. Estos hallazgos también han sido reportados por otros grupos de investigadores (141-143).

En los casos de DGM, la ambigüedad de los genitales externos es extremadamente variable y los fenotipos ampliamente heterogéneos. Además de la ambigüedad genital, estos pacientes presentan estigmas turnerianos y ocasionalmente anomalías cardiovasculares y renales asociadas. En todos los casos existe presencia de derivados Mülllerianos y el sexo de asignación variará de acuerdo a las condiciones particulares de los genitales externos de cada caso (139). Al igual que en los pacientes con ST con cromosoma Y o material derivado del cromosoma Y los sujetos con DGM presentan una alta frecuencia de gonadoblastomas y disgerminomas (134,144-146).

TABLA 1
MUTACIONES EN EL GEN SRY EN PACIENTES
CON DISGENESIA GONADAL 46,XY

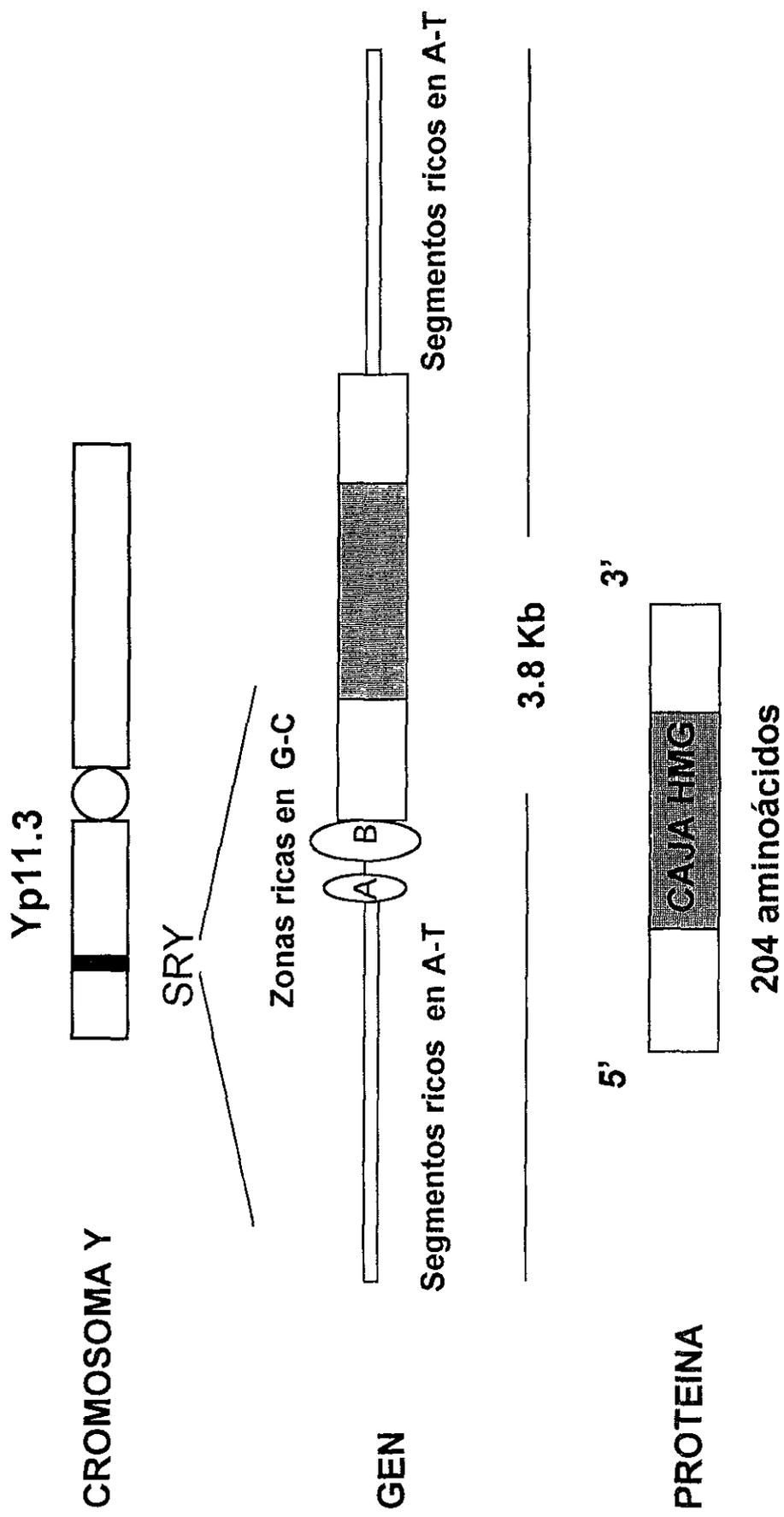
CODON	NUCLEÓTIDO	BASE	AMINOACIDO	REFERENCIA
2	4	C → T	Gln → CTP	113
4	12	T → A	Tyr → CTP	62
4	12	DELECIÓN T	Tyr → CTP	114
18	53	G → A	Ser → Ans	64
60	178	G → C	Val → Leu	41
62	184	C → G	Arg → Gly	49
64	192	G → A	Met → Ile	41
68	203	T → C	Ile → Thr	46
70	209	G → A	Trp → CTP	43
74	220	C → T	Glu → CTP	49
75	224-225	GG → AT	Arg → Asn	60
78	233	T → C	Met → Thr	49
86	256	C → T	Arg → CTP	63
90	270	C → G	Ile → Met	44
91	271	A → G	Ser → Gly	56
92	274	A → T	Lys → CTP	48
93	277	C → T	Gln → CTP	47
95	283	G → C	Gly → Arg	43
97	289	C → T	Gln → CTP	57
106	317	A → T	Lys → Ile	44
107	320	G → A	Trp → CTP	51
108	324	CCA → CC	CML	44
109	326	T → C	Phe → Ser	45
113	337	G → A	Ala → Thr	50
121-122	363-366	DELECIÓN AGAG	CML	42
125	374	C → T	Pro → Leu	56
127	380	A → G	Try → Cys	52
127	381	T → A	Tyr → CTP	46
133	397	C → T	Arg → Trp	49,62
163	488	T → A	Leu → CTP	53

CTP = Codón de terminación prematura.

CML = Cambio en el marco de lectura.

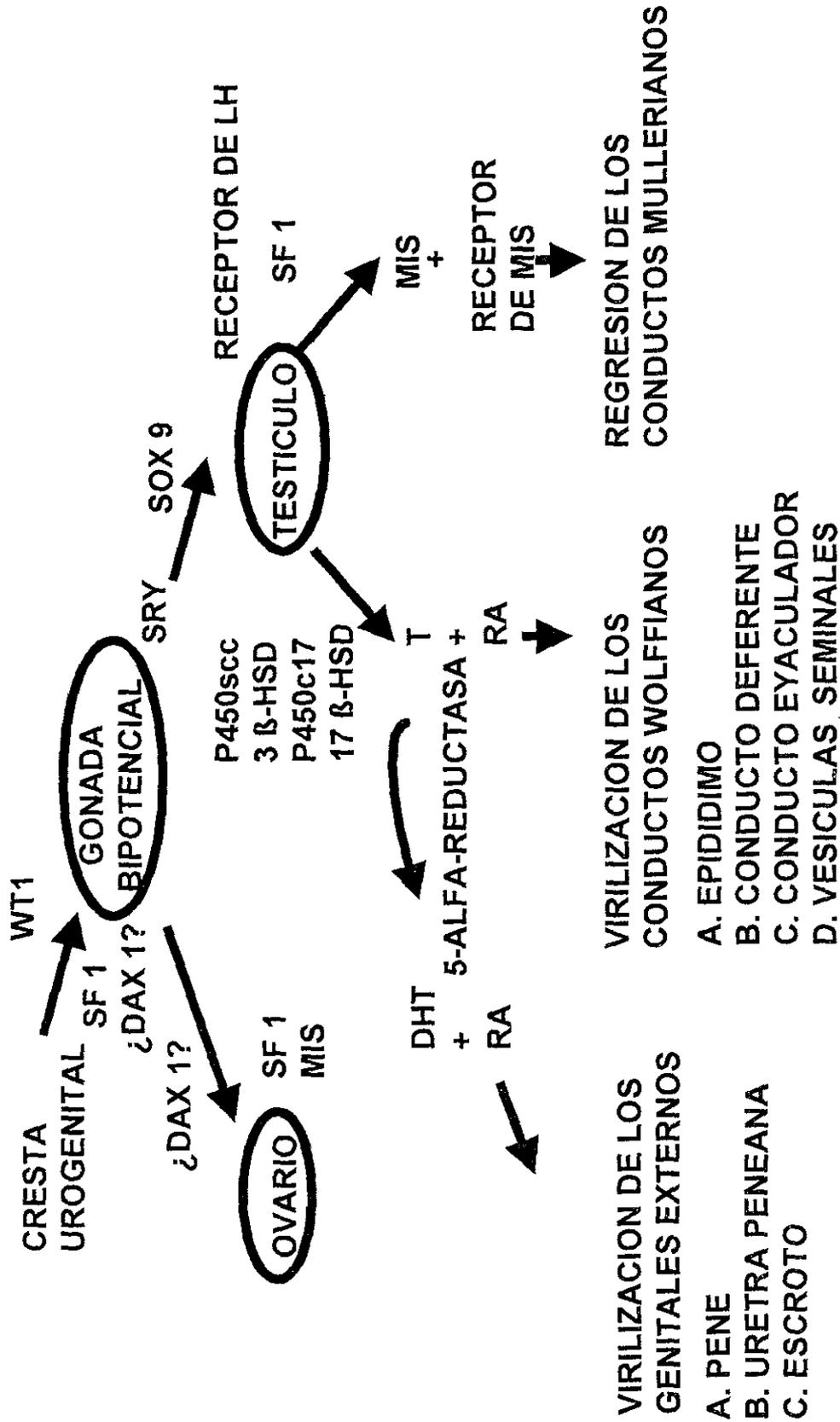
Los codones son numerados con respecto al primer ATG del marco de lectura del gen SRY.

FIGURA 1



Su H y cols. Am J Hum Genet. 1993;52:24-38.

FIGURA 2



OBJETIVOS

Estudiar la secuencia del gen SRY en sangre periférica y en gónadas de pacientes con diagnóstico comprobado de mosaico de síndrome de Turner (MST) con cromosoma Y normal o anormal o con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta.

Comparar la secuencia del gen SRY en sangre periférica, con la secuencia de dicho gen de ambas gónadas en los pacientes anteriormente citados.

HIPOTESIS

En los pacientes con diagnóstico de mosaico de síndrome de Turner con cromosoma Y normal o anormal o con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta, existen alteraciones en la secuencia del gen SRY que están involucradas en la génesis de dichas patologías.

SUJETOS

Los pacientes que se incluyeron en este estudio [2 con diagnóstico de MST con cromosoma Y normal (MST2 y MST3) y una con cromosoma Y anormal (MST1) y 10 con DGM] fueron de origen étnico mestizo mexicano y pertenecían a familias diferentes. Las características clínicas individuales de cada uno de los pacientes se pueden observar en las tablas 2 y 3. En los tres sujetos con MST al igual que en cinco de los sujetos con DGM, el sexo de asignación fue femenino, mientras que en los otros cinco sujetos con DGM el sexo de asignación fue masculino. Al examen físico, todos los individuos estudiados presentaron talla por debajo de la percentila 3 para varones y mujeres normales de la edad, además de diversos estigmas de Turner.

El estudio histológico llevado a cabo en las tres pacientes con MST demostró la presencia de estrías bilaterales. Con respecto a los 10 pacientes con DGM, en 7 de ellos se documentó la presencia de estría unilateral con testículo contralateral, en 2 se observó una estría unilateral con gonadoblastoma contralateral y un paciente presentó estría unilateral con gonadoblastoma en testículo contralateral.

En la tabla 4 se pueden observar los cariotipos de sangre periférica y en gónadas de las tres pacientes con MST. El cariotipo en sangre periférica de la paciente 1 fue 46,X+ mar (2 de 500 células estudiadas), mientras que en las otras dos pacientes el complemento cromosómico fue 45,X/46,XY. El análisis cromosómico en gónadas sólo se pudo llevar a cabo en las pacientes MST1 y MST3. En la paciente MST1 el cariotipo fue 45,X (en el 100% de las metafases estudiadas) mientras que en la paciente 3 se observó

el mismo cariotipo que el encontrado en sangre periférica. En lo que respecta al análisis citogenético llevado a cabo en sangre periférica en los pacientes con DGM se puede observar que 8 de los 10 pacientes presentaron dos líneas celulares (45,X/46,XY), mientras que en los pacientes 6 y 8 se documentó una sola línea celular (46,XY y 45,X respectivamente). Solamente en 7 de los individuos con DGM se pudo llevar a cabo el cariotipo en gónadas; en cinco de ellos, se observó que el cariotipo en gónadas fue igual al encontrado en sangre periférica (sujetos 1,4,6,7,10); sin embargo, en dos pacientes (3 y 9) en los que se había documentado la presencia de dos líneas celulares en sangre periférica, en las gónadas sólo se pudo identificar una línea celular 45,X en el 100% de las metafases estudiadas (Tabla 5).

METODOS

Extracción de ADN de sangre periférica

Se extrajo una muestra de 10 ml de sangre periférica con el fin de obtener el ADN genómico siguiéndose la metodología descrita por John y cols. (147). La sangre se depositó en tubos de 50 ml que contenían 200 µl de etilen diamino tetra acetato disódico (EDTA) 0.5M, pH 8, como anticoagulante. Las muestras fueron colocadas en hielo agregándose 25 ml de sacarosa-tritón 2X (Sacarosa 0.64M, Trizma-base 0.02M, MgCl₂ 0.01M y Tritón 100X al 2%) y 15 ml de agua desionizada (ddH₂O). Los leucocitos se separaron por centrifugación (240 g/15 min) y se decantó el sobrenadante hasta que se obtuvo un botón nuclear. Para lisar los leucocitos se añadieron 3 ml de amortiguador de

el mismo cariotipo que el encontrado en sangre periférica. En lo que respecta al análisis citogenético llevado a cabo en sangre periférica en los pacientes con DGM se puede observar que 8 de los 10 pacientes presentaron dos líneas celulares (45,X/46,XY), mientras que en los pacientes 6 y 8 se documentó una sola línea celular (46,XY y 45,X respectivamente). Solamente en 7 de los individuos con DGM se pudo llevar a cabo el cariotipo en gónadas; en cinco de ellos, se observó que el cariotipo en gónadas fue igual al encontrado en sangre periférica (sujetos 1,4,6,7,10); sin embargo, en dos pacientes (3 y 9) en los que se había documentado la presencia de dos líneas celulares en sangre periférica, en las gónadas sólo se pudo identificar una línea celular 45,X en el 100% de las metafases estudiadas (Tabla 5).

MÉTODOS

Extracción de ADN de sangre periférica

Se extrajo una muestra de 10 ml de sangre periférica con el fin de obtener el ADN genómico siguiéndose la metodología descrita por John y cols. (147). La sangre se depositó en tubos de 50 ml que contenían 200 µl de etilen diamino tetra acetato disódico (EDTA) 0.5M, pH 8, como anticoagulante. Las muestras fueron colocadas en hielo agregándose 25 ml de sacarosa-tritón 2X (Sacarosa 0.64M, Trizma-base 0.02M, MgCl₂ 0.01M y Tritón 100X al 2%) y 15 ml de agua desionizada (ddH₂O). Los leucocitos se separaron por centrifugación (240 g/15 min) y se decantó el sobrenadante hasta que se obtuvo un botón nuclear. Para lisar los leucocitos se añadieron 3 ml de amortiguador de

lisis nuclear, pH 8.2, (Trizma-base 10 mM, NaCl 400 mM y Na₂EDTA 2mM), 108 µl de sulfato dodecílico sódico (SDS) al 20% y 100 µl de Proteinasa K [20 mg/ml]. Se dejó incubar por 14 hrs a 37°C, adicionándose después de dicho lapso 1 ml de NaCl saturado y centrifugándose a 240 g/15 min. El sobrenadante fue transferido a tubos de 15 ml y el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y se agitó por inversión. Posteriormente, el ADN se lavó en etanol frío al 70%, se secó a temperatura ambiente, fue resuspendido en 200 µl de ddH₂O y almacenado a -20° C para su análisis posterior (Figura 3).

En todos los sujetos estudiados, se determinó la concentración de ADN por espectrofotometría, y se leyó a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Por medio de la lectura en la longitud de onda a 260 nm se determinó la concentración de ADN, mientras que la relación 260/280 nos indicó la pureza del mismo. La concentración total de ADN se obtuvo al multiplicar la cantidad obtenida a la longitud de onda de 260 por una constante preestablecida, de acuerdo con la dilución que se utilizó:

$$\text{concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{D.O. de } 260\text{nm}) (\text{dilución}) (50\mu\text{g de ADN})$$

$$\text{en donde } 50 \mu\text{g de ADN} = 1 \text{ D.O.}(260 \text{ nm})$$

Para conocer la calidad de la muestra se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Extracción de ADN genómico a partir de gónadas frescas

En aquellos pacientes en los cuales las gónadas fueron extirpadas durante el lapso de desarrollo de este trabajo, se llevó a cabo la extracción de ADN de dichas gónadas siguiéndose la metodología previamente descrita (148). El tejido se congeló con nitrógeno líquido y se trituró inmediatamente. Una vez realizado esto, se agregaron 500 μ l de un amortiguador de digestión (NaCl 1M, Tris-Cl 0.01M, pH8, EDTA 0.02M, pH8 y SDS al 0.5%) y 5 μ l de Proteinasa K [20 mg/ml] (para romper la membrana de los tejidos y para lograr una adecuada degradación de las proteínas), incubándose por 24 hrs a 50° C. Posteriormente, se extrajo el ADN con 250 μ l de fenol y 250 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 6,500 g/15 min a 0° C, se transfirió el sobrenadante a tubos de 1.5 ml y se añadieron 500 μ l de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1). Dicho sobrenadante se centrifugó nuevamente a 6,500 g/15 min a 0°C y fue transferido a tubos de 1.5 ml. El ADN se obtuvo precipitándolo con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se almacenó a -20°C por 24 hrs. Posteriormente, se centrifugó a 6,500 g/30 min a 0°C decantándose el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente para finalmente resuspenderse en 10 μ l de ddH₂O. El ADN obtenido se almacenó a -20° C para su análisis posterior (Figura 4).

La concentración de ADN fue determinada por espectrofotometría; para conocer la calidad de la muestra se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Extracción de ADN a partir de bloques de gónadas previamente incluidas en parafina

En aquellos casos en los cuales las gónadas habían sido previamente extirpadas, se extrajo el ADN a partir del tejido fijado en parafina siguiéndose la técnica de Cooper y cols. con algunas modificaciones (149). Para ello, fue necesario cortar los tejidos en piezas de 10 μm , depositándose 3 cortes en tubos de 1.5 ml y habiéndose desparafinado los mismos con 1.0 ml de xileno ultrapuro. Dichos tubos fueron centrifugados a 9,000 g/15 min a temperatura ambiente. El xileno fue decantado y se repitió el paso anterior. Para eliminar el xileno, se lavaron las piezas de los tejidos con 1.0 ml de etanol absoluto frío centrifugándose dichas piezas a 9,000 g/15 min a temperatura ambiente, decantándose el etanol y se repitió el paso anterior. Para la ruptura de la membrana de los tejidos y la deproteinización, se agregaron 200 μl de amortiguador de digestión (NaCl 1M, Tris-Cl 0.01M, pH8, EDTA 0.02M, pH8 y SDS al 0.5%), 20 μl de SDS al 10% y 7.5 μl de Proteínasa K [20 mg/ml]. El tejido se incubó durante 24 hrs a 48° C. Posteriormente, se incubó a 97° C (10 min) para inactivar la Proteínasa K y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se extrajo el ADN con 140 μl de fenol y 140 μl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1); centrifugándose a 6,500 g/15 min a 0° C, transfiriéndose el sobrenadante a tubos de 1.5 ml y añadiéndose 280 μl de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1), fue centrifugado nuevamente a 6,500 g/15 min a 0°C y el sobrenadante fue transferido a tubos de 1.5 ml. Para alcanzar una fuerza iónica suficiente se agregaron 25 μl de acetato de sodio 3M. El ADN se obtuvo precipitándolo con 460 μl de isopropanol, almacenándose a 4°C por 18 hrs. Posteriormente, se

centrifugó a 9,000 g/35 min a temperatura ambiente para sedimentar el ADN, se decantó el isopropanol, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μ l de ddH₂O. El ADN obtenido se almacenó a -20° C para su análisis posterior (Figura 5).

La concentración de ADN fue determinada por espectrofotometría; para conocer la calidad de la muestra se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Síntesis de Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos derivados de la secuencia del exón del gen del SRY (42,49) fueron adquiridos de una casa comercial (Accesolab) y cada uno de ellos fue llevado a una concentración de 100 μ M. Asimismo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con el fin de determinar que no existiesen oligonucleótidos adicionales.

Secuencia de los oligonucleótidos en dirección 5' → 3' utilizados en el estudio del gen SRY:

XES10: 5' GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG C 3'
XES 11: 5' GTA GCC AAT GTT ACC CGA TTG TC 3'

AP1: 5' GAA TAT TCC CGC TCT CCG G 3'
AP2: 5' ACA ACC TGT TGT CCA GTT GC 3'

SRY6: 5' GTGGTCTCGCGATCAGA 3'

SRY3: 5' CTTCCGACGAGGTCGATAC 3'

XES7: 5' CCCGAATTGACAATGCAATCATATGCTTCTGC 3'

SRY8: 5' TAGAGCCATCTTGCGCCT 3'

El oligonucleótido SRY 8 (dirección 3', iniciando en el nt 2,315) fue empleado exclusivamente para las reacciones de secuenciación.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En todos los casos se preparó una reacción estándar de 50 μ l, siguiéndose la técnica descrita por Sambrook y cols. (150) que contenía: 0.3 μ g de ADN genómico, oligonucleótidos a una concentración final de 0.5 μ M, desoxirribonucleótidos trifosfatados a una concentración final de 80 μ M. Para cada una de las reacciones de PCR (excepto para el fragmento de 422 pb correspondiente a AP1/AP2) se utilizó dimetil sulfóxido al 3%, amortiguador 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM y Mg_2Cl) a una concentración final de 1X, Taq. polimerasa 2 U (Perkin Elmer, New Jersey, USA) y ddH₂O para un volumen final de 50 μ l (Figura 6). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, New Jersey, USA). Las condiciones adecuadas para la amplificación del exón para todos los oligonucleótidos (excepto AP1/AP2) fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 94°C/5 min, 30 ciclos de 94°C/1 min, 68°C/1 min y 72°C/2 min y un ciclo de extensión a 72°C/10 min. Para los oligonucleótidos AP1/AP2 se utilizó un ciclo de desnaturalización a 94°C/3 min, 30 ciclos de 94°C/1 min, 58°C/1.5 min y 72°C/1.5 min y un ciclo de extensión a 72°C/10 min.

Los oligonucleótidos sintetizados para la amplificación del exón del gen SRY (tanto de sangre periférica como de gónadas frescas) fueron los siguientes: XES10/XES11, los cuales amplifican un fragmento de 774 pb (el cual abarca el exón completo y parte de la región 5' y 3' no traducidas). El segundo par de oligonucleótidos AP1/AP2 amplifican un fragmento de 422 pb. Para llevar a cabo la amplificación del ADN extraído de testículo

incluido en parafina, fue necesario dividir al exón en dos fragmentos, esta estrategia se empleo con el fin de obtener productos de menor tamaño, ya que estudios previos (151,152) han demostrado que el tiempo de fijación y el tipo de fijador utilizado para los tejidos daña el ADN causando degradación del mismo, lo que hace difícil amplificar fragmentos mayores de 238 pb. Los pares de oligonucleótidos que se utilizaron fueron XES7/SRY3 y SRY6/XES11. Los oligonucleótidos XES7 (dirección 5', iniciando en el nt 2,072) y SRY3 (dirección 3', iniciando en el nt 2,477) amplifican un fragmento de 420 pb, mientras que los oligonucleótidos SRY6 (dirección 5', iniciando en el nt 2,282) en conjunto con el oligonucleótido XES11(dirección 3', iniciando en el nt 2,713) amplifican un fragmento de 432 pb.

El análisis de los productos de PCR obtenidos de sangre periférica, de gónadas frescas y de gónadas incluidas en parafina se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1.2%, tñiéndose con bromuro de etidio al 0.0002%. Una escalera de 100 pb fue utilizado como marcador de peso molecular; asimismo, se incluyeron un control positivo (individuo masculino sano) y un control negativo (la reacción de PCR sin ADN).

Secuenciación

Las reacciones de secuencia se llevaron a cabo mediante el uso de un estuche (Dye Terminator Cycle Sequencing, para la secuenciación automática) y de un estuche (AmpliCycle Sequencing Kit, para la secuenciación manual) (Perkin Elmer, New Jersey, USA), siguiéndose con ambos el método descrito por Sanger y cols. (153) con algunas modificaciones (Figuras 7 y 8). Se utilizaron dos métodos de secuencia diferentes con la

finalidad de descartar la presencia de heterocigotos. Previo a la secuenciación, las muestras de ADN amplificadas se purificaron con un estuche de GeneClean II (Bio 101 Inc., Vista, CA, USA). En breve, se cortó la banda de ADN incluida en un gel de agarosa; ésta se disolvió a 55°C con una solución de TBE/ioduro de sodio y se adicionó Glassmilk (en este paso se emplea la propiedad de unión de ADN al vidrio con el fin de separar éste de la agarosa). El ADN se lavó con una solución salina/etanol para eliminar las impurezas y finalmente se resuspendió en ddH₂O.

Secuenciación automática

En tubos de microcentrífuga de 0.5 ml se llevó a cabo la mezcla de reacción con: amortiguador de secuencia 5X, mezcla de dNTP's, oligonucleótido a una concentración final de 0.5 µM (5' o 3'), terminador colorido A, terminador colorido C, terminador colorido G, terminador colorido T y AmpliTaq DNA Polimerasa, FS. A esta reacción de mezcla se le añadió ADN genómico además de ddH₂O, para tener un volumen final de 20 µl. Se llevó a cabo la PCR de cada una de las reacciones de secuenciación, con las temperaturas de desnaturalización, reasociación y extensión previamente estandarizadas. Al finalizar la PCR, se procedió a la purificación de los productos mediante la precipitación con etanol y acetato de sodio. Las muestras fueron resuspendidas en amortiguador de carga (formamida desionizada y EDTA 25 mM, pH 8.0, que contenía 50 mg/ml de azul dextrán en una proporción de 5:1 de formamida a EDTA/azul dextrán). Las muestras se desnaturalizaron a 94°C y se colocaron en hielo. El ADN fue secuenciado en

un gel de poliacrilamida al 4.75% (50 ml) que contenía acrilamida al 40%, 25 g de urea, bisacrilamida:acrilamida (18:2), 5 ml de TBE 10X, 16.87 ml ddH₂O, 250 µl de persulfato de amonio (NH₄SO₄) al 10% y 28 µl de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina. Las muestras (4 µl/carril) fueron analizadas en un secuenciador automático (Applied Biosystem 373 DNA Sequencer) (Perkin Elmer, New Jersey, USA).

Secuenciación manual

Al igual que en la secuenciación automática, los productos de PCR se purificaron con el estuche GeneClean II (Bio 101 Inc., Vista, CA, USA). Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de marcaje del oligonucleótido con 50 µCi de γ ³²P ATP (New England Nuclear, Boston, MA, USA), 0.8 µl del iniciador (5' o 3') a una concentración 20 µM, 2 µl del amortiguador cinasa 5X (Tris-HCl 700 mM, pH 7.6, MgCl₂ 100 mM y ditiotritol 50 mM) y 3 µl de T4 polinucleótido cinasa (10 U/µl) (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). La reacción se incubó a 37°C/10 min y a 90°C/5 min. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de marcaje con 1 µl de la preparación anterior, 4 µl del amortiguador 10X (100 U de Amplitaq polimerasa, Tris-HCl 500 mM, pH 8.9, KCl 100 mM, MgCl₂ 25 mM y Tween al 0.25%), 500 ng de ADN genómico y ddH₂O para un volumen final de 30 µl. En tubos de 0.5 ml se agregaron 2 µl de cada una de las mezclas de terminación: guanina (c⁷dGTP 22.5 µM, dATP, dCTP y dTTP 10 µM y ddGTP 80 µM); adenina (c⁷dGTP 22.5 µM, dATP, dCTP y dTTP 10 µM y ddATP 600 µM); timina (c⁷dGTP 22.5 µM, dATP, dCTP y dTTP 10 µM y ddTTP 900 µM) y citocina

(c^7 dGTP 22.5 μ M, dATP, dCTP y dTTP 10 μ M y ddCTP 300 μ M). Se añadieron 6 μ l de la reacción de marcaje a cada uno de los tubos de 0.5 ml que contenían la mezcla de terminación para dar un volumen final de 8 μ l. La reacción de PCR fue practicada con las temperaturas de desnaturalización, reasociación y extensión previamente estandarizadas. Al finalizar dicha reacción se añadieron, a cada una de las reacciones de secuenciación, 4 μ l de la solución de terminación (0.8 ml de formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol al 0.05% y xilen cianol al 0.02%). Las muestras se desnaturalizaron a 94°C/5 min y se colocaron en hielo. El ADN marcado fue analizado en un gel de poliacrilamida al 6% (100 ml) que contenía 18 ml de acrilamida:bisacrilamida al 40%, 42 g de urea, 10 ml de TBE 10X (Trizma base, ácido bórico, EDTA), 670 μ l de persulfato de amonio al 10%, 28 μ l de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina y ddH₂O. El gel se precalentó a 1900 v, 70 w y 49 mA hasta alcanzar una temperatura de 50°C, habiéndose colocado las muestras (4 μ l/carril) y llevándose a cabo la electroforesis con los parámetros anteriores durante 3-5 horas. Para finalizar, se secó el gel durante una hora a 80°C y se expuso por diferentes períodos de tiempo en placas Kodak X-OMAT en cassettes con pantallas intensificadoras.

TABLA 2
CARACTERISTICAS CLINICAS

PACIENTE	EDAD AL INGRESO (años)	SEXO DE ASIGNACION	GENITALES EXTERNOS	GENITALES INTERNOS	GONADA DERECHA	GONADA IZQUIERDA
MST1	14	F	FEMENINOS	UTERO Y TROMPAS BILATERALES	ESTRIA	ESTRIA
MST2	17	F	FEMENINOS	UTERO Y TROMPAS BILATERALES	ESTRIA	ESTRIA
MST3	15	F	FEMENINOS	UTERO Y TROMPAS BILATERALES	ESTRIA	ESTRIA

MST = MOSAICO DE SINDROME DE TURNER

TABLA 3
CARACTERISTICAS CLINICAS

PACIENTE	EDAD AL INGRESO (años)	SEXO DE ASIGNACION	GENITALES EXTERNOS	GENITALES INTERNOS	GONADA DERECHA	GONADA IZQUIERDA
DGM1	2/12	M	FALO = 2.5cm HIOSPADIA PENEOESCROTAL	UTERO, TROMPAS BILATERALES Y EPIDIDIMO IZQUIERDO	ESTRIA	TESTICULO
DGM2	20	F	FALO = 6 cm HIOSPADIA PERINEOESCROTAL	UTERO, TROMPA Y EPIDIDIMO IZQUIERDOS	TESTICULO	ESTRIA
DGM3	17	F	FALO = 1.5 cm	UTERO Y TROMPAS BILATERALES	GONADOBLAS-TOMA	ESTRIA
DGM4	2	F	FALO = 2.5 cm HIOSPADIA PERINEOESCROTAL	UTERO, TROMPAS Y CONDUCTOS DEFERENTES BILATERALES, EPIDIDIMO IZQUIERDO	ESTRIA	TESTICULO
DGM5	2	F	FALO = 3 cm HIOSPADIA PENEOESCROTAL	UTERO Y TROMPA IZQUIERDA	TESTICULO	ESTRIA
DGM6	11/12	M	FALO = 4 cm HIOSPADIA PERINEOESCROTAL	UTERO, TROMPA DERECHA, CONDUCTO DEFERENTE IZQUIERDO Y CONDUCTOS ESPERMATICOS BILATERALES	ESTRIA	TESTICULO
DGM7	14	M	FALO = 3.5 cm	UTERO Y TROMPAS BILATERALES	GONADOBLAS-TOMA EN TESTICULO	ESTRIA
DGM8	20	F	FALO = 1.5 cm	UTERO Y TROMPAS BILATERALES	ESTRIA	GONADOBLAS-TOMA
DGM9	7	M	FALO = 3 cm HIOSPADIA PERINEOESCROTAL	UTERO, TROMPA DERECHA EPIDIDIMO Y CONDUCTO DEFERENTE IZQUIERDO	ESTRIA	TESTICULO
DGM10	11/12	M	FALO = 3 cm HIOSPADIA PERINEOESCROTAL	UTERO ,TROMPA DERECHA; EPIDIDIMO BILATERAL Y CONDUCTO DEFERENTE IZQUIERDO	ESTRIA	TESTICULO

DGM = DISGENESIA GONADAL MIXTA

TABLA 4
CARACTERISTICAS CITOGENETICAS

PACIENTE	CARIOTIPO EN SANGRE PERIFERICA	CARIOTIPO EN GONADA DERECHA	CARIOTIPO EN GONADA IZQUIERDA
MST1	46,X + mar (100%)	45,X(100%)	45,X(100%)
MST2	45,X (16%) 46,XY (84%)	NO PRACTICADO	NO PRACTICADO
MST3	45,X (82%) 46,XY (18%)	45,X (98%) 46,XY (2%)	45,X(94%) 46,XY (6%)

MST = MOSAICO DE SINDROME DE TURNER

TABLA 5
CARACTERISTICAS CITOGENETICAS

PACIENTE	CARIOTIPO EN SANGRE PERIFERICA	CARIOTIPO EN GONADA DERECHA	CARIOTIPO EN GONADA IZQUIERDA
DGM1	45,X (65%) 46,XY (35%)	45,X (73%) 46,XY (27%)	NO PRACTICADO
DGM2	45,X (98%) 46,XY (2%)	NO PRACTICADO	NO PRACTICADO
DGM3	45,X (10%) 46,XY (90%)	45, X (100%)	45,X (100%)
DGM4	45,X (17%) 46,Xi(Y) (83%)	45,X (90%) 46,XY (10%)	45,X (90%) 46,XY (10%)
DGM5	45,X (24%) 46,XY (76%)	NO PRACTICADO	NO PRACTICADO
DGM6	46,XY (100%)	NO PRACTICADO	46,XY (100%)
DGM7	45,X (60%) 46,XY (40%)	45,X (65%) 46,XY (35%)	45,X (98%) 46,XY (2%)
DGM8	45,X (100%)	CULTIVO CONTAMINADO	CULTIVO CONTAMINADO
DGM9	45,X (94%) 46,XY (6%)	NO PRACTICADO	45,X (100%)
DGM10	45,X (90%) 46,Xi(Y) (10%)	NO PRACTICADO	45,X(80%) 46,XY (20%)

DGM = DISGENESIA GONADAL MIXTA

FIGURA 3 EXTRACCION DE ADN DE SANGRE PERIFERICA

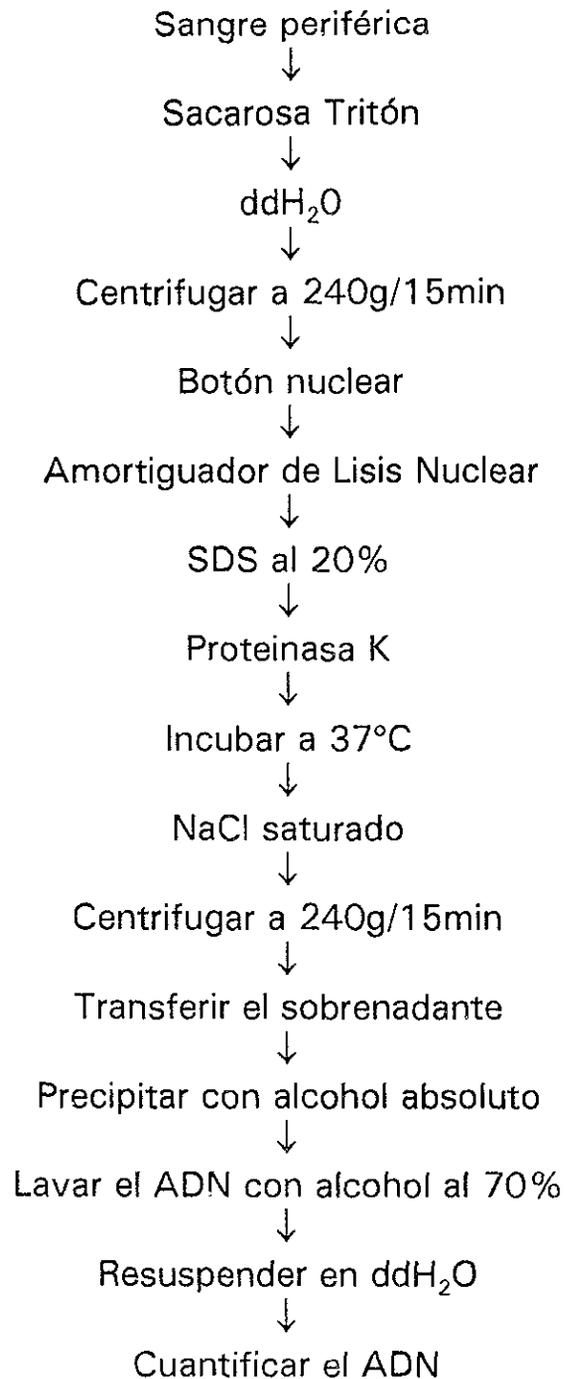


FIGURA 4
EXTRACCION DE ADN DE GONADAS FRESCAS

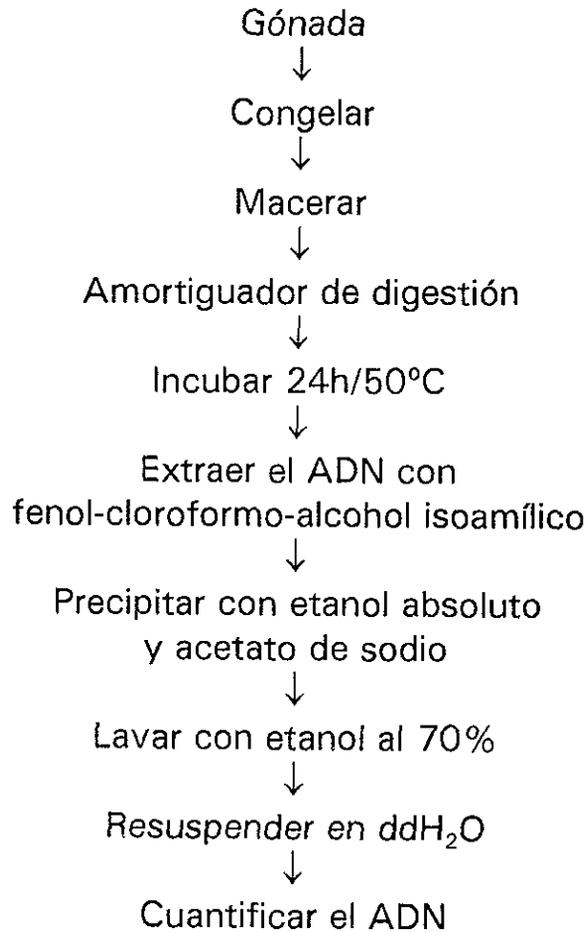


FIGURA 5
EXTRACCION DE ADN DE GONADAS
FIJADAS EN PARAFINA

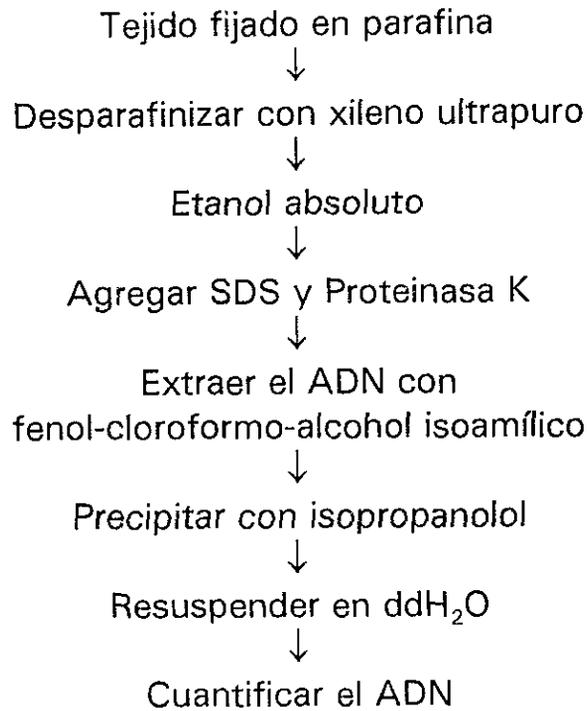


FIGURA 6
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA
(PCR)

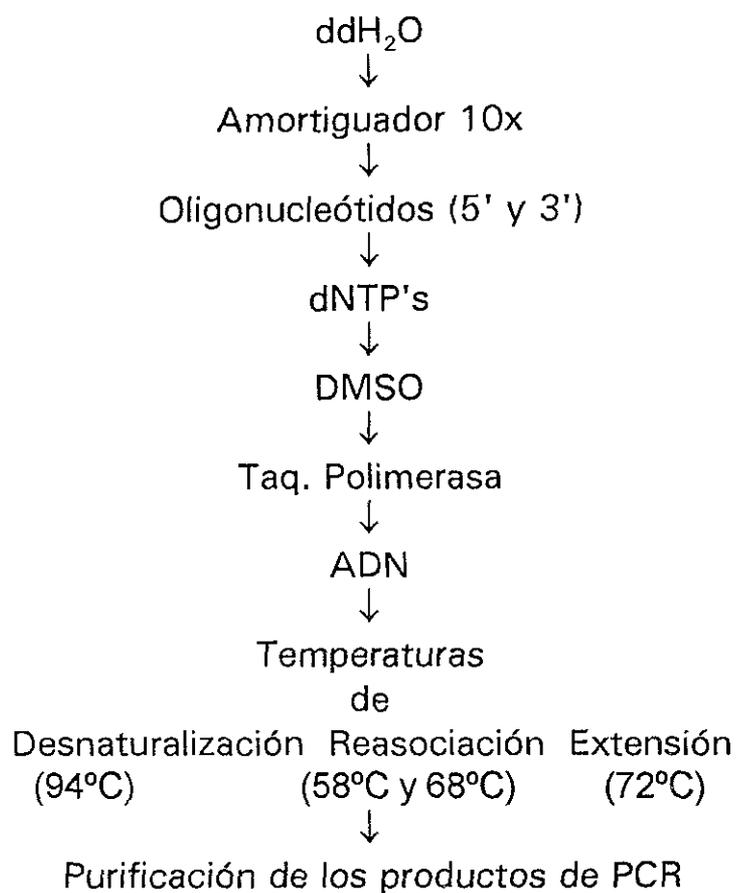


FIGURA 7 SECUENCIACION AUTOMATICA

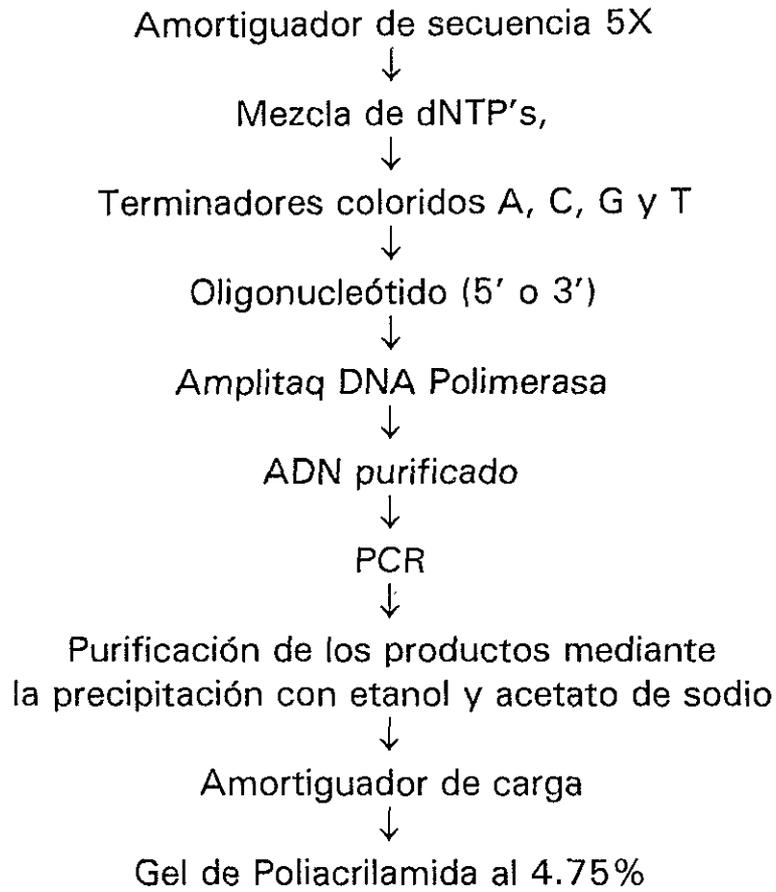
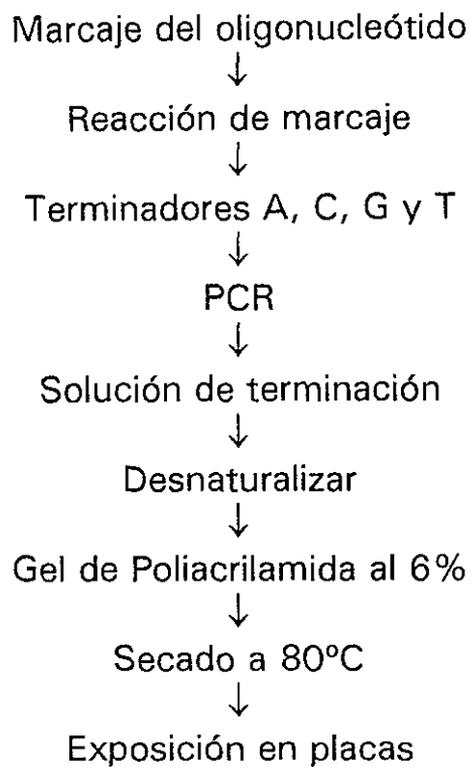


FIGURA 8 SECUENCIACION MANUAL



Resultados

El análisis por PCR del ADN genómico extraído de sangre periférica o de gónada fresca no demostró deleciones en ninguno de los sujetos estudiados. En todos los casos se observó que el tamaño de los productos del ADN fue el esperado, de acuerdo al peso molecular del SRY que corresponde a 774 pares de bases (Figuras 9-11).

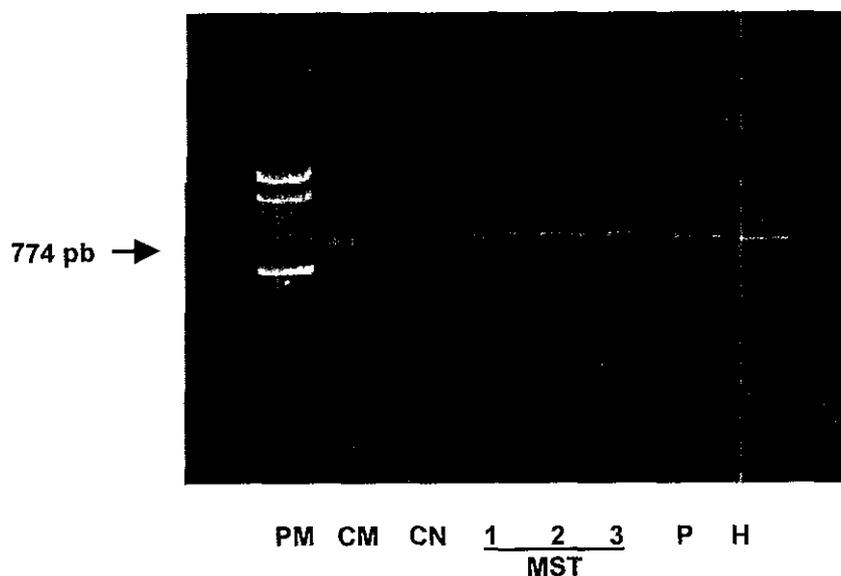
En el caso del ADN extraído de gónadas incluidas en parafina, la amplificación del exón se llevó a cabo en dos fragmentos. En todos los casos estudiados se observó que el tamaño de los productos del ADN fue el esperado de acuerdo al peso molecular el cual fue de 420 y 432 pares de bases (Figuras 12 y 13).

En el caso del ADN extraído de sangre periférica y de aquel extraído de gónada fresca, se procedió a realizar la secuenciación tanto del exón completo como de 140 pares de bases de la región 5' no traducida y de 24 pares de bases de la región 3' no traducida del gen SRY. En el caso del ADN extraído de las gónadas incluidas en parafina solamente se secuenció el exón completo. En las pacientes MST1 y MST3 se observó una mutación puntual, en el ADN tanto de sangre periférica como de aquel obtenido de ambas estrías, en la posición 2128 del gen SRY "corriente arriba" de la región 5' de la caja HMG. Esta mutación dio lugar a una transición de guanina por adenina, observándose un cambio del aminoácido serina por el aminoácido asparagina en la posición 18 de la proteína del SRY. Con el fin de corroborar dicha mutación, las muestras se secuenciaron en tres ocasiones tanto en dirección 5' como en dirección 3', utilizándose productos de amplificación de PCR independientes, demostrándose la

presencia de la mutación tanto en sangre periférica como en estría derecha e izquierda. La secuenciación se llevó a cabo siguiéndose tanto el método manual como el método automático (Figuras 14-20). En el caso de la paciente MST1 el estudio se complementó analizándose el ADN tanto del padre como del hermano mayor. La secuencia directa del ADN en la región de interés fue normal en ambos individuos. Los familiares masculinos de la paciente MST3 no aceptaron participar en el estudio. Con la secuenciación manual del exón del gen SRY, se pudo observar que esta mutación es homocigota ya que tanto el padre como el hermano de la paciente MST1 sólo presentaron la base silvestre (guanina) en su secuencia (Figura 14). Es importante señalar que no encontramos dicho cambio nucleotídico en ninguno de los sujetos estudiados como control ($n = 75$).

Tanto en la paciente MST2 como en los 10 sujetos con DGM, la secuencia del gen SRY en sangre y en gónada(s) fue normal.

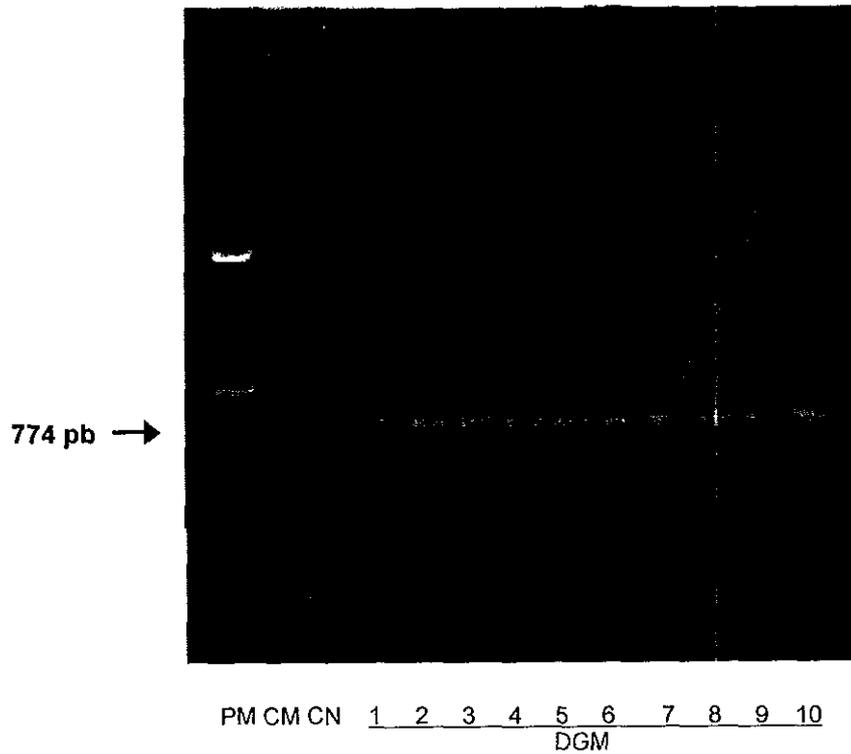
FIGURA 9



- PM = Peso molecular (100 pb)
- CM = Control masculino de sangre periférica
- CN = Control negativo
- MST = Mosaico de síndrome de Turner
- P = Padre de la paciente MST1
- H = Hermano de la paciente MST1

Reacción en cadena de la polimerasa del exón completo del gen SRY. En todas las pacientes con MST, así como en el padre y en el hermano de la paciente MST1 y en el CM, se observa amplificación de dicho exón, el cual corresponde a 774 pb.

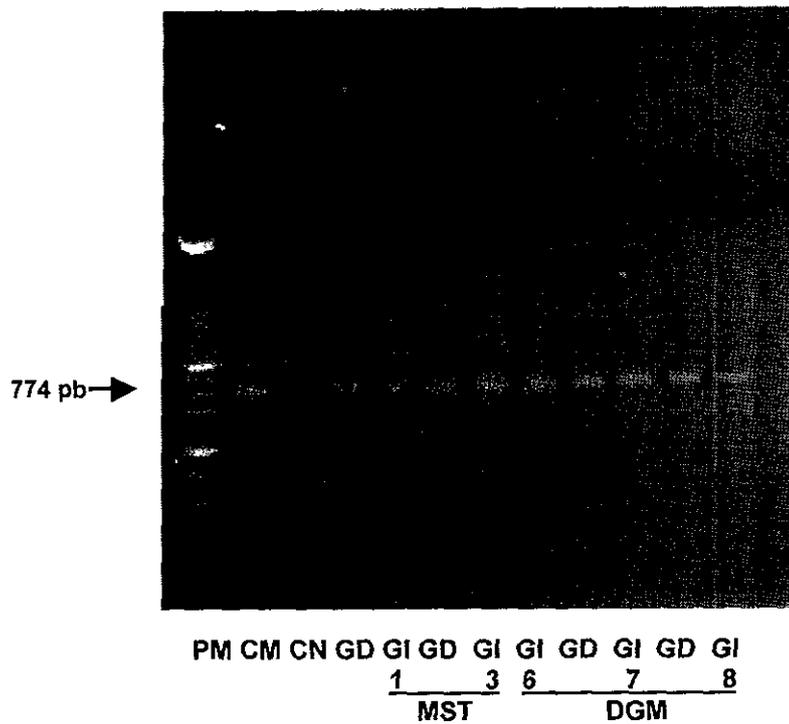
FIGURA 10



PM = Peso Molecular (100 pb)
CM = Control masculino de sangre periférica
CN = Control negativo
DGM = Disgenesia gonadal mixta

Reacción en cadena de la polimerasa del exón completo del gen SRY. En todos los pacientes con DGM así como en el CM, se observa amplificación de dicho exón el cual corresponde a 774 pb.

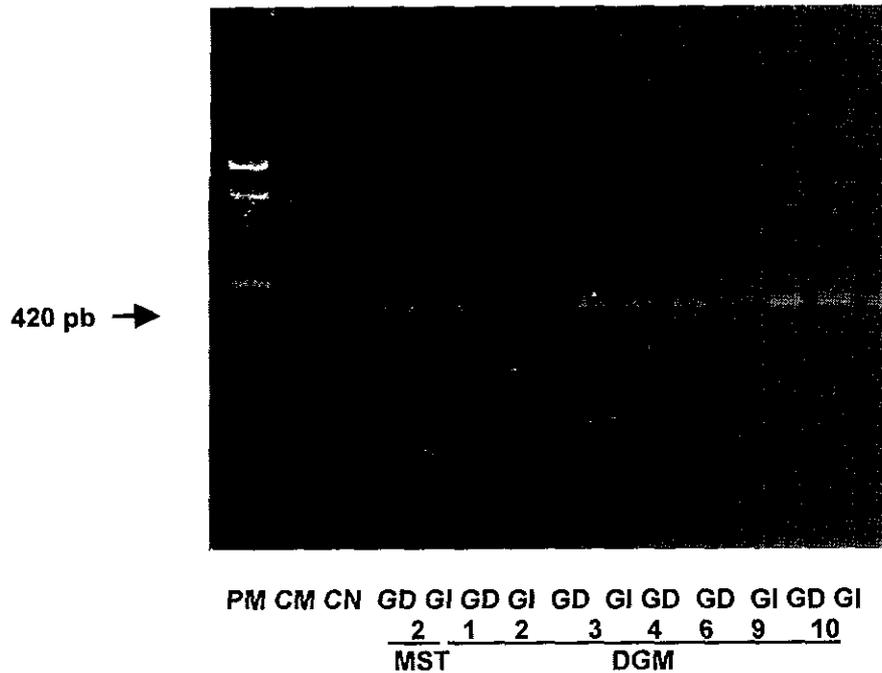
FIGURA 11



- PM = Peso molecular (100 pb)
- CM = Control masculino
- CN = Control negativo
- MST = Mosaico de síndrome de Turner
- DGM = Disgenesia gonadal mixta
- GD = Gónada derecha
- GI = Gónada izquierda

Reacción en cadena de la polimerasa del exón completo del gen SRY. En todos los sujetos con MST (1 y 3), DGM (6, 7 y 8) y en el CM, se observa amplificación de dicho exón, el cual corresponde a 774 pb.

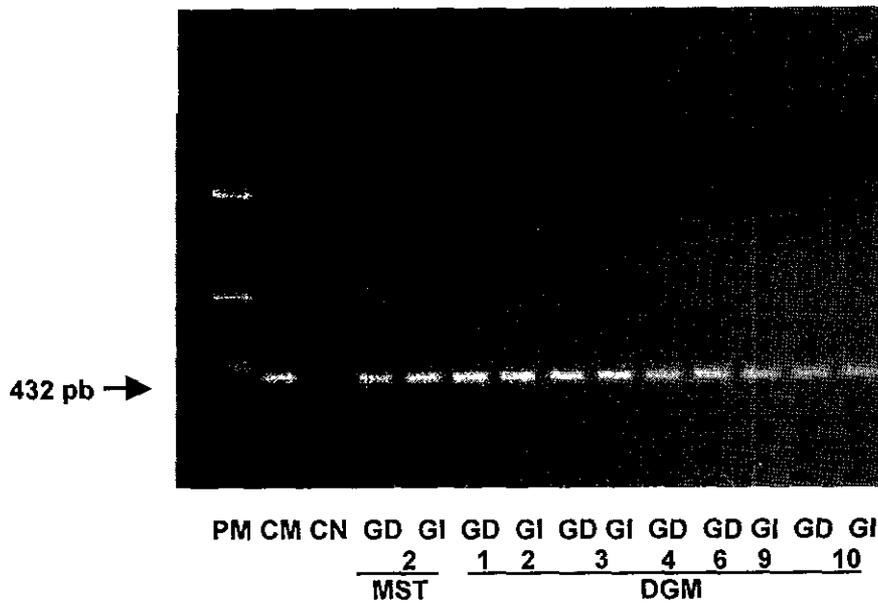
FIGURA 12



- PM = Peso molecular (100 pb)
- CM = Control masculino de gónada incluida en parafina
- CN = Control negativo
- MST = Mosaico de síndrome de Turner (gónadas derecha e izquierda)
- DGM = Disgenesia gonadal mixta (gónadas derecha e izquierda)

Reacción en cadena de la polimerasa de un fragmento del exón del gen SRY. En la paciente MST2, en todos los sujetos con DGM (1,2,3,4,6,9 y 10), y en el CM, se observa amplificación de dicho fragmento del exón, el cual corresponde a 420 pb.

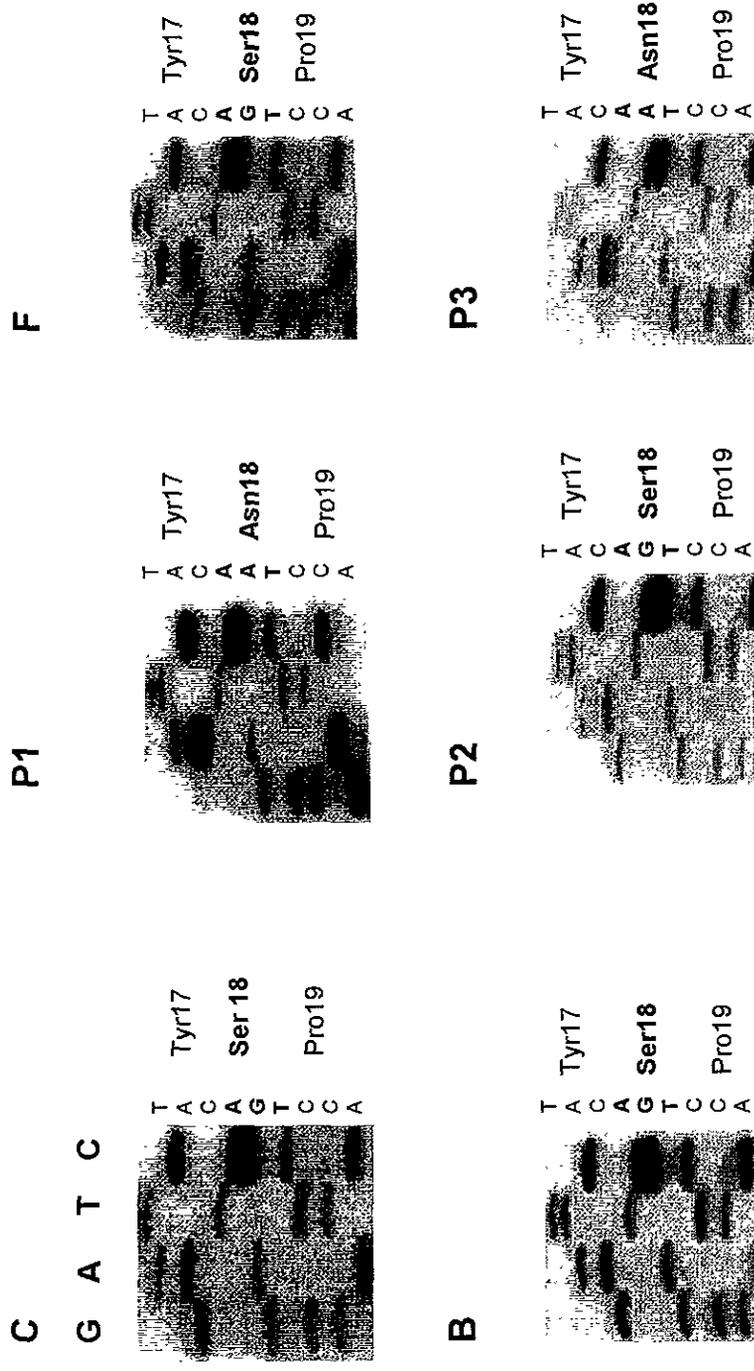
FIGURA 13



- PM = Peso molecular (100 pb)
- CM = Control masculino de gónada incluida en parafina
- CN = Control negativo
- MST = Mosaico de síndrome de Turner (gónadas derecha e izquierda)
- DGM = Disgenesia gonadal mixta (gónadas derecha e izquierda)

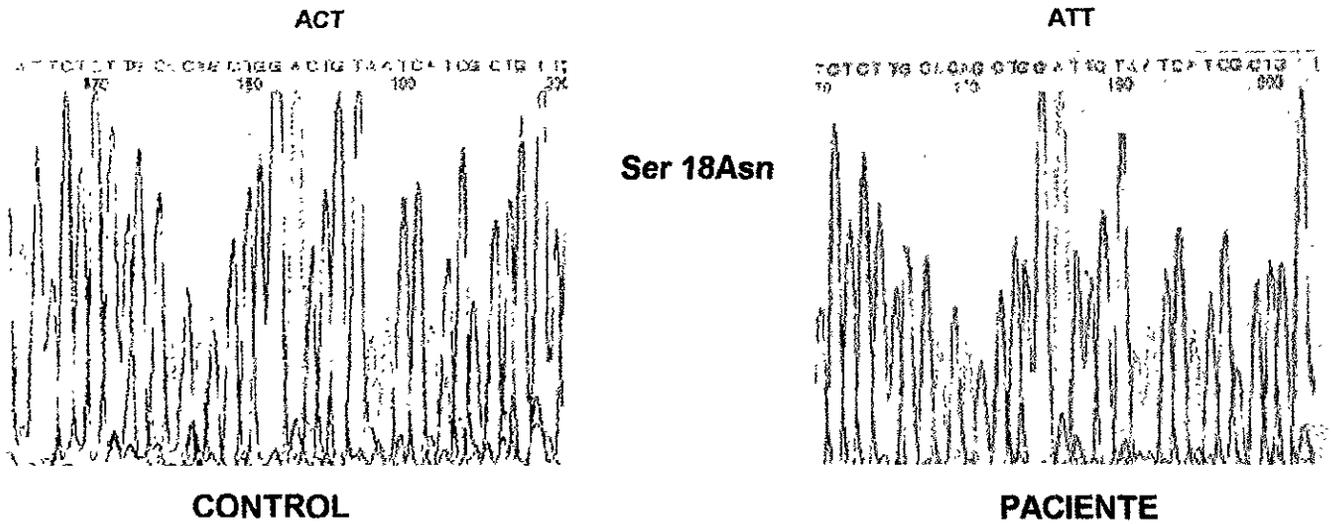
Reacción en cadena de la polimerasa de un fragmento del exón del gen SRY. En la paciente MST2, en todos los sujetos con DGM (1,2,3,4,6,9 y 10), y en el CM, se observa amplificación de dicho fragmento del exón, el cual corresponde a 432 pb.

FIGURA 14



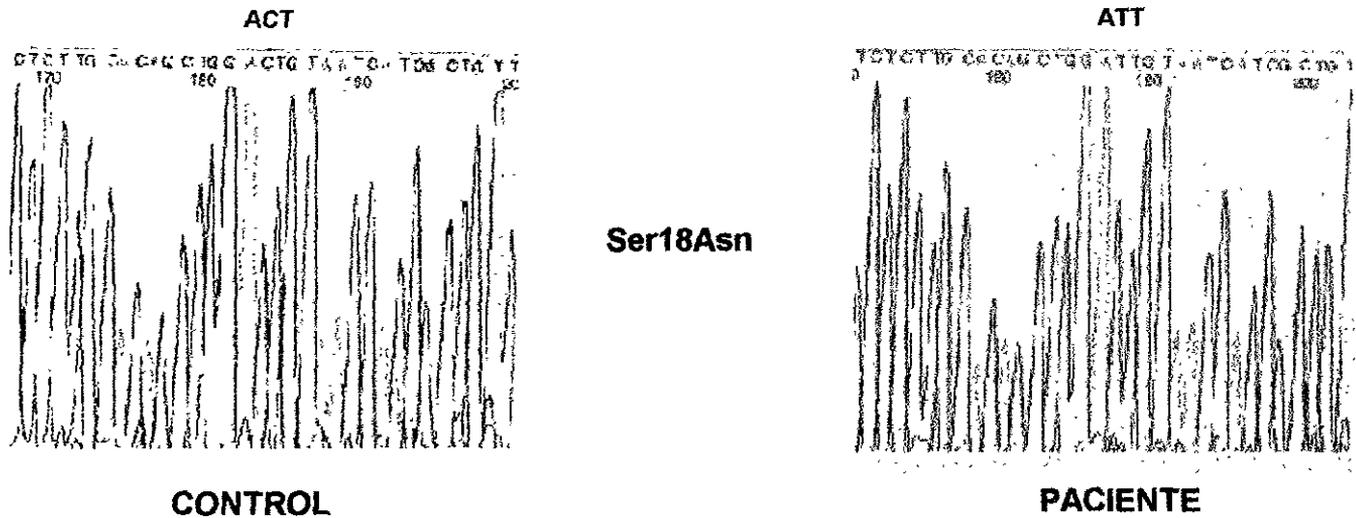
Secuenciación manual parcial en dirección 5' del exón del gen SRY, del ADN extraído de sangre periférica, en 3 pacientes con diagnóstico comprobado de MST con cromosoma Y normal o anormal. Obsérvese que las pacientes MST1 (P1) y MST3 (P3) presentan una sustitución de la base G por la base A, que induce el cambio del aminoácido serina por asparagina en la posición 18 de la proteína. La paciente MST2 (P2), así como el padre (F) y el hermano (B) de la paciente MST1, presentan el aminoácido silvestre (serina) en la misma posición de la proteína.

FIGURA 15



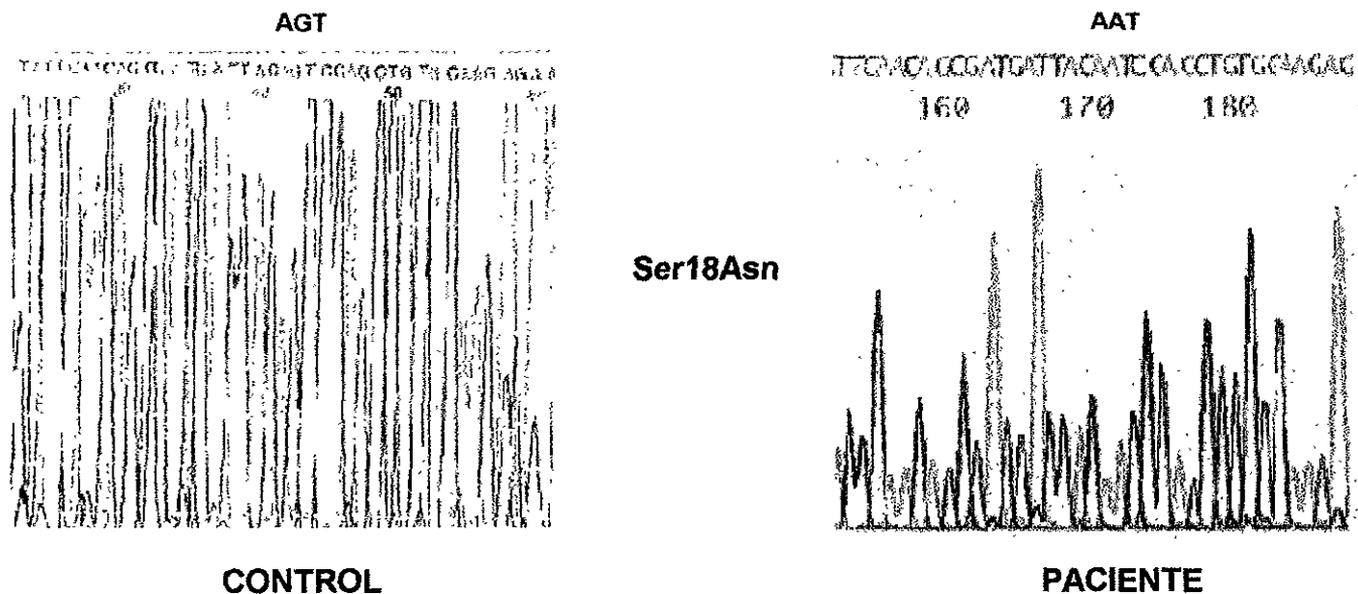
Secuencia automática parcial en dirección 3' del exón del gen SRY (del ADN extraído de sangre periférica). Obsérvese que la paciente MST1 presenta una sustitución de la base C por la base T, que induce al cambio del aminoácido serina por asparagina en la posición 18 de la proteína.

FIGURA 16



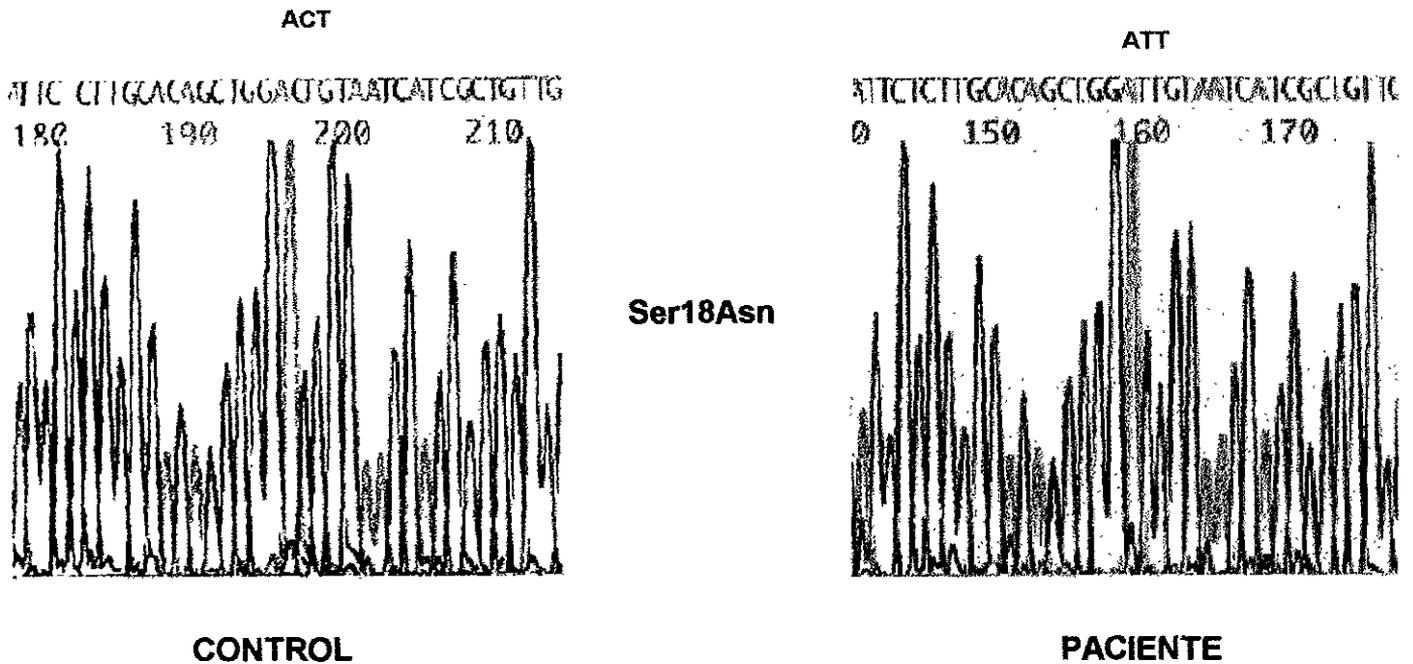
Secuencia automática parcial en dirección 3' del exón del gen SRY (del ADN extraído de sangre periférica). Obsérvese que la paciente MST3 presenta una sustitución de la base C por la base T, que induce al cambio del aminoácido serina por asparagina en la posición 18 de la proteína.

FIGURA 17



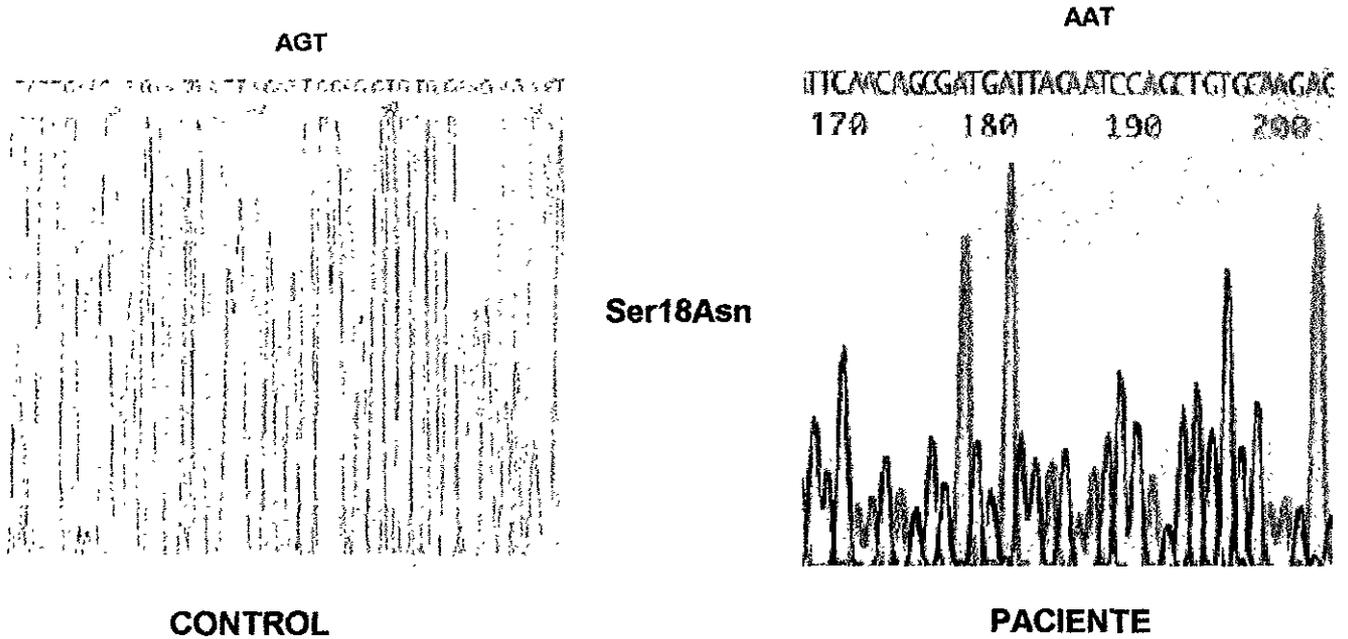
Secuencia automática parcial en dirección 5' del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada fresca). Obsérvese que la paciente MST1 presenta una sustitución de la base G por la base A, que induce al cambio del aminoácido serina por asparagina en la posición 18 de la proteína.

FIGURA 18



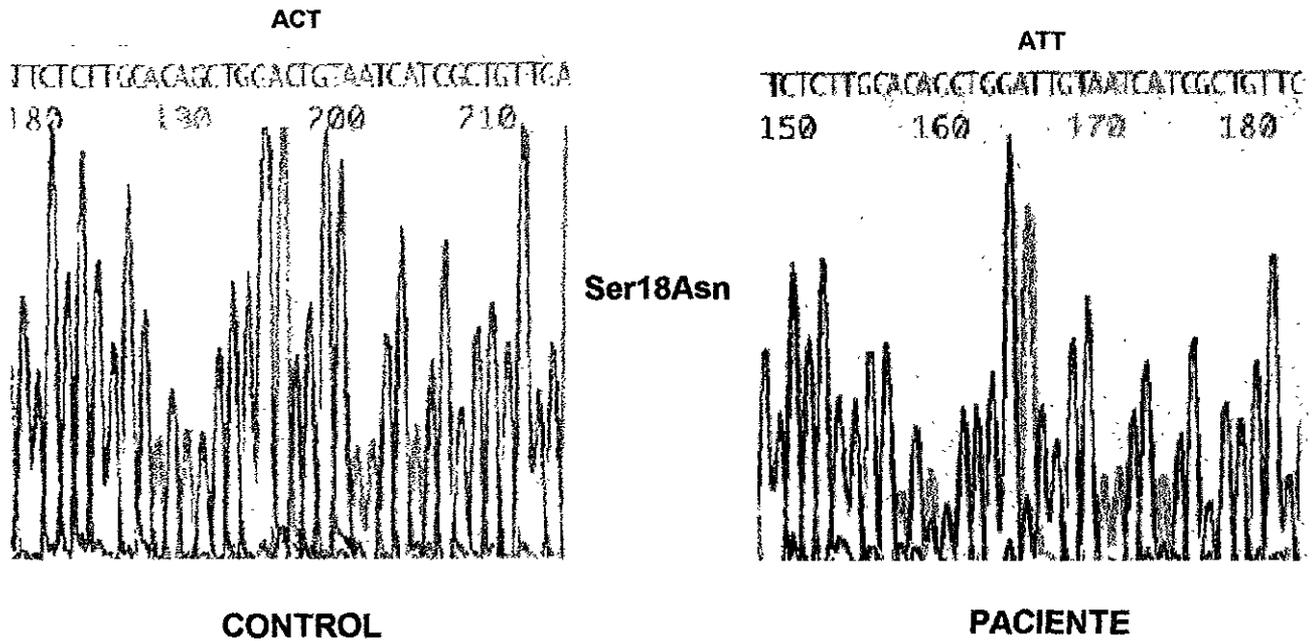
Secuencia automática parcial en dirección 3' del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada fresca). Obsérvese que la paciente MST1 presenta una sustitución de la base C por la base T, que induce al cambio del aminoácido serina por asparagina en la posición 18 de la proteína.

FIGURA 19



Secuencia automática parcial en dirección 5' del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada fresca). Obsérvese que la paciente MST3 presenta una sustitución de la base G por la base A, que induce al cambio del aminoácido serina por asparagina en la posición 18 de la proteína.

FIGURA 20



Secuencia automática parcial en dirección 3' del exón del gen SRY (del ADN extraído de gónada fresca). Obsérvese que la paciente MST3 presenta una sustitución de la base C por la base T, que induce al cambio del aminoácido serina por asparagina en la posición 18 de la proteína.

DISCUSION

En este trabajo se llevó a cabo el estudio molecular de 3 pacientes con MST con cromosoma Y normal o anormal y de 10 pacientes con diagnóstico comprobado de DGM.

La diferenciación sexual masculina involucra una cascada de eventos iniciada por la presencia y acción del gen SRY el cual se localiza en el brazo corto del cromosoma Y, adyacente a la región pseudoautosómica y es el responsable de la diferenciación de la gónada primitiva hacia testículo. Se han reportado diversas mutaciones en este gen que impiden la diferenciación de la gónada primitiva hacia testículo y dan lugar a reversión sexual XY completa o parcial. Estas mutaciones pueden ser en sentido erróneo, sin sentido, cambios en el marco de lectura y deleciones (68).

El ST constituye una de las alteraciones del sexo cromosómico más frecuentes (131), en la cual se observa la presencia de una línea celular 45,X (exclusivamente o en conjunto con otras líneas celulares) y de estrías gonadales (122,123,126). Los estudios llevados a cabo en pacientes con ST con diferentes cariotipos (45,X, mosaicos o pacientes con marcadores cromosómicos), han demostrado que del 4 al 61% de los individuos afectados presentan en su genoma un cromosoma Y completo o material derivado del cromosoma Y (124-129). A pesar de que un alto porcentaje de las pacientes con ST tienen un predominio de la línea celular 45,X, se ha propuesto que siempre presentan en su genoma pequeñas clonas de células 46,XX, 46,XY o complementos de cromosomas sexuales anormales (126). Held y cols (123) han sugerido que el

mosaicismo en pacientes con ST es un requisito para la sobrevivencia del embarazo temprano. En el caso de la paciente MST1, el estudio citogenético en sangre periférica demostró que solamente 2 de 500 células presentaban un cromosoma Y anormal, lo que demuestra que algunas pacientes en quienes aparentemente solamente existe una línea celular 45,X, en realidad son mosaicos cromosómicos. Por otro lado, se ha reportado que el mosaicismo cromosómico puede estar distribuido en forma irregular en los diferentes tejidos en un mismo individuo razón por la cual para descartarlo es necesario estudiar por lo menos 5 líneas celulares (123).

En este estudio se demostró la presencia de una mutación en sentido erróneo en la región aminoterminal del gen SRY, fuera de la caja HMG, en dos pacientes con MST. Estudios moleculares del gen SRY han demostrado que sus mutaciones condicionan la etiología de diversas alteraciones de la diferenciación sexual. Una de las alteraciones en la traducción del sexo cromosómico al sexo gonadal, en la cual se han demostrado mutaciones del SRY como causa de esta patología en el 15% de los casos es la DG 46,XY. La mayoría de estas mutaciones se encuentran en la caja HMG y alteran la función de la proteína SRY, interfiriéndose el proceso de unión o doblamiento de la proteína al ADN o alterándose su interacción con otros factores de transcripción (68). Asimismo, se han reportado mutaciones fuera de la caja HMG en sujetos con DG así como también en una mujer 46,XY con función ovárica parcial y en una mujer con mosaicismo 45,X/46,XYY (46,53,58,59,64,65,113,114).

La mutación puntual encontrada en las pacientes MST1 y MST3, induce un cambio del aminoácido serina por asparagina (S18N). A pesar de que la mayoría de las

mutaciones descritas en el gen SRY son *de novo*, se han reportado algunos casos de padres fértiles con hijas XY que comparten la misma mutación en el gen SRY (41,44,45,56,57,61,64,115). La presencia de la mutación en el padre fenotípicamente normal, no excluye la posibilidad de que esa mutación sea la causa de la reversión sexual, ésto puede ser explicado por una penetrancia variable de la mutación, lo cual dependerá del antecedente genético que afecte el nivel de expresión del gen SRY (56,57,61,68). Con el fin de valorar si la mutación en la paciente MST1 fue *de novo* se analizó el gen SRY de su padre y de un hermano. La prueba de paternidad se demostró mediante la utilización de diversas sondas de ADN. En ambos sujetos, se observó que la secuencia del gen SRY no presentó alteraciones, lo que demostró que la mutación en la paciente referida si es *de novo*.

La mutación que da lugar al cambio S18N no se identificó en ninguno de los 75 controles masculinos estudiados por nosotros, así como tampoco fue encontrada en otros 50 controles masculinos analizados en esta misma región en un trabajo previo (64), lo cual hace poco probable que este cambio de base constituya un polimorfismo.

La DG abarca un amplio espectro de condiciones clínicas caracterizadas por un desarrollo anormal de la gónada fetal. Dicha entidad patológica incluye al ST 45,X y sus variantes, a la DGM y a la DG 46,XX y 46,XY. Esta última abarca tanto la forma completa como la parcial. Excepto en la DG 46,XY parcial, en la cual se forman testículos disgenéticos bilaterales y en la DGM en donde generalmente se observan una estría gonadal y un testículo contralateral y un fenotipo ambigüo, en las otras entidades patológicas siempre está presente un fenotipo femenino y estrías gonadales bilaterales

(111). En un alto porcentaje de las pacientes con ST con cariotipo 45,X se forman estrías gonadales bilaterales; sin embargo, aproximadamente el 5% de esas pacientes pueden presentar función ovárica (154,155). Asimismo, se ha descrito en la literatura una paciente con DG 46,XY parcial, en la cual se observó diferenciación ovárica (113). Los pacientes con un cariotipo 45,X/46,XY presentan un amplio espectro clínico que va desde el fenotipo masculino con testículos disgenéticos hasta un fenotipo femenino con estrías gonadales bilaterales y fenotipo de ST (139,156).

Domenice y cols (64), estudiaron molecularmente a un sujeto 46,XY con disgenesia gonadal parcial, el cual presentó ambigüedad genital y una estría unilateral con un testículo disgenético contralateral. Dicho sujeto, presentó la misma mutación (S18N) que nuestras dos pacientes con MST, en las cuales los genitales externos fueron femeninos y existía la presencia de estrías gonadales bilaterales. Esos datos fortalecen la posibilidad de que estas dos entidades patológicas, constituyen parte del espectro de la misma alteración, y que una misma mutación puede expresarse en fenotipos diferentes, dependiendo del genoma predisponente. El hecho de que se haya encontrado la misma mutación en sentido erróneo en ambas pacientes con MST y que esta mutación sea la misma que reportaron Domenice y cols (64), sugiere que probablemente exista un "punto caliente" en esta región del gen SRY.

Recientemente, se ha propuesto que los eventos tempranos que siguen a la expresión del Sry en el ratón dan lugar a la organización topográfica de diversos tipos de células para el desarrollo del testículo. La proteína Sry posiblemente regula aspectos múltiples de la expresión del gen incluyéndose a aquellos que controlan los mecanismos

morfogénicos (157). Como ha sido recientemente propuesto por Cameron y Sinclair (68), una mutación determinada en el gen SRY puede originar que el SRY se exprese de forma suficiente para alcanzar el umbral necesario para la formación del testículo; sin embargo, la misma mutación en este gen con un antecedente genético diferente, puede dar lugar a que el nivel de expresión del SRY no sea suficiente para alcanzar el umbral requerido para la diferenciación testicular (68).

La presencia de estrías gonadales bilaterales en ambas pacientes con MST pudiéser secundaría al predominio de la línea celular 45,X y/o a la presencia de la mutación en el gen SRY. Con base en este trabajo no podemos asegurar en que magnitud participan estos fenómenos en el origen del fenotipo existente.

La ausencia de mutaciones en el marco de lectura del gen SRY en la paciente con MST2 así como en los 10 pacientes con DGM, pudiéser explicarse por la presencia de mutaciones en las regiones 5´o 3´no traducidas del gen SRY, como ha sido reportado en algunos pacientes con DG tanto en su forma completa como en la parcial (68) o por la existencia de mutaciones en otros genes autosómicos que actúan "corriente arriba" en la regulación del gen SRY, como es el gen WT1 (gen supresor del tumor de Wilms) (76,158) y SF1 (factor esteroideogénico 1) (158,159). Asimismo, se han reportado mutaciones que pueden originar reversión sexual, tanto en genes ligados al cromosoma X como autosómicos lo cuales actúan "corriente abajo" al gen SRY como son el DSS (gen de la reversión sexual sensible a dosis) (78,83,158) y el SOX9 (gen relacionado con la displasia campomélica) (79,80,82,85,158).

En conclusión, este estudio demuestra, por vez primera, la presencia de una mutación en el gen SRY en pacientes con MST. El hecho de que se haya encontrado la misma mutación en sentido erróneo en ambas pacientes con MST y que esta mutación ya ha sido informada en un sujeto con disgenesia gonadal parcial, sugiere que probablemente exista un "punto caliente" en esta región del gen SRY. Asimismo, este hallazgo también sugiere que una misma alteración génica puede expresarse en fenotipos diferentes. Estos hallazgos fortalecen la posibilidad de que estas dos entidades patológicas, constituyen parte del espectro de la misma alteración.

BIBLIOGRAFIA

1. Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. New York. Springer Verlag. 1967.
2. Jacobs P, Ross A. Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature*. 1966;210:352-355.
3. Goodfellow P, Darling S. Genetics of sex determination in man and mouse. *Development*. 1988;102:251-258.
4. Jirásek J. Development of the genital system and male pseudohermaphroditism. Baltimore. John Hopkins University Press. 1971.
5. Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Invest Clin*. 1982;34:349-359.
6. McKay D. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rev*. 1953;117:201-206.
7. Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow P. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346:240-244.
8. López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am J Med Genet*. 1995;55:356-358.
9. Zenzes M, Müller U, Aschmoneit I, Wolf U. Studies on H-Y antigen in different cell fractions of the testis during pubescence. In mature germ cells are antigen H-Y negative. *Hum Genet*. 1978;45:297-303.
10. Cuevas-Covarrubias S, Kofman-Alfaro S. El cromosoma Y humano. *Rev Invest Clin*. 1990;42:290-297.
11. Kiel-Metzger K, Warren G, Wilson G, Erickson R. Evidence that the human Y chromosome does not contain clustered DNA sequences (Bkm) associated with heterogametic sex determination in other vertebrates. *N Engl J Med*. 1985;313:242-245.
12. Page D, Mosher E, Simpson E, Fisher E, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown L. The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*. 1987;51:1091-1104.
13. Wachtel S, Ohno S, Koo G, Boyse E. Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*. 1975;257:235-236.
14. McLaren A, Simpson E, Tomonari K, Chandler P, Hogg H. Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature*. 1984;312:552-555.
15. Schneider-Gädicke A, Beer-Romero P, Brown L. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*. 1989;57:1247-1258.

16. Sinclair A, Foster J, Spencer J, Page D, Palmer M, Goodfellow P, Graves J. Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature*. 1988;336:780-783.
17. Koopman P, Gubbay J, Collignon J, Lovell-Badge R. ZFY gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature*. 1989;342:940-942.
18. Palmer M, Sinclair A, Berta P, Ellis N, Goodfellow P, Abbas N, Fellous M. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature*. 1989;342:937-939.
19. Verga V, Erickson R. An extended long-range restriction map of the human sex-determining region on Xp, including ZFY, finds marked homology and no detectable Y sequences in an XX male. *Am J Hum Genet*. 1989;44:756-765.
20. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 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*. 1990;346:245-250.
21. Su H, Lau Y. 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*. 1993;52:24-38.
22. Dubin R, Ostrer H. Sry is a transcriptional activator. *Mol Endoc*. 1994;8:1182-1193.
23. Poulat F, Girard F, Chevron MP, Gozé C, Rebillard X, Calas B, Lamb N, Berta P. Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J Cell Biol*. 1995;128:737-748.
24. Ferrari S, Harley V, Pontiggia A, Goodfellow P, Lovell-Badge R, Bianchi M. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J*. 1992;11:4497-4506.
25. Harley V, Jackson D, Hextall P, Hawkins S, Berkovitz G, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow P. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science*. 1992;255:453-456.
26. van de Wetering M, Clavers H. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J*. 1992;11:3039-3044.
27. Werner M, Huth J, Gronenborn A, Clore M. Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY DNA complex. *Cell*. 1995;81:705-714.
28. Tang Y, Nilsson L. Interaction of human SRY protein with DNA: a molecular dynamic study. *Proteins*. 1998;31:417-433.
29. Nash HA. Bending and supercoiling of DNA at the attachment site of bacteriophage lambda. *Trends Biochem Sci*. 1990;15:222-227.
30. Grosschedl R, Grese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet*. 1994;3:94-102.

31. Werner M, Gronenborn A, Clore G. *Interaction, DNA kinking, and the control of transcription.* Science. 1996;271:778-784.
32. Haqq C, King C, Danahoe P, Weiss M. SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:1097-1101.
33. Haqq Ch, Yen-Chih L, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq T, Donahoe P, Weiss M. Molecular basis of mammalian sexual determination activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. Science. 1994;266:1494-1500.
34. Bogan J, Page D. Ovary? Testis?- A mammalian dilemma. Cell. 1994;76:603-607.
35. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Bagde R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. Nature. 1990;348:450-452.
36. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Bagde R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. Nature. 1991;351:117-121.
37. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of Sry the mouse sex determining gene. Development. 1995;121:1603-1614.
38. Zwingman T, Erickson R, Boyer T, Ao A. Transcription of the sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:814-817.
39. Fiddler M, Abdel-Rahman B, Rappolee D, Pergament E. Expression of SRY transcript in preimplantation human embryos. Am J Med Genet. 1995;55:80-84.
40. Hawkins J. The SRY gene. Trends Endocrinol Metab. 1993;4:328-332.
41. Berta P, Hawkins J, Sinclair A, Taylor A, Griffiths B, Goodfellow P, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. Nature. 1990;348:448-450.
42. Jager R, Anvret M, Hall K, Scherer G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. Nature. 1990;348:452-454.
43. Hawkins J, Taylor A, Berta P, Levilliers B, Van der Auwera, Goodfellow P. Mutation analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. Hum Genet. 1992;88:471-474.
44. Hawkins J, Taylor A, Goodfellow P, Migeon C, Smith K, Berkovitz G. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. Am J Hum Genet. 1992;51:979-984.
45. Jäger R, Harley V, Pfeiffer R, Goodfellow P, Scherer G. A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. Hum Genet. 1992;90:350-355.
46. McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Costa JN, Souleyreaun N, Kucheira K, Boucekkine C, Thibaud E, Brauner R, Flamant F, Fellous M. XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:11016-11020.
47. McElreavey K, Vilain E, Boucekkine C, Vidaud M, Jaubert F, Richaud F, Fellous M. XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. Genomics. 1992;13:838-840.

ESTA TESIS NO DEBE
 SER REPRODUCIDA
 SIN EL CONSENTIMIENTO
 DEL AUTOR

48. Müller J, Schwartz M, Skakkebaek N. 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.* 1992;75:331-333.
49. Affara N, Chalmers I, Ferguson-Smith M. 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.* 1993;2:785-789.
50. Zeng Y, Ren Z, Zhang M, Huang Y, Zeng F. A new de novo mutation (A113T) in HMG box of the SRY gene leads to XY gonadal dysgenesis. *J Med Genet.* 1993;30:655-657.
51. Lida T, Nakahori Y, Komaki R, Mori E, Hayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y, Nakagome Y. A novel nonsense mutation in the HMG box of the SRY gene in a patient with XY sex reversal. *Hum Mol Genet.* 1994;3:1437-1438.
52. Poulat F, Soullier S, Gozé C, Heitz F, Calas B, Berta P. Description and functional implications of a novel mutation in the sex-determining gene SRY. *Hum Mutat.* 1994;3:200-204.
53. Tajima T, Nakae J, Shinohara N, Fujieda K. A novel mutation localized in the 3' non-HMG box region of the SRY gene in 46,XY gonadal dysgenesis. *Hum Mol Genet.* 1994;3:1187-1189.
54. Barbosa A, Ferraz-Costa T, Semer M, Liberman B, Moreira-Filho C. XY gonadal dysgenesis and gonadoblastoma: a study in two sisters with a cryptic deletion of the Y chromosome involving the SRY gene. *Hum Genet.* 1995;95:63-66.
55. Peters R, King ChY, Ukiyama E, Falsafi S, Donahoe P, Weiss M. An SRY mutation causing human sex reversal resolves a general mechanism of structure specific DNA recognition: application to the four-way DNA junction. *Biochem.* 1995;34:4569-4576.
56. Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwaber P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G. Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet.* 1995;56:862-869.
57. Bilbao J, Loridan L, Castaño L. A novel postzygotic nonsense mutation in SRY in familial XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet.* 1996;97:537-539.
58. Kwok C, Tyler-Smith C, Mendonca B, Hughes I, Berkovitz G, Goodfellow P, Hawkins J. Mutation analysis of the 2 kb 5' to SRY in XY females and XY intersex subjects. *J Med Genet.* 1996;33:465-468.
59. McElreavey K, Vilain E, Barbaux S, Fuqua JS, Fechner PY, Souleyreau N, Doco-Fenzy M, Gabriel R, Quereux C, Fellous M, Berkovitz G. Loss of sequences 3' to the testis-determining gene, SRY, including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:3590-3594.
60. Battiloro A, Angeletti B, Tozzi M, Bruni L, Tondini S, Vignetti P, Verna R, D'Ambrosio E. A novel double nucleotide substitution in the HMG box of the SRY gene associated with Swyer syndrome. *Hum Genet.* 1997;100:585-587.
61. Hines R, Tho S, Zhang Y, Plouffe L, Hansen K, Khan I, McDonough P. Paternal somatic and germ-line mosaicism for a sex-determining region on Y (SRY) missense mutation leading to recurrent 46,XY sex reversal. *Fertil Steril.* 1997;67:675-679.

62. Veitia R, Ion A, Barbaux S, Jobling M, Souleyreau N, Ennis K, Ostrer H, Tosi M, Meo T, Chibani J, Fellous M, McElreavey K. Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet.* 1997;99:648-652.
63. Cameron F, Smith M, Warne G, Sinclair A. Novel mutation in the SRY gene results in 46,XY gonadal dysgenesis. *Hum Mutat.* 1998;Suppl 1:S110-S111.
64. Domenice S, Nishi M, Correia Billerbeck A, Latronico A, Medeiros M, Russell A, Vass K, Carvalho F, Costa Frade E, Prado Arnhold I, Bilharinho Mendonca B. A novel missense mutation (S18N) in the 5' non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial dysgenesis and his normal male relatives. *Hum Genet.* 1998;102:213-215.
65. Poulat F, Desclozeaux M, Tuffery S, Jay P, Boizet B, Berta P. Mutation in the 5' noncoding region of the SRY gene in an XY sex-reversed patient. *Hum Mutat.* 1998; Suppl 1:S192-S194.
66. Uehara S, Funato T, Yaegashi N, Suzuki H, Sato J, Sasaki T, Yajima A. SRY mutation and tumor formation on the gonads of XP pure gonadal dysgenesis patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999;113:78-84.
67. Pontiggia A, Rimini R, Harley V, Goodfellow P, Lovell-Badge R, Bianchi M. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J.* 1994;13:6115-6124.
68. Cameron F, Sinclair A. Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum Mutat.* 1997;9:388-395.
69. Capel B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:497-523.
70. Tang Y, Nilsson L. Effect of G40R mutation on the binding of human SRY protein to DNA: a molecular dynamics view. *Proteins.* 1999;35:101-113.
71. Foster J, Brennan F, Hampikian G, Goodfellow P, Sinclair A, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfrew M, Cooper D, Graves JAM. Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY related sequences in marsupials. *Nature.* 1992;359:531-533.
72. Eicher EM, Washburn LL, Schork N, Lee B, Shown E, Xu X, Dredge R, Pringle M, Page D. Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-YPOS sex reversal. *Nat Genet.* 1996;14:206-209.
73. Denny P, Swift S, Brand N, Dabhade N, Barton P, Ashworth A. A conserved family of genes related to the testis-determining gene SRY. *Nucleic Acids Res.* 1992;20:2887.
74. Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow P. SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum Mol Genet.* 1993;2:2013-2018.
75. Foster J, Marshall G. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:1927-1931.

76. Pelletier J, Bruening W, Kashtan C, Mauer S, Manivel J, Strieger J, Houghton D, Junien C, Habib R, Fouser L, Fine R, Silverman B, Haber D, Housman D. Germline mutations in the Wilm's tumour suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell*. 1991;67:437-447.
77. Bennett CP, Docheerty Z, Robb SA, Ramani P, Hawkins J, Grant D. Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet*. 1993;30:518-520.
78. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley K, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McGabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature*. 1994;7:497-501.
79. Foster J, Dominguez-Steglich M, Guioli S, Kwok Ch, Weller P, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young I, Goodfellow P, Brook J, Schafer A. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 1994;372:525-530.
80. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantés J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY related gene SOX9. *Cell*. 1994;49:1111-1120.
81. López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Pérez-Palacios G, Erickson R, Alfaro G, Kofman-Alfaro S. Clinical traits and molecular findings in 46,XX males. *Clin Genet*. 1995;48:29-34.
82. Foster JW. Mutations in SOX9 cause both autosomal sex reversal and campomelic dysplasia. *Acta Paediatr Jpn*. 1996;38:405-411.
83. Ogata T, Matsuo N. Sex determining gene on the X chromosome short arm: dosage sensitive sex reversal. *Acta Paediatr Jpn*. 1996;38:390-398.
84. Torres L, López M, Méndez JP, Canto P, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Med Genet*. 1996;63:348-355.
85. Wirth J, Wagner T, Meyer J, Pfeiffer RA, Tietze HU, Schempp W, Scherer G. Translocation breakpoints in three patients with campomelic dysplasia and autosomal sex reversal map more than 130 kb from SOX9. *Hum Genet*. 1996;97:186-193.
86. Merchant-Larios H. Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: Van Blerkom J, Motta P. eds. *Ultrastructure of Reproduction. Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers*. 1984;19-30.
87. George F. Sexual differentiation. En: Griffin D, Ojeda S. eds. *Textbook of Endocrine Physiology*, 2ª. ed. USA. Oxford University Press. 1992;117-132.
88. Grumbach M, Conte F. Disorders of sex differentiation. En: Wilson J, Foster D. eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 9ª. ed. Philadelphia. Saunders. 1998;1303-1425.
89. George F, Wilson J. Embryology of the genital tract. En: Walsh P, y cols. eds. *Campbell's Urology*, 6ª. ed. Philadelphia. Saunders. 1992;1496-1506.

90. Jost A. Problems of fetal endocrinology. The gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Progr Horm Res.* 1953;8:379-418.
91. Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet J. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res.* 1973;29:1-41.
92. Jirásek J. The relationship between the structure of the testis and differentiation of the external genitalia and phenotype in man. En: Wolstenholme G, O'Connor M. eds. *Endocrinology of the Testis.* Boston. Little Brown & Co. 1967;3-30.
93. Serra G, Pérez-Palacios G, Jaffe R. De novo testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;10:128.
94. Griffin J, Wilson J. Disorders of the testes and the male reproductive tract. En: Wilson J, Foster D. eds. *Williams Textbook of Endocrinology, 9ª. ed.* Philadelphia. Saunders. 1998;819-875.
95. Pérez-Palacios G, Pérez A. Integración endócrina de la unidad fetoplacentaria y patología del testículo fetal. En: Malacara J, y cols. eds. *Fundamentos de Endocrinología Clínica, 4ª. ed.* México. La prensa Médica Mexicana. 1990;455-470.
96. Wilson J. Metabolism of testicular androgens. En: Greep R, Astwood E. eds. *Handbook of Physiology. Endocrinology, Male Reproductive System, vol V.* Washington. American Physiological Society. 1975;Sec 7:491-508.
97. Griffin J, Wilson J. The androgen resistance syndrome: 5α -reductase deficiency, testicular feminization and related disorders. En: Scriver R, y cols. eds. *The metabolic basis of inherited disease.* New York. McGraw Hill. 1989:1919-1944.
98. Imperato-McGinley J, Gautier T. Male pseudohermaphroditism due to inherited 5α -reductase deficiency in man. En: Martinez-Mora. ed. *Intersexual Status: disorders of sex differentiation.* Barcelona. Doyma. 1994;231-240.
99. Partridge W. Serum bioavailability of sex steroid hormones. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;15:259.
100. Lasznitzki I, Franklin H, Wilson J. The mechanism of androgen uptake and concentration by rat ventral prostate in organ culture. *J Endocrinol.* 1974;60:81-90.
101. Goldstein J, Wilson J. Hereditary disorders of sexual development in man. En: Motulsky A, Lentz W. eds. *Birth Defects International Congress Series 310.* Amsterdam. Excerpta Medica. 1974;11:1.
102. Wilson J, Goldstein J. Classification of hereditary disorders of sexual development. En: Bergsma D. ed. *Genetic Forms of Hypogonadism.* New York. Birth Defects: Original Article Series. Stratton Corp. 1975;11:1.
103. Griffin J, Wilson J. Disorders of sexual differentiation. En: Walsh P, y cols. ed. *Campbell's Urology.* Philadelphia. Saunders. 1986;1819-1832.
104. Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Pérez-Palacios G. Estudios citogenéticos, endocrinológicos e histológicos en hermafroditismo verdadero. *Rev Invest Clin.* 1992;44:229-234.

105. Pérez-Palacios G, Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. True hermaphroditism. En: Martínez-Mora J. ed. *Intersexual States: disorders of sex differentiation*. Barcelona. Doyma. 1994;253-268.
106. Pérez-Palacios G, Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. Sex reversal in humans: the XX male syndrome and related disorders. En: Martínez-Mora J. ed. *Intersexual States: disorders of sex differentiation*. Barcelona. Doyma. 1994;269-281.
107. Lim H, Freestone S, Romero D, Kwok C, Hughes I, Hawkins J. Candidate genes in complete and partial XY sex reversal: mutation analysis of SRY, SRY-related genes and FT2-F1. *Mol Cell Endocrinol*.1998;140:51-58.
108. Sohval A. *The syndrome of pure gonadal dysgenesis*. *Am J Med Genet*. 1965;38:615-625.
109. Rajfer J, Walsh P. Mixed gonadal dysgenesis-dysgenetic male pseudohermaphroditism. En:Josso N. ed. *The intersex child*. Basel. Karger 1981:105-115.
110. Kofman-Alfaro S, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Angeles A, Schiavon R, Pérez-Palacios G. Studies of gonadal dysgenesis: variable expressivity of the XY testicular dysgenesis syndrome two cases reports. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1989,32:265-274.
111. Berkovitz G, Fechner P, Zacur H, Rock J, Dnyder H, Migeon C, Perlman E. Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine*.1991;70:375-383.
112. López López M, Zenteno JC, Méndez JP, Kofman-Alfaro S. Heterogeneidad genética y variabilidad fenotípica en la reversión sexual 46,XY. *Rev Invest Clin*. 1998,50:171-176.
113. Brown S, Yu C, Lanzano P, Heller D, Thomas L, Warburton D, Kitajewski J, Stadtmauer L. A novo mutation (Gln2Stop) at the 5' end of the SRY gene leads to sex reversal with partial ovarian function. *Am J Hum Genet*. 1998;62:189-192.
114. Takagi A, Imai A, Tamaya T. A novel sex-determining region on Y (SRY) nonsense mutation identified in a 45X,/47,XYY. *Fertil Steril*. 1999;72:167-169.
115. Vilain E, McElreavey K, Jaubert F, Raymond JP, Richard F, Fellous M. Familial case with sequence variant in the testis determining region associated with two sex phenotypes. *Am J Hum Genet*. 1992;50:1008-1011.
116. McElreavey K, Barboux S, Ion A, Fellous M. The genetic basis of murine and human sex determination. *Heredity*. 1995;75:599-611.
117. Schafer A. Sex determination and its pathology in man. *Adv Genet*. 1995;33:275-329.
118. Ulrich P. Uber typische kombinationsbilder multipler abartungen. *Zkinderheilkd*. 1930;49:271-276.
119. Turner H. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology*.1938;23:566-574.

120. Polani P, Hunter W, Lennox B. Chromosomal sex in Turner's syndrome with coarctation of the aorta. *Lancet*. 1954;2:120-126.
121. Ford C, Jonis K, Polani P, de Almeida J, Briggs J. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*. 1959;1:711-713.
122. Hall J, Gilchrist D. Turner syndrome and its variants. *Pediatrics Clinics of North American*. 1990;37:1421-1440.
123. Held K, Kerber S, Kaminsky E, Singh S, Goetz P, Seemanova E, Goedde A. Mosaicism in 45,X Turner syndrome does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosome? *Hum Genet*. 1992;88:288-294.
124. Binder G, Koch A, Wajs E, Ranke MB. Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common? *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:3532-3536.
125. Coto E, Toral J, Méndez M, Hernando I, Plascencia A, Benavides A, López-Larrea C. PCR-based study of the presence of Y-chromosome sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet*. 1995;57:393-396.
126. Fernández R, Méndez J, Pasaro E. Turner syndrome: A study of chromosomal mosaicism. *Hum Genet*. 1996;98:29-35.
127. López M, Canto P, Aguinaga M, Torres L, Cervantes A, Alfaro G, Méndez JP, Kofman-Alfaro S. Frequency of Y chromosomal material in mexican patient with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet*. 1998;76:120-124.
128. Patsalis PC, Sismani C, Hadjimarco M. Detection and incidence of cryptic Y-chromosome sequences in Turner syndrome patients. *Clin Genet*. 1998;53:249-257.
129. Quilter CR, Taylos K, Conway GS, Nathwani N, Delhanty JD. Cytogenetic and molecular investigations of Y-chromosome sequences and their role in-Turner syndrome. *Ann Hum Genet*. 1998;62:99-106.
130. Hook E, Warburton D. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: live birth prevalence and evidence of diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum genet*. 1983;64:24-27
131. Hassold T, Benhan F, Leppert M. Cytogenetic and molecular analysis of sex chromosome monosomy. *Am J Hum Genet*. 1988;42:534-541.
132. Zinn A, Page D, Fisher E. Turner syndrome, the case of the missing sex chromosome. *TIG*. 1993;9:90-93.
133. Ogata T, Matsuo N. Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. *Hum Genet*. 1995;95:607-629.
134. Verp M, Simpson J. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1987;25:191-218.

135. Sohval A. Mixed gonadal dysgenesis. A variety of hermaphroditism. *Am J Hum Genet.* 1963;15:155-158.
136. Davidoff F, Federman D. Mixed gonadal dysgenesis. *Pediatrics.* 1973;52:725-742.
137. Zah W, Kalderon A, Tucci J. Mixed gonadal dysgenesis. A case report and a review of the world literature. *Acta Endocrinol.* 1975;197(suppl):3-39.
138. Bergadá C, Coco R, Chemes H. Assymmetric gonadal differentiations. En: *Martinez-Mora J eds. Intersexual States.* Barcelona. Doyma. 1994;283-289.
139. Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mutchinick O, Fernández del Castillo C, Reyes E, Pérez-Palacios G. Mixed gonadal dysgenesis: clinical, cytogenetic, endocrinological, and histopathological findings in 16 patients. *Am J Med Genet.* 1993;46:263-267.
140. Reddy KS, Sulcova V, Ho CK, Conner ED, Khurana A. An infant with a mosaic 45,X/46,X,psudic(Y) (pter→q11.2::q11.2→pter) karyotype and mixed gonadal dysgenesis studied for extent of mosaicism in the gonads. *Am J Med Genet.* 1996;66:441-444.
141. Bengtsson B, Gustavson KH, Reuterskiöld G, Santesson B, Ahsen S. Male pseudohermaphroditism with 45,X/46XYq- mosaicism in a pair of monozygotic twins. *Clin Genet.* 1974;5:133-143.
142. Mailhes JB, Pittaway DE, Rary J, Chen H, Grafton WD. H-Y antigen-positive male pseudohermaphroditism with 45,X/46,XYq- mosaicism. *Hum Genet.* 1979;53:57-63.
143. Sugarman ID, Crolla JA, Malone PS. Mixed Gonadal dysgenesis and cell line differentiation. Case presentation and literature review. *Clin Genet.* 1994;46:313-315.
144. Scully R. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer.* 1970;25:1340-1355.
145. Page D. Hypothesis: a Y-chromosome gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development.* 1987;101(Suppl):151-155.
146. Sadi AM, Toda T, Kiyuna M, Miyagi H. Mixed gonadal dysgenesis with gonadoblastoma in a female with Y chromosome: case report. *J Obstet Gynecol.* 1996;22:25-30
147. John S, Weizner G, Rozen R, Scriver C. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:408.
148. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. En: *Ausubel F, Brent R, Kingston R, y cols. eds. Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1. Massachusetts General Hospital. Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc.* 1994;2.2.1-2.2.3.
149. Cooper C, Stratton M. Extraction and enzymatic amplification of DNA from paraffin-embedded specimens. En: *Mathew Ch. ed. Protocols in Human Molecular Genetics.* New Jersey. Human Press. 1991;133-140.
150. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2^a. ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989;14.1-14.35.

151. Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:1939-1943.
152. Greer C, Peterson S, Kiviat N, Manos M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *Anat Pathol*. 1991;95:117-124.
153. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:5463-5467.
154. Palmer G, Reichman A. Chromosomal and clinical findings in 110 females with Turner syndrome. *Hum Genet*. 1976;35:35-49.
155. Hall J, Sybert V, Williamson R. Turner syndrome. *West J Med*. 1982;137:32-34.
156. Kofman S, Pérez-Palacios G, Medina M, Escobar N, García M, Ruz L, Mutchinick O, Lisker R. Clinical and endocrine spectrum in patients with the 45,X/46,XY karyotype. *Hum Genet*. 1981;58:373-376.
157. Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol*. 1997;7:958-968.
158. MacLean H, Warne G, Zajac J. Intersex disorders: shedding light on male sexual differentiation beyond SRY. *Clin Endocrinol*. 1997;46:101-108.
159. Luo X, Ikeda Y, Parker K. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*. 1994;77:481-490.