

44  
2E<sub>3</sub>



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN SRY EN  
PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE DISGENESIA  
GONADAL MIXTA Y CON DIAGNOSTICO  
DE ANORQUIA”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

P R E S E N T A :

**NORMA ANGELICA GALICIA CANALES**

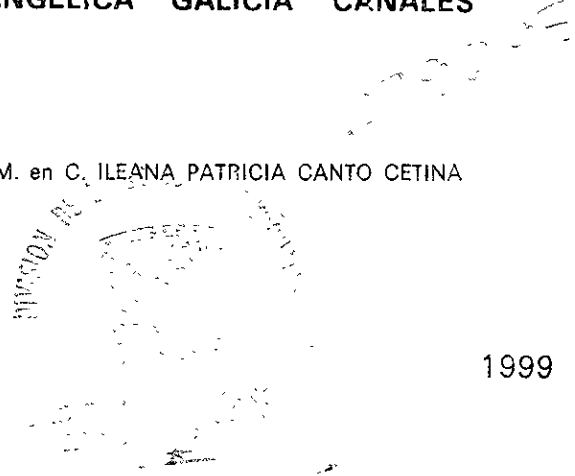


DIRECTORA: M. en C. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO  
Jefa de la División de Estudios Profesionales  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Estudio molecular del gen SRY en pacientes con diagnóstico de  
Disgenesia gonadal mixta y diagnóstico de Anorquia.

realizado por NORMA ANGELICA GALICIA CANALES

Con número de cuenta 9205061-9 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de tesis M. en C. Ileana Patricia Canto Cetina *Ileana Patricia Canto Cetina*  
Propietario

Propietario M. en C. Carolina Barrientos Salcedo *Carolina Barrientos Salcedo*

Propietario Dra. Ma Elena Calderón Segura *Ma Elena Calderón Segura*

Suplente M. en C. Héctor Martín Abundis Manzano *Héctor Martín Abundis Manzano*

Suplente Biól. David Garcíadiego Cázares *David Garcíadiego Cázares*

*Edna María Suárez Díaz*

Consejo Departamental de Biología  
Dra. Edna María Suárez Díaz

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, Hospital de Pediatría, C. M. N. Siglo XXI, I.M.S.S. bajo la dirección de la M. en C. Ileana Patricia Canto Cetina.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la M. en C. Ileana Patricia Canto Cetina por sus enseñanzas, profesionalismo, paciencia, asesoría y por llevar a cabo este trabajo.*

*Al Dr. Juan Pablo Méndez Blanco por su apoyo brindado para la realización de dicha tesis.*

*A la Dra. Daniela Söderlund y Biol. Elsa de la Chesnaye por su ayuda técnica y sus sugerencias.*

*A la Dra. Gloria Soldevila M. y al Dr. Eduardo García Zepeda por su amistad, sus consejos y su invaluable apoyo.*

*A los miembros del jurado por su disposición para la revisión y comentarios a este trabajo.*

*A la Facultad de Ciencias, UNAM por mi formación académica.*

*Al Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S por las facilidades del uso de sus instalaciones así como el apoyo brindado.*

## **DEDICATORIAS**

*A mis padres Concepción Canales y Tomás Galicia por el cariño y comprensión que me han brindado por ser un ejemplo de tenacidad y fortaleza en todo momento, por permanecer siempre a mi lado y por haberme dado una educación que constituye la mejor herencia que pudieron darme.*

*A mis hermanas Rosa Isela, Paola y Alejandra por todo lo que hemos compartido, por su cariño y porque sus caminos estén llenos de triunfos y siempre estemos unidas.*

*A mi abuelito Bernabé Canales, a mis tías y a todos mis familiares por haberme brindado su apoyo.*

*A mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias.*

## ABREVIATURAS

aa:	Aminoácidos.
DG:	Disgenesia gonadal.
DGP:	Disgenesia gonadal pura
DGM:	Disgenesia gonadal mixta.
DHT:	Dihidrotestosterona.
FDT:	Factor determinante testicular.
HIM:	Hormona inhibidora de estructuras Mülllerianas.
HMG:	Proteínas de alta movilidad.
Kb:	Kilobases.
pb:	Pares de bases.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
Sry:	Gen determinante del sexo del cromosoma Y Murino.
SRY:	Gen humano determinante del sexo del cromosoma Y.
T:	Testosterona

# INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
La Diferenciación Sexual	1
Alteraciones en la Diferenciación Sexual	11
Disgenesia gonadal mixta	11
Anorquia	13
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
III. OBJETIVO	17
IV. HIPÓTESIS	17
V. SUJETOS Y MÉTODOS	18
Sujetos	18
Extracción de ADN de sangre periférica	22
Síntesis de Oligonucleotidos	25
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	25
Secuenciación Automática	28
VI. RESULTADOS	31
VII. DISCUSION	35
VIII. CONCLUSIONES	39
IX. REFERENCIAS	40



## I. INTRODUCCIÓN

### LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

La diferenciación sexual es 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 el resultado de una secuencia de procesos que ocurren en las etapas más tempranas de la vida, requiriendo un alto grado de precisión en sus mecanismos de regulación. Este se lleva a cabo en tres etapas sucesivas: 1) cromosómica, 2) gonadal y 3) fenotípica (Ohno, 1967; Kofman-Alfaro *et al.*, 1982).

La diferenciación cromosómica se inicia con la fertilización, al momento 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 (Ohno, 1967). La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada temprana, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma de un individuo (Jacobs y Ross, 1966; Goodfellow y Darling, 1988).

En 1990 Sinclair *et al.*, identificaron al gen específico que induce la diferenciación de la gónada indiferenciada hacia testículo, denominándosele gen determinante del sexo del cromosoma Y (*SRY*). Para ello, se utilizaron diversas sondas generadas de una región cromosómica, compuesta por 35 kilobases (Kb) de ADN adyacente a la región pseudoautosómica (Figura 1).

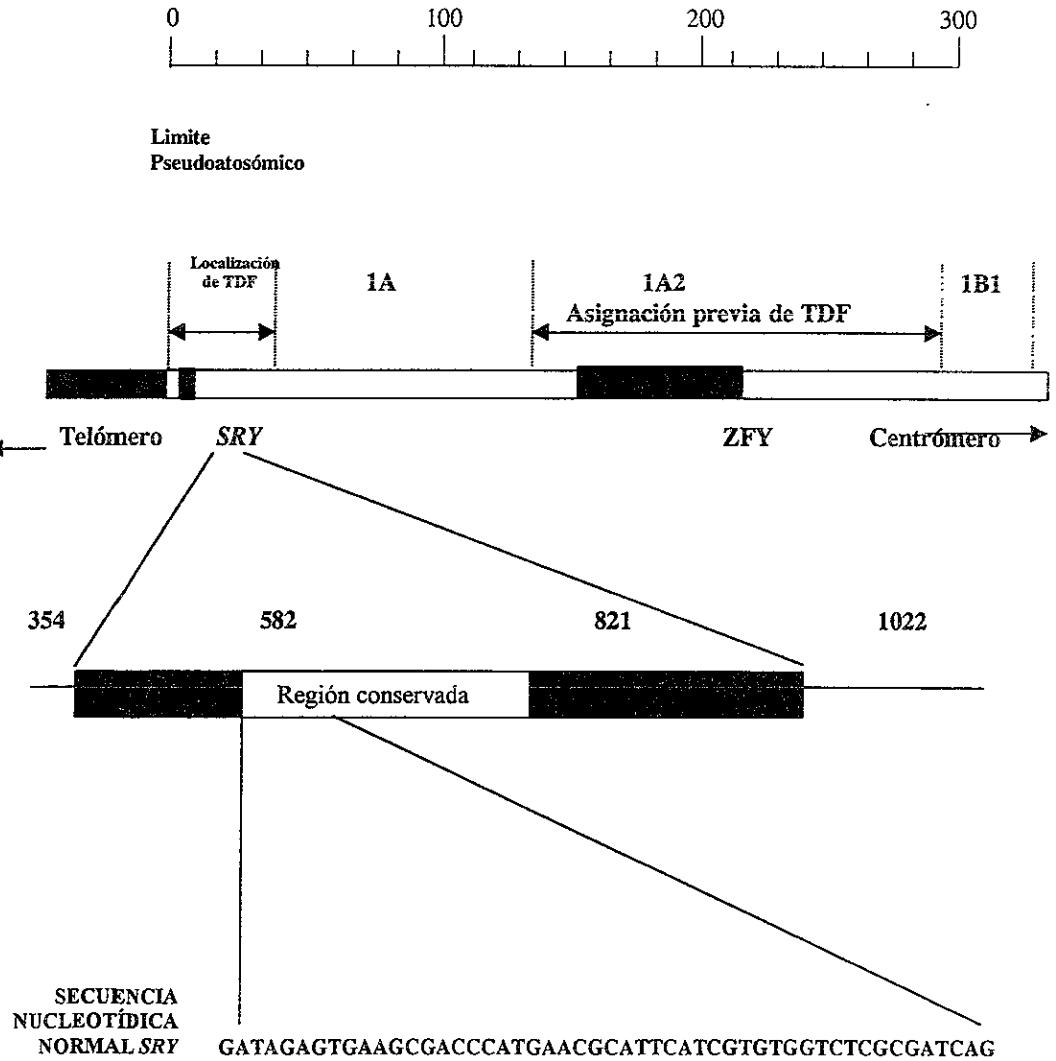


Figura 1. Diagrama de la región determinante del sexo en el cromosoma Y.

Los resultados demostraron una banda de 2.1 Kb sexo-específica que se encontraba conservada en todas las especies de animales analizadas. 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 a dos proteínas, una de 99 y otra de 223 aminoácidos (aa), respectivamente. El marco de lectura de 99 aa no indicó homología con ninguna proteína; sin embargo, si se encontró homología del polipéptido mayor con la proteína Mc codificada por el gen mat-3M de *Schizosaccharomyces pombe*, al igual que con una región conservada con capacidad de unión al ADN, presente en proteínas no histónicas de las familias HMG1 y HMG2 (grupo de alta movilidad). A esta región de unión al ADN conservado se le ha denominado caja o dominio HMG y consiste alrededor de 80 aa, que apoya su función en la regulación génica propuesta para este gen. Por medio del uso de la sonda pY53.3, se clonó y se describió el homólogo murino del *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 (Gubbay *et al.*, 1990).

El gen humano *SRY* presenta una estructura muy sencilla está formado por un solo 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. La localización nuclear depende de la integridad de señales específicas de la caja HMG, motivo por el cual esta caja es una parte fundamental de la proteína *SRY* (Su H y Lau, 1993; Dubin y Oster, 1994; Poulat *et al.*, 1995). 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.

También, se han identificado tanto en la región 5' como en la 3' no traducida la presencia de segmentos ricos en A-T (Su H y Lau, 1993).

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° (Ferrari *et al.*, 1992; Harley *et al.*, 1992; Van de Wetering y Clavers, 1992; Werner *et al.*, 1995; Tang y Nilsson, 1998). Esta alteración en la estructura del ADN, sugiere que dicha proteína podría participar 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 (Nash, 1990; Grosschedl *et al.*, 1994; Werner *et al.*, 1996).

El dominio de unión al ADN de la proteína SRY reconoce de manera específica y con gran afinidad a los elementos promotores de los genes de la hormona inhibidora de las estructuras Mülllerianas (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 (Haqq *et al.*, 1993; Haqq *et al.*, 1994).

Aún no se ha podido establecer el momento preciso en el que las estirpes celulares gonadales se diferencian para el desarrollo femenino o masculino.

Sin embargo, se ha sugerido que la determinación sexual empieza cuando el *SRY* se expresa por primera vez (Bogan y Page, 1994). El patrón de expresión del gen *SRY* aparece principalmente en la cresta genital, en el período que corresponde a la formación del testículo, es decir, en la sexta semana de edad gestacional en el humano y entre 10.5

y 12.5 días poscoito en el ratón (Koopman *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991; Hacker *et al.*, 1995). En la actualidad los estudios sobre los transcritos de *SRY* son escasos y han aportado poca información debido a las limitantes para realizarlos (Zwingman *et al.*, 1993).

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 la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el RNA gonadal a los 13.5 días poscoito (Koopman *et al.*, 1990), aunque se desconoce con precisión hasta cuando persiste la proteína *SRY* u otras proteínas implicadas en el proceso (Bogan y Page, 1994). Todos los estudios de expresión de este gen en el ratón y en el humano se han realizado a nivel de transcripción y no de traducción, debido a que la proteína se encuentra en bajas concentraciones para ser detectada por anticuerpos específicos (Hawkins, 1993).

Existen diversas evidencias en la literatura que confirman que el gen *SRY* es el factor determinante testicular (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 (Sinclair *et al.*, 1990) y en el hombre (López *et al.*, 1995b); 2) En ciertas disgenesias gonadales puras XY (padecimiento en el cual los testículos se encuentran sustituidos por estrías gonadales) se presentan mutaciones en el gen *SRY* (Berta *et al.*, 1990; Jäger *et al.*, 1990; Hawkins *et al.*, 1992a; Hawkins *et al.*, 1992b; Jäger *et al.*, 1992; McElreavey *et al.*, 1992a; McElreavey *et al.*, 1992b; Müller *et al.*, 1992; Affara *et al.*, 1993; Zeng *et al.*, 1993; Lida *et al.*, 1994; Poulat *et al.*, 1994; Tajima *et al.*, 1994; Barbosa *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1995; Schmith-Ney *et al.*, 1995; Bilbao *et al.*, 1996; Kwok *et al.*, 1996; McElreavey *et al.*, 1996; Battiloro *et al.*, 1997;

Hines *et al.*, 1997; Veitia *et al.*, 1997; Cameron *et al.*, 1998; Domenice *et al.*, 1998; Poulat *et al.*, 1998). 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 (Pontiggia *et al.*, 1994; Werner *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1995; Cameron y Sinclair, 1997; Capel, 1998); 3) En el ratón la expresión del gen *Sry* se correlaciona con el inicio de la determinación testicular (Koopman *et al.*, 1990); 4) La inserción de un fragmento de ADN de 14 Kb que incluye al gen *Sry* a ratones transgénicos XX, puede inducir la diferenciación testicular (Koopman *et al.*, 1991); y 5) Es un gen evolutivamente conservado en el cromosoma Y de mamíferos metaterios y euterios (Sinclair *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 1992).

A pesar de que la evidencia a favor del *SRY* como factor determinante testicular es sólida, la observación de que algunas alteraciones de la diferenciación sexual no están ligadas al cromosoma Y, ha llevado a proponer que otros genes, autosómicos y/o ligados al cromosoma X, participan en la gonadogénesis (Eicher *et al.*, 1993), como se ha observado en el síndrome de varón XX y en el hermafroditismo verdadero 46,XX, en los cuales existe desarrollo testicular en ausencia del gen *SRY*. Con base en lo anterior, se ha propuesto la existencia de diversos genes que intervienen en el desarrollo gonadal constituyéndose como componentes de una cascada génica responsable de los programas de morfogénesis y diferenciación gonadal (Pelletier *et al.*, 1991; Eicher *et al.*, 1993; Bennett *et al.*, 1993; Bogan y Page, 1994; Bardoni *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; López *et al.*, 1995a; López *et al.*, 1995b; Foster *et al.*, 1996; Ogata y Matsuo, 1996; Torres *et al.*, 1996; Wirth *et al.*, 1996) (Figura 2).

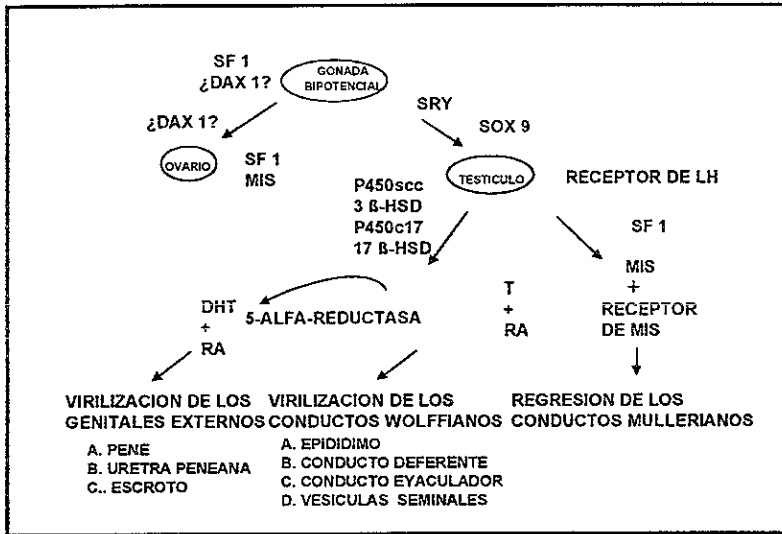


Figura 2. Cascada genética que participan en el desarrollo gonadal.

En el humano el dimorfismo sexual gonadal se inicia en la sexta semana de la vida intrauterina (Jirásek, 1971; Kofman-Alfaro *et al.*, 1982). Desde el punto de vista embriológico, la gónada indiferenciada se forma por dos tipos de células: las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales, que por su diferenciación temprana pueden considerarse de origen autónomo (McKay, 1953).

La gónada indiferenciada se transformará en testículo si es que existe la presencia y la acción del factor determinante testicular (FDT) localizado en el cromosoma Y (Sinclair *et al.*, 1990; López *et al.*, 1995a).

En ausencia del gen determinante testicular, el primordio gonadal posee una tendencia inherente a desarrollarse como ovario siempre y cuando existan células germinales, ya que en caso contrario se formarán estrías fibrosas incapaces de producir hormonas sexuales femeninas durante la pubertad (Merchant *et al.*, 1984; George, 1992a; George, 1992b; Grumbach y Conte, 1992).

La formación de los fenotipos masculino o femenino está dada por la acción de las hormonas sintetizadas por cada una de las gónadas específicas. El mecanismo que induce este dimorfismo en los mamíferos fue descrito originalmente por Jost *et al.*, (1953; 1973) quienes demostraron, que al diferenciarse la gónada indiferenciada hacia testículo, su producción hormonal estimula al desarrollo del fenotipo masculino; en cambio, si la diferenciación gonadal es hacia ovario, el fenotipo, aparentemente de manera pasiva, será femenino. La ausencia temprana de gónadas fetales también da un fenotipo femenino, lo cual apoya el concepto de la inactividad endocrina del ovario fetal (Grumbach y Conte, 1992).

Las estructuras primordiales del tracto genital que dan origen a los genitales internos, incluyen dos sistemas de conductos que se encuentran presentes en los embriones de ambos sexos: los conductos Wolffianos (mesonéfricos) y los conductos Müllerianos (paramesonéfricos). Los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamiento labioescrotales) (Jirásek, 1967).

El desarrollo del fenotipo masculino está dado 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 hormona inhibidora de estructuras Müllerianas (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 décimo primera con la desaparición de estas estructuras (Grumbach y Conte, 1992). Inmediatamente después, de iniciar la síntesis de la HIM, las células intersticiales del testículo fetal se diferencian en células de Leydig. Estas servirán como sustrato anatómico para la síntesis y secreción de testosterona (T) que es la segunda hormona fetal virilizante. El efecto virilizante de la T se ejerce sobre los conductos Wolffianos que se diferenciarán 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 de acetato y colesterol como intermediario (Serrat *et al.*, 1979); de forma similar se observa en el testículo de un individuo adulto (Savard, 1956). La síntesis de Testosterona a partir de colesterol requiere de la presencia de diversos sistemas enzimáticos, que poseen regulación génica autosómica independiente.

La Testosterona es el precursor de la tercera hormona fetal virilizante la dihidrotestosterona (DHT). Esta se forma en las células blanco por la acción de la  $5\alpha$ -reductasa extragonadal y es la mediadora intracelular de la gran mayoría de las acciones de los andrógenos. Durante la embriogénesis, la DHT es la única responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata (Wilson, 1975; Griffin y Wilson, 1989; Imperato *et al.*, 1994).

La T se une a dos proteínas: a la globulina transportadora de testosterona (SHBG) y a la albúmina (Pardringe, 1986). El paso libre de la Testosterona hacia las células no es dependiente de energía y está dado por un fenómeno de difusión pasiva dado su carácter lipídico (Lasznitzki *et al.*, 1974). Tanto la T como la DHT se unen con la misma afinidad

a los receptores de proteínas. El complejo andrógeno-receptor sufre una reacción de transformación que promueve su unión al ADN. El complejo testosterona-receptor es el responsable de la regulación de la secreción de la hormona luteinizante mediante el eje hipotálamo-hipófisis, así como de la virilización de los conductos Wolffianos en la gestación.

Durante la embriogénesis el ovario no secreta HIM, ni testosterona. La ausencia de estas dos hormonas da lugar a la persistencia de los conductos Mülllerianos los cuales se diferencian a los genitales internos femeninos y a la regresión de los conductos Wolffianos (Grumbach y Conte, 1992).

## ALTERACIONES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Las alteraciones en cualquier estadio de la diferenciación sexual durante la embriogénesis conducen a la presencia de malformaciones en el desarrollo sexual. Estas se clasifican de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se presentan, como son: las alteraciones del sexo cromosómico, del sexo gonadal y del sexo fenotípico (Grumbach y Conte, 1992). Dentro de las alteraciones en la traducción del sexo cromosómico al sexo gonadal, se encuentran la disgenesia gonadal mixta (DGM), la disgenesia gonadal pura (DGP) 46,XX y 46,XY, el hermafroditismo verdadero, el síndrome de varón XX y la Anorquia congénita (Sohval, 1965; Rajfer y Walsh, 1981; Kofman-Alfaro *et al.*, 1989; Berkovitz *et al.*, 1991; Kofman-Alfaro *et al.*, 1992; López. *et al.*, 1998).

### DISGENESIA GONADAL MIXTA

La disgenesia gonadal mixta es un estado intersexual que Sohval en 1964, Davidof y Federman en 1973 y Zah *et al.*, en 1975 clasificaron con base en las características morfológicas gonadales: Testículo de un lado y la existencia de una estría contralateral. Asimismo, la presencia de un testículo con un tumor contralateral (generalmente gonadoblastoma) y de un testículo con ausencia gonadal contralateral han sido clasificadas como variantes de esta entidad patológica (Bergadá *et al.*, 1994). 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 cinco o más tejidos (Méndez *et al.*, 1993). La presencia de un complemento cromosómico, no determina siempre un mismo tipo de gónada. Inicialmente, se propuso que la DGM tiene su origen en el

mosaico cromosómico existente; esto es, al haber dos líneas celulares diferentes (45,X/46,XY) se originarían dos gónadas diferentes (una estría por la línea celular 45,X y un testículo por la presencia de la línea celular 46,XY) (Bergadá *et al.*, 1994). Sin embargo, se ha observado que en la mayoría de los casos las dos 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 (Méndez *et al.*, 1993). Estos hallazgos tampoco constituyen una regla, ya que en algunos individuos estudiados que presentaban una estría y un testículo, tenían solamente una línea 46,XY en ambas gónadas (Bergadá *et al.*, 1994); individuos que formaron un ovario 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 (Bengtsson *et al.*, 1974; Mailhes *et al.*, 1979; Méndez *et al.*, 1993; Sugarman *et al.*, 1994).

En los casos reportados con DGM, la ambigüedad de los genitales externos es extremadamente variable y los fenotipos ampliamente heterogéneos. En todos los casos siempre hay persistencia de estructuras Mülllerianas. Además de la ambigüedad genital, estos pacientes presentan estigmas turnerianos y ocasionalmente anomalías cardiovasculares y renales asociadas. El sexo de asignación variará de acuerdo a las condiciones particulares de los genitales externos de cada caso (Méndez *et al.*, 1993). Los sujetos con DGM presentan una alta frecuencia a desarrollar gonadoblastomas o disgerminomas en sus gónadas (Scully, 1970; Page, 1987; Sadi *et al.*, 1996).

## ANORQUÍA CONGÉNITA

Los sujetos con anorquía congénita bilateral o agenésia testicular bilateral se caracterizan por presentar un cariotipo 46,XY, un fenotipo y genitales internos masculinos y completa ausencia de tejido testicular (Aynsley-Green *et al.*, 1976; Josso *et al.*, 1980; Grumbach y Conte, 1992; Ferrández *et al.*, 1994). Esta pérdida de tejido testicular se presenta después de la décimo cuarta semana de edad gestacional, posterior a la etapa crítica de la diferenciación sexual masculina, es por ello, que estos sujetos presentan un fenotipo masculino sin ambigüedad genital (Lustig *et al.*, 1987; Grumbach y Conte, 1992). La incidencia de la anorquía congénita es de 1 en 20,000 hombres nacidos (Bobrow-Gash *et al.*, 1970); se han descrito tanto formas esporádicas como familiares (esta última se hereda en forma autosómica o ligada al cromosoma X) (Grumbach y Conte, 1992; Mc Grillivray y McGrillivray. 1990).

Hasta el momento, no se ha determinado con precisión la etiología de la anorquía congénita; se ha postulado que puede ser secundaria a un compromiso vascular debido a una torsión del testículo fetal, lo que conduce a la destrucción del testículo *in utero* (Huff *et al.*, 1991); también existen evidencias que la anorquía congénita puede ser secundaria a una endocrinopatía (alteración endocrina) (Hadziselinovic y Herzog, 1987); o bien, que esta patología sea secundaria a la presencia de mutaciones en los genes que intervienen en la cascada de la diferenciación sexual, como es el gen *SRY* (Lobbacaro *et al.*, 1993).

El diagnóstico de los pacientes con anorquía congénita se sospecha en aquellos individuos que presentan hipogonadismo hipergonadotrópico (alteración primaria gonadal con un aumento secundario de gonadotropinas) con ausencia de respuesta en términos de testosterona a la prueba de estimulación con gonadotropina coriónica humana (hCG).

El diagnóstico de certeza se lleva a cabo mediante la laparoscopia exploradora, en la cual no se demuestra la presencia de tejido testicular (Levitt *et al.*, 1978a; Levitt *et al.*, 1978b; Lobbacaro *et al.*, 1993; Naaslung *et al.*, 1989)

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se encuentra referido en los antecedentes, en la mayoría de los individuos con DGM presentan un mosaico como complemento cromosómico (45,X/46,XY). En estos sujetos se puede formar una estría y una gónada contralateral (generalmente testículo); como consecuencia de esto, se desarrollarán diferentes fenotipos que van desde aquellos totalmente femeninos hasta aquellos en los cuales existe un grado de virilización importante. Sin embargo, hay que remarcar que la presencia de una determinada línea celular no induce siempre la formación de una misma gónada, ya que se presentan variantes en estos casos. En lo que respecta a los sujetos con anorquia congénita, estos individuos a diferencia de los sujetos con DGM, presentan una sola línea celular (46,XY) y un fenotipo masculino con ausencia de tejido testicular. Actualmente no se ha determinado con precisión cual o cuales son las causas que dan origen a una gónada o la ausencia de la misma y consecuentemente a un fenotipo determinado en estas alteraciones específicas de la diferenciación sexual. Asimismo, no se han descrito mutaciones en ninguno de los genes que participan en la cascada de la diferenciación sexual; A diferencia de lo descrito en pacientes con DGP, en los cuales se han reportado diversas mutaciones en el gen *SRY*, que dan origen a esta alteración de la diferenciación sexual (McElreavey *et al.*, 1992a; Müller *et al.*, 1992; Pérez-Palacios *et al.*, 1994).

Con base en los hallazgos previamente descritos y que el gen *SRY* es el gen determinante testicular, consideramos de relevancia el llevar a cabo el estudio detallado de su secuencia nucleotídica, en leucocitos de sangre periférica en pacientes con las patologías antes citadas, con el fin de precisar si existen o no mutaciones del *SRY*, y de existir éstas, que tipo de mutaciones específicas son las que dan origen a las distintas gónadas y fenotipos observados en estas patologías. Por medio de éllo, se coadyuvará a precisar los mecanismos íntimos involucrados en la traducción del sexo cromosómico al sexo gonadal en el humano.



### **III. OBJETIVO**

Estudiar la secuencia del gen *SRY* en leucocitos de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta y con diagnóstico de anorquia congénita.

### **IV. HIPÓTESIS**

En los pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta y con diagnóstico de anorquia congénita, existen alteraciones en la secuencia del gen *SRY* que están involucradas en la génesis de dichas patologías.

### **III. OBJETIVO**

Estudiar la secuencia del gen *SRY* en leucocitos de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta y con diagnóstico de anorquia congénita.

### **IV. HIPÓTESIS**

En los pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta y con diagnóstico de anorquia congénita, existen alteraciones en la secuencia del gen *SRY* que están involucradas en la génesis de dichas patologías.

## V. SUJETOS Y MÉTODOS

### Sujetos

Se incluyeron a tres pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta y a dos pacientes con diagnóstico de anorquia congénita. Todos los sujetos que se incluyeron en este estudio son de origen étnico mestizo mexicano y pertenecían a familias diferentes. Las características clínicas individuales de cada uno de los pacientes se observan en las tablas 1 y 2. El sexo de asignación en dos pacientes con DGM (DGM 2 y DGM 3) fue femenino, mientras que en el sujeto con DGM 1 y en los dos pacientes con diagnóstico de anorquia congénita (A1 y A2) el sexo de asignación fue masculino.

El estudio histopatológico llevado a cabo en los tres pacientes con DGM demostró la presencia de estría unilateral con testículo contralateral. Con respecto a los pacientes con anorquia congénita, el estudio histopatológico no demostró la presencia de tejido testicular.

En la Tabla 3 se puede observar el cariotipo de leucocitos de sangre periférica de los pacientes con DGM. El análisis citogenético demostró que en los tres pacientes con DGM presentaron un mosaico como complemento cromosómico: 45,X/46,XY. En los pacientes DGM 1 y DGM 2 el estudio reveló un predominio de la línea celular 45,X, mientras que en el paciente DGM 3 se observó un predominio de la línea celular 46,XY.

El análisis cromosómico en leucocitos de sangre periférica de los dos pacientes con diagnóstico de anorquia congénita demostró un complemento cromosómico 46,XY en todas las metafases estudiadas (Tabla 3).

TABLA 1

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE TRES PACIENTES CON DGM

PACIENTE	EDAD (años)	SEXO DE ASIGNACION	GENITALES EXTERNOS	GENITALES INTERNOS	GONADA DERECHA	GONADA IZQUIERDA
DGM 1	10/12	M	FALO=2.5 cm HIOSPADIA PERINEOESCROTAL	UTERO, TROMPAS BILATERALES Y EPIDIDIMO IZQUIERDO	ESTRÍA	TESTÍCULO
DGM 2	12	F	FALO=6.0 cm HIOSPADIA PERINEOESCROTAL	UTERO, TROMPA EPIDIDIMO IZQUIERDO	TESTÍCULO	ESTRÍA
DGM 3	18	F	FALO=3.0 cm HIOSPADIA PERINEOESCROTAL	UTERO Y TROMPA IZQUIERDA	TESTÍCULO	ESTRÍA

DGM = Disgenesia gonadal mixta

TABLA 2

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE DOS PACIENTES CON ANORQUÍA CONGÉNITA

PACIENTE	EDAD (años)	SEXO DE ASIGNACIÓN	GENTALES EXTERNOS	GENTALES INTERNOS	GONADA DERECHA	GONADA IZQUIERDA
A 1	1.12/12	M	FALO=9 cm	CONDUCTOS DEFERENTES Y CORDÓN ESPERMÁTICO DERECHO	N. D.	N. D.
A 2	18/12	M	FALO=5.5 cm	CONDUCTOS DEFERENTES	N. D.	N. D.

A = Anorquía congénita.

N. D. = El estudio histopatológico no demostró tejido testicular.

TABLA 3

CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS DE PACIENTES CON DGM Y CON ANORQUÍA CONGÉNITA

PACIENTE	CARIOTIPO EN SANGRE PERIFÉRICA
DGM 1	45,X (65 %) 46,XY (35 %)
DGM 2	45,X (98 %) 49,XY (2 %)
DGM 3	45,X (24 %) 46,XY (76 %)
A 1	46,XY (100 %)
A 2	46,XY (100 %)

DGM = Disgenesia gonadal mixta

A = Anorquía congénita

### Extracción de ADN de leucocitos de sangre periférica

Se extrajo 10 ml de sangre periférica para la obtención del ADN genómico de los pacientes como de los controles masculinos normales se siguió la metodología descrita por John *et al.*, en 1991. La sangre se depositó en tubos de 50 ml que contenía 200  $\mu$ l de etilen diamino tetra acetato (EDTA de Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) 0.5 M, pH 8.0, como anticoagulante. Se colocaron las muestras en hielo y se agregaron 25 ml de sacarosa tritón 2X (Sacarosa 0.64 M, Trizma-base 0.02 M,  $MgCl_2$  0.01 M y Tritón 100X al 2 % de Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) y 15 ml de agua desionizada ( $ddH_2O$ ). Los leucocitos se separaron por centrifugación (240 g/15 min/4°C) y se decantó el sobrenadante hasta que se obtuvo un botón nuclear. Para la lisis de los leucocitos y la desproteínización, se añadieron 3 ml de amortiguador de lisis nuclear, pH 8.2, (Trizma-base 10 mM, NaCl 400 mM y  $Na_2EDTA$  10 mM de Sigma Chemicals Co. St. Louis Mo.), 108  $\mu$ l de dodecíl sulfato sódico (SDS de Sigma Chemicals Co. St. Louis Mo.) al 20 % y 100  $\mu$ l de Proteinasa K [20 mg/ml]. Se dejó incubar esta reacción por 14 hrs a 37°C. Se adicionó 1 ml de NaCl saturado y se centrifugó a 240 g/15 min/4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos de 15 ml y el ADN se precipitó con dos y medio volúmenes de etanol absoluto frío; posteriormente se lavó en etanol frío al 70 %. El ADN se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en 200  $\mu$ l de  $ddH_2O$  y se almacenó a -20°C para su análisis posterior (Figura 3).

En todas las muestras obtenidas, 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 nm, nos indica 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:

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

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

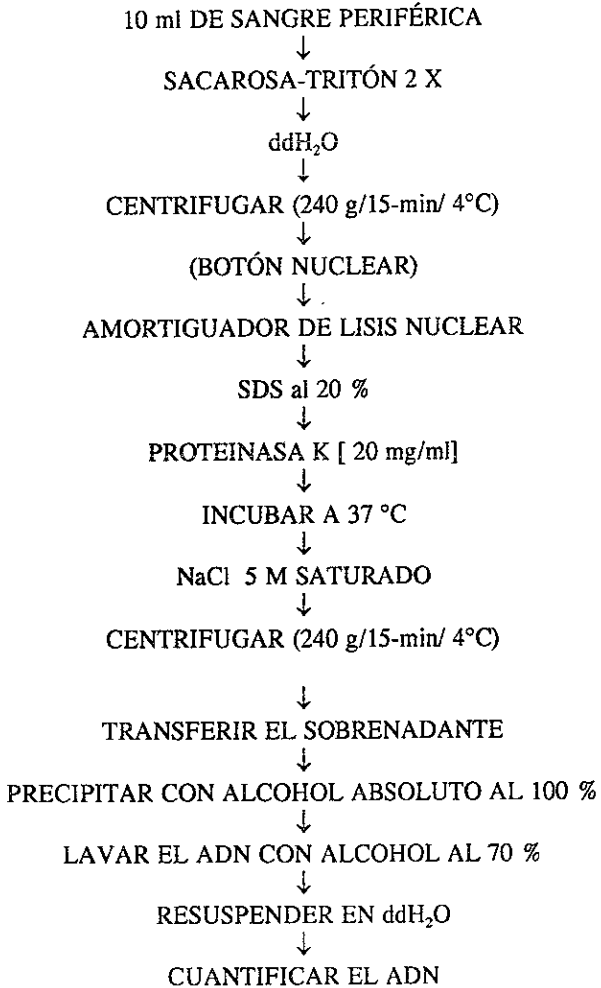
Para conocer la integridad de las muestras se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %.

Todas las muestras obtenidas presentaron una relación 260/280 entre 1.8 y 2.0, lo que indicó que se encontraban libres de proteínas y sales.



**FIGURA 3**

**EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE PERIFÉRICA**



### **Síntesis de Oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos específicos derivados de la secuencia del exón del gen del *SRY* fueron adquiridos de una casa comercial (Accesolab) y cada uno de ellos fue llevado a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (se mencionarán más adelante). Asimismo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % con el fin de determinar que no hubieran oligonucleótidos adicionales.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para llevar a cabo la técnica de PCR, se emplearon los oligonucleótidos sintéticos (se mencionarán más adelante), derivados de la secuencia del gen *SRY* (Affara *et al.*, 1993). En todos los casos se preparó una reacción estándar de 50  $\mu\text{l}$  siguiendo la técnica descrita por Sambrook *et al.*, en 1989 que contenía: 0.3  $\mu\text{g}$  de ADN genómico, oligonucleótidos en dirección 5' y 3' a una concentración final de 0.5  $\mu\text{M}$ , desoxirribonucleótidos trifosfatados a una concentración final de 80  $\mu\text{M}$ , dimetil sulfóxido al 3 %, amortiguador 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM y  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM) a una concentración final de 1X, Taq DNA polimerasa 2 U (Perkin Elmer, New Jersey, USA) y ddH<sub>2</sub>O (Figura 2). 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 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.

Los oligonucleótidos XES 10/XES 11 amplificaron un fragmento de 774 pb el cual abarcó el exón completo y parte de la región 5' y 3' no traducida. El análisis de los productos de PCR obtenidos de leucocitos de sangre periférica, se lleva a cabo en un gel de agarosa (Boehringer Mannheim, GmbH Germany) al 1.2 %, teñidos con bromuro de etidio (..Gibco BRL., Gaithersburg, MD, Scotland) al 0.0002 %, directamente visualizados por una lámpara de rayos ultravioleta y fotografiados utilizando un film Polaroid. Para todos los geles de agarosa se utilizó una escalera de 100 pb como marcador de peso molecular (Gibco, BRL., Gaithersburg, MD, Scotland), un control positivo masculino y un control negativo (la reacción de PCR sin ADN) (Figura 4).

Secuencia de los oligonucleótidos en dirección 5' → 3' que se utilizaron en el estudio del gen *SRY*:

XES 10: 5' GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG C 3'

XES 11: 5' GTA GCC AAT GTT ACC CGA TTG TC 3'

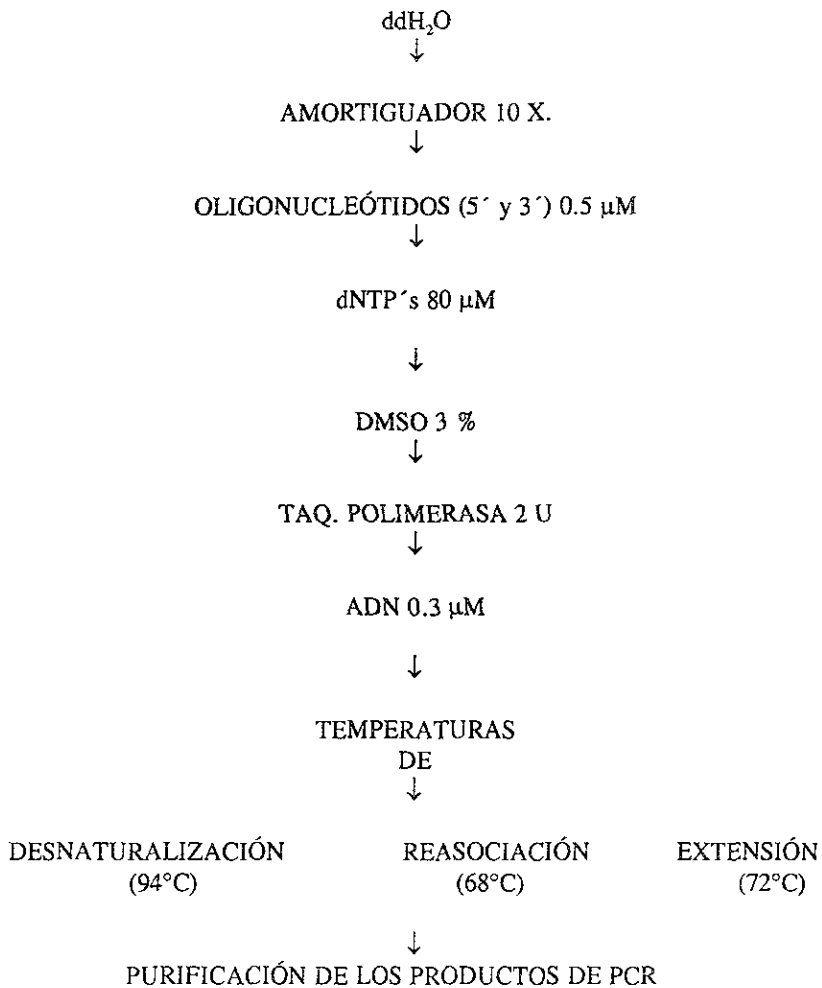
SRY 6: 5' GTGGTCTCGCGATCAGA 3'

SRY 8: 5' TAGAGCCATCTTGCGCCT 3'

Los oligonucleótidos *SRY* 6 (dirección 5' iniciando en el nucleótido (nt) 2,283) y *SRY* 8 (dirección 3' iniciando en el nt 2,315) se emplearon exclusivamente para la secuenciación.

FIGURA 4

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA  
(PCR)



## Secuenciación Automática

Las reacciones de secuenciación se realizaron mediante un estuche de Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer, New Jersey, USA), el cual se basa en el método descrito por Sanger *et al.*, en 1977 con algunas modificaciones (Figura 5). Previa a la secuenciación, las muestras de ADN amplificadas se purificaron con un estuche de GeneClean II (Bio 101, Inc., Vista, CA., USA). 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). El ADN se lavó con una solución salina/etanol para eliminar las impurezas y finalmente se resuspendió en ddH<sub>2</sub>O; posteriormente, se llevó a cabo la secuenciación automática. En tubos de microcentrifuga 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. Se añadió a esta reacción de mezcla 0.35 µg de ADN genómico y ddH<sub>2</sub>O para 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 se resuspendieron en un 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 10 X, 16.87 ml ddH<sub>2</sub>O, 250 µl de persulfato de amonio (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) al 10 % y 28 µl de N, N, N', N'-tetrametiletenodiamina. Se aplicaron 4 µl por carril y se analizaron las mismas en el secuenciador automático Applied Biosystem 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, New Jersey, USA).

### FIGURA 3

#### SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

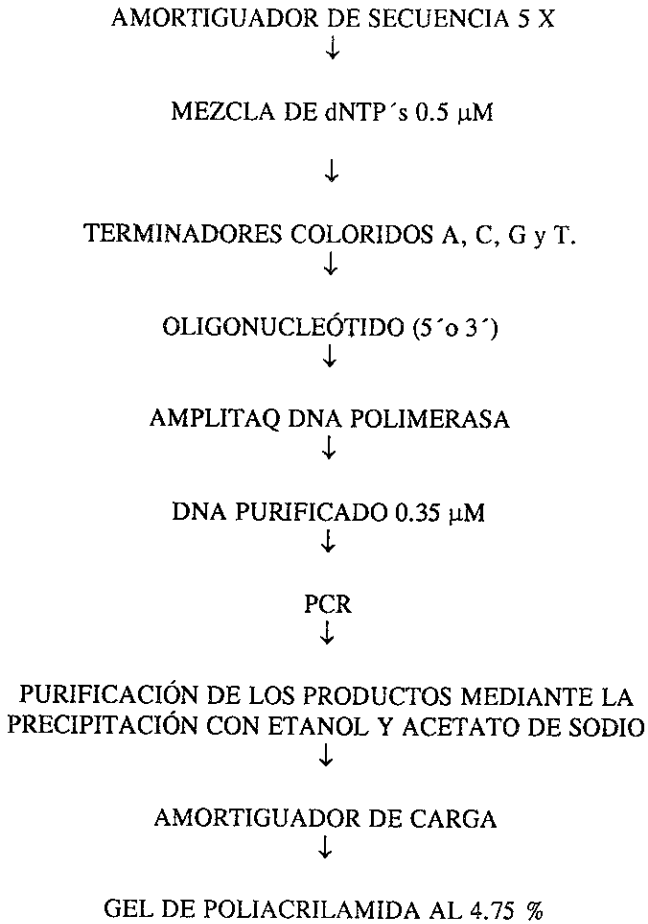
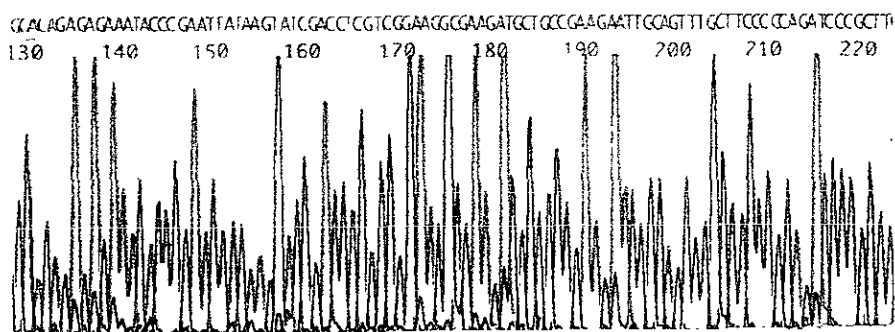
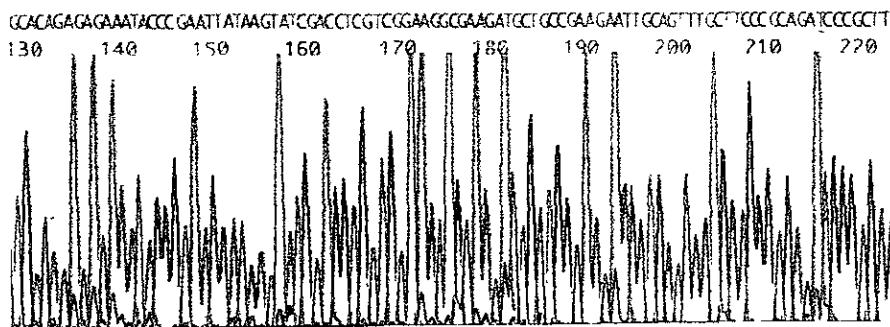


FIGURA 7



A



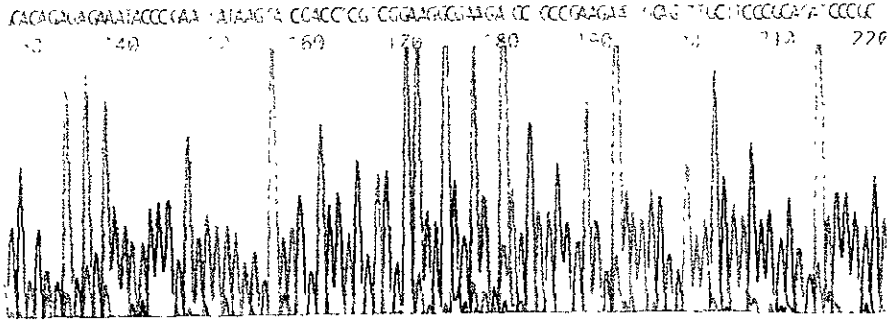
B

Secuenciación parcial del exón del gen *SRY*, del aminoácido 118 al 148.

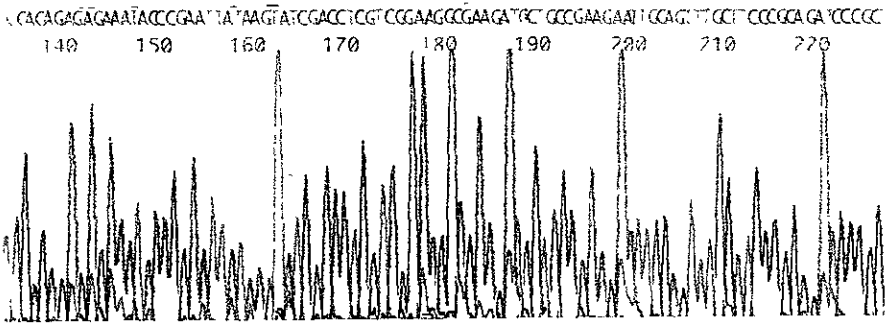
Se observa que el paciente con DGM (B) presenta la misma secuencia que el control (A).



FIGURA 8



A



B

Secuenciación parcial del exón del gen *SRY*, del aminoácido 118 al 148.

Se observa que el paciente con Anorquia congénita (B) presenta la misma secuencia que el control (A).

## VII. DISCUSIÓN

Se llevó a cabo el estudio molecular en tres pacientes con DGM, así como en dos pacientes con diagnóstico de anorquia congénita.

La diferenciación sexual masculina involucra una cascada de eventos iniciada por la presencia y acción del gen *SRY*. Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma Y, adyacente a la región pseudoautosómica y es el responsable de la diferenciación de la gónada temprana hacia testículo. Se han reportado diversas mutaciones en este gen, que pueden ser en sentido erróneo, sin sentido, cambios en el marco de lectura y deleciones; dichas mutaciones impiden la diferenciación de la gónada indiferenciada hacia testículo y dan lugar a reversión sexual masculina completa o parcial (Cameron y Sinclair, 1997).

Con la caracterización del gen *SRY* como el FDT (Sinclair *et al.*, 1990), se han llevado a cabo estudios moleculares de este gen para explicar 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 llevado a cabo dichos estudios es la disgenesia gonadal (DG) 46,XY; éstos, han demostrado que la presencia de mutaciones en el gen *SRY* pueden dar lugar a esta entidad patológica. La mayoría de estas mutaciones se encuentran en la caja HMG y alteran la función de la proteína *SRY*, interfiriendo con el proceso de unión o doblamiento de la proteína al ADN o alterando su interacción con otros factores de transcripción (Cameron y Sinclair, 1997). Asimismo, se han reportado en sujetos con DG así como también en mujeres 46,XY con función ovárica parcial, mutaciones fuera de la caja HMG (McElreavey *et al.*, 1992; Tajima *et al.*, 1994; Kwok *et al.*, 1996; McElreavey *et al.*, 1996; Veitia *et al.*, 1997; Domenice *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1998; Poulat *et al.*, 1998).

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* (Berta *et al.*, 1990; Hawkins *et al.*, 1992b; Schmitt-Ney *et al.*, 1995; Hines *et al.*, 1997; Domenice *et al.*, 1998).

La disgenesia gonadal abarca un amplio espectro de condiciones clínicas caracterizadas por un desarrollo anormal de la gónada fetal. Dicha entidad patológica incluye al síndrome de Turner 45,X y sus variantes, la DGM y la DG 46,XX y 46,XY. La última abarca tanto la forma completa como la parcial. Excepto para la DG 46,XY parcial, en la cual se forman testículos disgenéticos bilaterales y en la DGM donde generalmente presentan una estría gonadal y un testículo contralateral y se observa un fenotipo ambigüo (como se observó en los pacientes con DGM, Tabla 1), en las otras entidades patológicas siempre está presente un fenotipo femenino y estrías gonadales bilaterales (Berkovitz *et al.*, 1991).

Asimismo, se ha descrito, en la literatura pacientes con DG 46, XY completa, en los cuales se ha observado diferenciación ovárica (Berkovitz *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1998). 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 síndrome de Turner (Kofman-Alfaro *et al.*, 1982; Méndez *et al.*, 1993).

Recientemente, se ha propuesto que los eventos tempranos que siguen 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 debe regular múltiples caminos de la expresión del gen incluyendo aquellos que controlan los mecanismos morfogénicos

(Martineau *et al.*, 1997). Como ha sido propuesto por Cameron *et al.*, una mutación determinada en el gen *SRY* con un antecedente genético particular puede dar lugar a que el *SRY* se exprese de forma suficiente para alcanzar el umbral requerido para la diferenciación testicular (Cameron y Sinclair, 1997).

Con base en todos estos antecedentes se llevó a cabo el estudio molecular en el gen *SRY* en pacientes con diagnóstico de DGM y anorquia congénita; sin embargo, no se encontraron mutaciones en este gen.

La ausencia de mutaciones en el marco de lectura del gen *SRY* en los tres pacientes con DGM, así como también en los dos pacientes con anorquia congénita pudiese explicarse por la presencia de mutaciones en las regiones 5' o 3' no traducida de este gen, como ha sido reportado en estudios previos (Cameron *et al.*, 1998); o que existan 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) (Pelletier *et al.*, 1991; MacLean *et al.*, 1997) y SF-1 (factor esteroideogénico 1) (MacLean *et al.*, 1997; Luo X *et al.*, 1994). Asimismo, se han reportado mutaciones tanto en genes ligados al cromosoma X como autosómicos, los cuales actúan "corriente abajo" al gen *SRY* como es el *DSS* (gen de reversión sexual sensible a dosis) (Bardoni *et al.*, 1994; MacLean *et al.*, 1997) y el *SOX 9* (gen relacionado con la condrodisplasia campomélica) (Bennett *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 1996; MacLean *et al.*, 1997), que pueden dar lugar a reversión sexual. En todas estas patologías se ha observado que los individuos presentan un cariotipo 46,XY con un gen *SRY* sin alteraciones, estrias gonadales, un fenotipo femenino o ambigüo y diversas alteraciones en otros órganos involucrados en forma específica.

## VIII. CONCLUSIONES

- 1) No se demostraron mutaciones a lo largo del marco de lectura del gen *SRY* en pacientes con diagnóstico de Disgenesia gonadal mixta y con diagnóstico de Anorquia Congénita.
  
- 2) El hecho de no haber detectado mutaciones en el marco de lectura de este gen, no descarta la posibilidad de que éstas existan en las regiones 5' y 3' no traducidas de la región promotora o bien, de que estas patologías puedan ser secundarias a alteraciones en otros genes que intervienen en la cascada de la diferenciación sexual masculina.

## IX. REFERENCIAS

Acquafredda A, Vassal J and Job JC. (1987). Rudiment syndrome revisited. *Pediatrics*, 80: 209-214.

Affara N, Chalmers I and Ferguson-Smith M. (1993). Analysis of the SRY gene in 22 sex-reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. *Hum Mol Genet*, 108: 785-789.

Aynsley-Green A, Zachman M, Illing R and Rampini S. (1976). Congenital bilateral anorchia: a clinical, endotherapeutic evaluation of twenty-one cases. *Clin Endocrinol*, 5: 381-391.

Barbosa A, Ferraz-Costa T, Semer M, Liberman B and Moreira-Filho C. (1995). XY gonadal dysgenesis and gonadoblastoma: a study in two sisters with a cryptic deletion of the Y chromosome involving the SRY gene. *Hum Genet*, 95:63-66.

Bardoni B, Zanaria E., Guioli S, Florida G, Worley K, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McGabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O and Camerino G. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp 21 is involved in male to female sex reversal. *Nature*, 7: 497-501.

Battiloro A, Angeletti B, Tozzi M, Bruni L, Tondini S, Vignetti P and D'Ambrosio E. (1997). A novel double nucleotide substitution in the HMG box of the SRY gene associated with Swyer syndrome. *Hum Genet*, 100: 585-587.

Bengtsson B, Gustavson KH, Reuterskiöld G, Santesson B and Ahsen S. (1974). Male pseudohermaphroditism with 45,X/46,XY mosaicism in a pair of monozygotic twins. *Clin Genet*, 5: 133-143.

Bennett CP, Docherty Z, Robb SA, Ramani P, Hawkins J and Grant D. (1993). Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet*, 30: 518-520.

Bergadá C, Coco R, and Chemes H. (1994). Asymmetric gonadal differentiations. En: Martínez-Mora J. (eds). *Intersexual States*. Barcelona. Doyma. p 46: 263-267.

Berkovitz G, Fechner P, Zacur H, Rock J, Dnyder H, Migeon C and Perlman E. (1991). Clinical and pathologic spectrum of 46, XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicin*, 70: 375-383.

Berta P, Hawskin J, Sinclair A, Taylor A, Griffiths B, Goodfellow P and Fellous M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348: 448-450.

Bilbao J, Loridan L and Castaño L. (1996). A novel postzygotic nonsense mutation in SRY in familial XY gonadal dysgenesis. *Hum Genet*, 97: 537-539.

Bobrow M and Gash M. (1970). Bilateral absense. *Lancet*, 366: 57-69.

Bogan J and Page D. (1994). Ovary ? Testis ?. A mammalian dilemma. *Cell*, 76: 603-607.

Brown S, Yu C, Lanzano P, Heller D, Thomas L, Warburton D, Kitajewski J and Stadtmaver L. (1998). A novo mutation (Gln 25 top) at the 5' end of the SRY gene leads to sex reversal with partial ovarian function. *Am J Hum Genet.*, 62: 189-192.

Cameron, F and Sinclair A. (1997). Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum Mutat*, 9: 388-395.

Cameron F, Smith M, Warne G and Sinclair A. (1998). Novel mutation in the SRY gene results in 46, XY gonadal dysgenesis. *Hum Mutat*, Suppl. 1:S110-S111.

Capel B. (1998). Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu Rev Physiol*, 60: 497-523.

Davidoff F and Federman D. (1973). Mixed gonadal dysgenesis. *Pediatrics*, 52: 752-742.

Domenice S, Nishi M, Correia-Billerbeck A, Latronico A, Medeiros M, Russell A, Vass, K, Carvalho F, Costa-Frade E, Prado-Arhnol I and Bilharinh-Mendoca B. (1998). 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*, 102: 213-215.

Dubín R and Ostrer H. (1994). Sry is a transcriptional activador. *Mol Endoc*, 8: 1182-1193.

Eicher EM, Washburn LI, Shork N, Lee B, Shown E, Xu X, Dredge R, Pringle M and Page D. (1993). Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/5J-YPOS sex reversal. *Nat Genet*, 2: 2013-2018.

Ferrari S, Harley V, Pontiggia A, Goodfellow P, Lovell-Baddege R and Bianchi M. (1992). SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J*, 11: 4497-4506.

Ferrández A, Mayaya E, Antón R and Ciprés L. (1994). Congenital Anorchia. In: *Intersexual states Disorders of sex differentiation*. Martínez-Mora, J. p 330,347.

Foster J, Brenan F, Hampikian G, Goodfellow P, Sinclair A, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfrec M, Cooper D and Graves JAM. (1992). Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY related sequences in marsupials. *Nature*, 359: 531-533.

Foster J, Dominguez-Steglich M, Guioli S, Kwok Ch, Weller P, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young I, Goodfellow P, Brook J and Schafer A. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, 372: 525-530.

Foster JW. (1996). Mutations in SOX9 cause both autosomal sex reversal and campomelic dysplasia. *Acta Paediatr Jpn*, 38: 405-411.

George F and Wilson J. (1992a). Embriology of the genital tract. In: Walsh P, y cols. (eds). *Campbell´s Urology*. 6ª. ed. Philadelphia. Saunders. p 853-951.



George F. (1992b). Sexual differentiation. In: Griffin D, Ojeda S (eds). Textbook of Endocrine Physiology. 29. (ed). USA. Oxford University Press. p 117-132.

Goodfellow P and Darling S. (1988). Genetics of sex determination in man and mouse. *Development*, 102: 251-258.

Griffin J and Wilson J. (1989). The androgen resistance syndrome: 5 $\alpha$ -reductase deficiency, testicular feminization and related disorders. In: Scriver R, y cols. (eds). The metabolic basis of inherited disease. New York. McGraw Hill. p 1919-1944.

Grosschedl R, Grese and Pagel J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet*, 3: 94-102.

Grumbach M and Conte F. (1992). Disorders of sex differentiation. In: Wilson J, Foster D. (eds). Williams Textbook of Endocrinology, 8<sup>a</sup>. ed. Philadelphia. Saunders. p 853-951.

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

Hacker A, Capel B, Goodfellow P and Lovell-Badge R. (1995). Expression of Sry the mouse sex-determining gene. *Development*, 121: 1603-1614.

Hadziselinovic F and Herzog B. (1987). Cryptorchism. *Ped Sur Inter*, 2: 132-135.

Harley V, Jackson D, Hextall P, Hawkins S, Berkovitz G, Sockanathan S, Lovell-Badge R and Goodfellow P. (1992). DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science*, 255: 453-456.

Hawkins J, Taylor A, Goodfellow P, Migeon C, Smith K and Berkovitz G. (1992a) Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet*. 51: 979-984.

Hawkins J, Taylor A, Berta P, Levilliers B, Van der Auwera, Goodfellow P and Scherer G. (1992b). A familial mutation analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet*, 88: 471-474.

Hawkins J. (1993). The SRY gene. *Trends Endocrinol Metab*, 4: 328-332.

Hines R, Tho S, Zhang Y, Plouffe L, Hansen K, Khan I and McDonough P. (1997). 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*, 67: 675-679.

Huff D., Wu H., Snyder M., Hadziselimovic F., Blythe B and Duckett J. (1991). Evidence in favor of the mechanical (intrauterine torsion) theory over the endocrinopathy (criptochidism) theory in the pathogenesis of testicular agenesis. *J of Urology*, 146: 630-631.

Imperato-McGinley J and Gautier T. (1994). Male pseudohermaphroditism due to inherited 5 $\alpha$ -reductase deficiency in man. In: Martínez-Mora. ed. *Intersexual Status: disorders of sex differentiation*. Barcelona. Doyma. p 231-240.

Jacobs P and Ross A. (1966). Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature*, 210: 352-355.

Jäger R, Anvret M, Hall K and Scherer G. (1990). A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature*, 348: 452-454.

Jäger R, Harley V, Pfeiffer R, Goodfellow P and Scherer G. (1992). A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Hum Genet*, 90: 350-355.

Jirásek J. (1967). The relationship between the structure of the testis and differentiation of the external genitalia and phenotype in man. In: Wolstenholme G, O'Connor M. eds. *Endocrinology of the Testis*. Boston. Little Brown 6 Co. p 3-30.

Jirásek J. (1971). *Development of the genital system and male pseudohermaphroditism*. Baltimore. John Hopkins University Press. p 165-170.

John S, Weizner G, Rozen R and Scriver C. (1991). A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acid Res*, 19:408.

Josso N and Briarrrd ML. (1980). Embryonic testicular regression syndrome; Variable phenotypic expression in siblings. *The J Pediatrics*, 97;2:197-201.

Jost A. (1953). Problems of fetal endocrinology. The gonadal and hypophyseal hormones. *Rec. Progr. Horm Res*, 8: 379-418.

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

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

Kofman-Alfaro S, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Angeles A, Schiavon R, Pérez and Palacios G. (1989). Studies of gonadal dysgenesis: variable expressivity of the XY testicular dysgenesis syndrome two cases reports. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 32: 265-274.

Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A and Pérez-Palacios G. (1992). Estudios citogenéticos, endocrinológicos e histológicos en hermafroditismo verdadero. *Rev Invest Clin*, 44: 229-234.

Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N and Lovell-Badge R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348: 450-452.

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

Kwok C, Tyler-Smith C, Mendoca B, Hughes I, Berkovitz G, Goodfellow P and Hawkins J. (1996). Mutation analysis of the 2 Kb 5' to SRY in XY females and XY intersex subjects. *J Med Genet*, 33: 465-468.

Lasznitzki I, Franklin H and Wilson J. (1974). The mechanism of androgen uptake and concentration by rat ventral prostate in organ culture. *J Endocrinol*, 60: 81-90.

Levitt S., Kogan S., Hengel R., Weiss R., Martín D and Ehrlich R. (1978a) The impalpable testis: a rational approach to management. *J of Urology*, 120: 515-518.

Levitt S, Kogan S, Schneider K, Becker J, Sobel E, Malimer R and Engel R. (1978b) Endocrine tests can reliably predict congenital anorchism. *Urology*, 11: 11-13.

Lida T, Nakahori Y, Komaki R, Mori E, Hayashi N, Tsutsumi O, Taketani Y and Nakagoma Y. (1994). A novel nonsense mutation in the HMG box of the SRY gene in a patient with XY sex reversal. *Hum Genet*, 3: 1457-1438.

Lobaccaro JM, Medlej R, Berta P, Belan C, Galifer RB, Guthman JP, Chevalier C, Czernichow P, Dumas R and Sultan C. (1993). PCR analysis and sequencing of the SRY sex determining gene in four patients with bilateral congenital anorchia. *Clin Endocrinol*, 38: 2: 197-201.

López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Pérez-Palacios G, Erickson R Alfaro G and Kofman-Alfaro S. (1995). Clinical traits and molecular findings in 46,XX males. *Clin Genet*, 48:29-34.

López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson and Kofman-Alfaro S. (1995). SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am.J Med Genet*, 55: 356-358.

López M, Zenteno JC, Méndez JP and Kofman-Alfaro S. (1998). Heterogeneidad genética y variabilidad fenotípica en la reversión sexual 46, XY. *Rev Invest Clin*, 50: 171-176.

Lustig L, Cante F, Kogan B and Grumbach M. (1987). Ontogeny of gonadotropin secretion in congenital anorchism: sexual dimorphism versus syndrome of gonadal dysgenesis and diagnostic considerations. *The J Urology*, 138: 587-591.

Luo X, Ikeda Y and Parker K. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77: 481-490.

MacLean H, Warne G and Zajac J. (1997). Intersex disorders: shedding light on male sexual differentiation beyond SRY. *Clin Endocrinol*, 46: 101-108.

Mailhes JB, Pittaway DE, Rary J, Chen H and Grafton WD. (1979). H-Y antigen-positive male pseudohermaphroditism with 45,XY/46,XYq-mosaicism. *Hum Genet*, 53: 57-63.

Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R and Capel B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol*, 7:958-968.

McElreavey K, Vilain E, Boucekkine C, Vidau M, Jaubert F, Richaud F and Fellous M. (1992a). XY sex reversal associated with a nonsense mutation in SRY. *Genomics*, 13: 838-840.

McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Costa JN, Souleyrean N, Kucheira K, Boucekkine C, Thibaud E, Brauner R, Flamant F and Fellous M. (1992b). XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 13: 838-840.

McGillivray M and McGillivray B. (1990). Hypogonadism and chromosomal disorders. In: *Pediatric Endocrinology*. (eds). Filma Lifshitz. New York: Marcel Decker. p 377-412.

McElreavey K, Vilain E, Barbaux S, Fuqua JS, Fechner PY, Souleyreau N, Doco-Fenzy M, Gabriel R, Quereux C, Fellous M and Berkovitz G. (1996). 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*. 93: 3590-3594.

McKay D. (1953). Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rev*, 117: 201-206.

- MacLaren A, Simpson E, Tomonari K, Chandler P and Hogg H. (1984). Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature*, 312: 552-555.
- McLean H, Warne G and Zajac J. (1997). Intersex disorders: shedding light on male sexual differentiation beyond SRY. *Clin Endocrinol*, 46: 101-108.
- Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mutchinick O, Fernández del Castillo C, Reyes E and Pérez-Palacios G. (1993). Mixed gonadal dysgenesis: clinical, cytogenetic, endocrinological and histopathological findings in 16 patients. *Am J Med Genet*, 46: 263-267.
- Merchant-Larios H. (1984). Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In: Van Blerkom J, Motta P. (eds.) *Ultrastructure of Reproduction. Netherlands Martinus Nijhoff Publishers*, p 19-30.
- Müller J, Schwartz M and Shakkebaek N. (1992). Analysis of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in sex-reversed patients: point mutation in SRY causing sex-reversion in a 46, XY female. *J Clin Endocrinol Metab*, 75: 331-333.
- Naaslung M., Gearhar J and Jeff R. (1989). Laparoscopy: its selected use in patients with unilateral non palpable testis after human chorionic gonadotrophin stimulation. *J of Urology*, 142: 108-110.
- Nash HA. (1990). Bending and supercoiling of DNA at the attachment site of bacteriophage lambda. *Trends Biochem Sci*, 15: 222-227.
- Ogata T and Matsuo N. (1996). Sex determining gene on the X chromosome short arm: dosage sensitive sex reversal. *Acta Paediatr Jpn*, 38: 390-398.
- Ohno S. (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. New York. Springer Verlag. p 25-36.
- Page D, Mosher E, Simpson E, Fisher E, Mardon G, Pollack J, de la Chapelle A, McGillivray B and Brown L. (1987). The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*, 51: 1091-1104.

Page D. (1987). Hypotesys: a Y-chromosome gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development*, 101 (Suppl 1): 151-155.

Pardringe W. (1986). Serum bioavailability of sex steroid hormones. *J Clin. Endocrinology. Metab*, 15: 259.

Pelletier J, Bruening W, Kashtan C, Mauer S, Manivel J, Striegeer J, Houghton D, Junien C, Habib R, Fouser L, Fine R, Silverman B, Haber D and Housman D. (1991). Germline mutations in the Wilm's tumour supressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell*, 67: 437-447.

Pérez-Palacios G, Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. (1994). Sex reversal in humans: the XX male syndrome and related disorders. In: Martínez-Mora J. (ed). *Intersexual States: disorders of sex differentiation*. Barcelona. Doyma. p 269-281.

Peters R, King ChY, Ukiyama E, Falsafi S, Donahoe P and Weiss M. (1995). An SRY mutation causing human sex reversal resolves a general mechanism of structures specific DNA recognition: application to the four-way DNA junction. *Biochem*, 34: 4569-4576.

Pontiggia A, Rimini R, Harley V, Goodfellow P, Lovell-Badge R and Bianchi M. (1994). Sex-reversing mutations affect the architecture os SRY-DNA complexes. *EMBO J*, 13: 6115-6124.

Poulat F, Soullier S, Gozé C, Heitz F, Calas B and Berta P. (1994). Description and functional implications of a novel mutation in the sex-determining gene SRY. *Hum Genet*, 3: 200-204.

Poulat F, Girard F, Chevron MP, Gozé C, Rebillard X, Calas B, Lamb N and Berta P. (1995). Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J Cell Biol*, 128: 737-748.

Poulat F, Desclozeaux M, Tuffery S, Jay P, Boizet B and Berta P. (1998). Mutation in the 5' noncoding region of the SRY gene in an XY sex-reversed patient. *Hum Mutat*, Suppl 1:S192-S194.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Rajfer J and Walsh P. (1981). Mixed gonadal dysgenesis-dysgenetic male pseudohermaphroditism. In: Josso N. (eds). The intersex child. Basel. Karger. p 105-115.

Sadi AM, Toda T, Kiyuuna M and Miyagi H. (1996). Mixed gonadal dysgenesis with gonadoblastoma in a females with Y chromosome: case report. *J Obstet Gynecol*, 22: 25-30.

Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory Manual. 2<sup>a</sup>. (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 86: 1939-1943.

Sanger F, Nicklen S and Coulson A. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74: 5463-5467.

Savard K. (1956). Biosynthesis of androgen from progesterone by human testicular tissue *in vitro*. *J Endocrinol Metab*, 16: 1629

Schmith-Ney M, Thiele H, Kaltwaber P, Bardoni B, Cisternino M and Scherer G. (1995). Two novel SRY missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers. *Am J Hum Genet*, 56: 862-869.

Scully R. (1970). Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer*, 25: 1340-1355.

Serrat G, Pérez-Palacios G and Jaffe R. (1979). *De novo* testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab*, 10:128.

Sinclair A, Foster J, Spencer J, Page D, Palmer M, Goodfellow P and Graves J. (1988). Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature*, 336: 780-783.

Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Friachauf A, Lovell-Bdage R and Goodfellow P. (1990). A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346: 240-244.



Sovhal A. (1963). Mixed gonadal dysgenesis. A variety of hermaphroditism. *Am. J Hum Genet*, 15: 155-158.

Sovhal A. (1965). The syndrome of pure gonadal dysgenesis. *Am J Med Genet*, 38: 615-625.

Sugarman ID, Crolla JA and Malone PS. (1994). Mixed Gonadal dysgenesis and cell line differentiation. Case presentation and literature review. *Clin Genet*. 46:313-315.

Su H and Lau Y. (1993). Identification of the transcriptional unit, structural organization and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet*, 52: 24-38.

Tajima T, Nakae J, Shinohara N and Fujieda K. (1994). A novel mutation localized in the 3' non-HMG box region of the SRY gene in 46,XY gonadal dysgenesis. *Hum Mol Genet*, 3: 1187-1189.

Tang Y and Nilsson L. (1998). Interaction of human SRY protein with DNA: a molecular dynamic study. *Proteins*, 31: 417-433.

Torres L, López M, Méndez JP, Canto P, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R and Kofman-Alfaro S. (1996). Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Med Genet*, 63: 348-355.

Van de Wetering M and Clavers H. (1992). 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*, 11: 3039-3044.

Veitia R, Ion A, Barbaux S, Jobling M, Souleyreau N, Ennis K, Ostrer H, Tosi M, Meo T, Chibani J, Fellow M and McElreavey K. (1997). Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet*, 99: 648-662.

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Huster E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W and Scherer G. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY related gene SOX9. *Cell*, 49: 1111-1120.

Werner M, Huth J, Gronenborn A and Clore M. (1995). Molecular basis of human 46,XY sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY DNA complex. *Cell*, 81: 705-714.

Werner M, Gronenborn A and Clore M. (1996). Interaction, DNA binding and the control of transcription. *Science*, 271: 778-784.

Wilson J. (1975). Metabolism of testicular androgens. In: Greep R, Astwood E. eds. *Handbook of Physiology Endocrinology, Male Reproductive System*. Vol V. Washington. American Physiological Society. Sec 7: 491-508.

Wirth J, Wagner T, Meyer J, Pfeiffer RA, Tiatze HU, Schempp W and Scherer G. (1996). Translocation breakpoints in three patients with campomelic dysplasia and autosomal sex reversal map more than 130 kb from SOX9. *Hum Gene*, 97: 186-193.

Zah W, Kalderon A and Tucci J. (1975). Mixed gonadal dysgenesis. A case report and a review of the world literature. *Acta Endocrinol*, 197 (Suppl): 3-39.

Zeng Y, Ren Z, Zhang M, Huang Y and Zeng F. (1993). A new *de novo* mutation (A113T) in HMG box of the SRY gene leads to XY gonadal dysgenesis. *J Med Genet*. 30: 655-657.

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