

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

ANALISIS DEL COMPORTAMIENTO MEIOTICO DE  
LOS CROMOSOMAS SEXUALES HUMANOS  
MEDIANTE TECNICAS DE HIBRIDACION *in situ* Y  
MICROSATELITES

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**( M O R F O L O G I A )**

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

**Q.F.B. ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SUSANA KOFMAN EPSTEIN

MEXICO, D. F.,

2003.



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  
AVENIDA DE  
MEXICO

# DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**ING. LEOPOLDO SILVA**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION  
ESCOLAR DE LA UNAM.  
PRESENTE.

Me permito informarle que el Subcomité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas en su sesión del día 18 de junio del presente año, acordó designar el siguiente jurado para examen de grado como Maestra en Ciencias Biomédicas, área Morfología de la QFB ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO, con número de expediente 12942023 quien defenderá la tesis titulada: **"ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO MEIOTICO DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES HUMANOS MEDIANTE TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *in situ* Y MICROSATELITES"**, y cuya tutora es la Dra. Susana Kofman Epstein.

|               |                                   |
|---------------|-----------------------------------|
| PRESIDENTE:   | DRA. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI |
| SECRETARIO:   | DR. OSVALDO MUTCHINICK BARINGOLTZ |
| PRIMER VOCAL: | DRA. SUSANA KOFMAN EPSTEIN        |
| SUPLENTE:     | DRA. SONIA CANUN SERRANO          |
| SUPLENTE:     | DRA. SANDRA GOMEZ ARROYO          |

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D. F., a 24 de septiembre del 2003.

Dr. Gabriel Roldán Roldán  
Responsable  
Facultad de Medicina

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A mi padre

A mis hijos: Mariana y Alejandro

A todos aquéllos que participaron de alguna manera o influyeron en la realización de esta tesis, Gracias

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN . . . . .  | 1  |
| INTRODUCCIÓN . . . . .   | 4  |
| LOS CROMOSOMAS SEXUALES HUMANOS . . . . .  | 4  |
| Genes en el cromosoma Y . . . . .  | 5  |
| Genes en el cromosoma X . . . . .  | 13 |
| Regiones pseudoautosómicas . . . . .   | 16 |
| LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X . . . . .  | 19 |
| LA MEIOSIS Y LOS CROMOSOMAS SEXUALES HUMANOS . . . . .   | 23 |
| Generalidades sobre el proceso meiótico . . . . .  | 23 |
| Regulación de la meiosis femenina y masculina . . . . .  | 24 |
| Comportamiento de los cromosomas sexuales en las meiosis femenina y masculina . . . . .  | 28 |
| Reactivación e inactivación meiótica de los cromosomas sexuales . . . . .  | 32 |
| ORIGEN Y MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS PRESENTES EN LAS PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER . . . . .   | 39 |
| Monosomía 45,X y mosaicismo . . . . .  | 39 |
| Aberraciones estructurales del cromosoma X . . . . .   | 41 |
| Anomalías estructurales del cromosoma Y . . . . .  | 45 |
| Métodos empleados para determinar el origen y mecanismos de formación de las alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas sexuales presentes en las pacientes Turner . . . . . | 47 |
| OBJETIVOS . . . . .  | 49 |
| MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .   | 50 |
| RESULTADOS . . . . .   | 64 |
| DISCUSIÓN . . . . .  | 75 |
| CONCLUSIONES . . . . .   | 96 |
| REFERENCIAS . . . . .  | 98 |

## RESUMEN

Los cromosomas sexuales humanos son diferentes a los autosomas en cuanto a que contienen dos tipos de genes, aquéllos con homólogos en ambos cromosomas y genes específicos del X y del Y. Además su comportamiento durante la meiosis es exclusivo en cada sexo, principalmente en cuanto se refiere a la recombinación, el estado de activación de los genes localizados en ellos y los errores en su segregación. El objetivo principal de este trabajo fue analizar el comportamiento de los cromosomas sexuales humanos durante la meiosis con relación a su participación en la producción de las aberraciones cromosómicas presentes en individuos con síndrome de Turner.

El síndrome de Turner es un desorden cromosómico debido a la pérdida total o parcial de un segundo cromosoma sexual. Citogenéticamente cerca de la mitad de las pacientes presentan un cariotipo 45,X, mientras que en el resto está presente un segundo cromosoma sexual normal o estructuralmente anormal en forma pura o en mosaico con la línea 45,X. Debido a la elevada mortalidad de los embriones 45,X, se ha postulado que la mayoría de las pacientes con fenotipo Turner y cariotipo 45,X en realidad sean o fueron mosaicos. Consecuentemente, los estudios para identificar mosaicismo críptico en estas pacientes resultan relevantes para tratar de establecer el origen mitótico o meiótico de dicha anomalía. Adicionalmente, cabe señalar que 20% de los casos mosaico tienen un cromosoma sexual marcador cuyo origen generalmente no puede ser determinado por métodos citogenéticos convencionales.

En el presente trabajo se estudiaron 21 pacientes con fenotipo de síndrome de Turner, 10 de ellas con cariotipo 45,X y 11 con una línea celular adicional con un segundo cromosoma sexual; dos presentaban isocromosomas de Xq, otra una del(Xq) y las restantes 8 cromosomas marcadores, 6 de los cuales eran anillos de diferentes tamaños. El análisis se realizó mediante la amplificación de secuencias específicas del cromosoma Y, FISH, PRINS y marcadores microsatélite del cromosoma X para:

- (i) detectar la presencia de mosaicismo críptico de los cromosomas X y Y en las pacientes con constitución 45,X,
- (ii) determinar la estructura de los cromosomas sexuales anormales presentes en las pacientes con mosaico,

- (iii) establecer el origen parental de las aberraciones cromosómicas presentes en las pacientes estudiadas,
- (iv) analizar los eventos de recombinación meiótica ocurridos entre los cromosomas X maternos para inferir el origen cigótico del cariotipo y sugerir el tiempo y mecanismos de los errores que condujeron a la formación de aberraciones estructurales del cromosoma X, y
- (v) discutir la correlación entre la aberración cromosómica presente y el fenotipo de cada paciente con síndrome de Turner estudiada.

La amplificación por PCR de secuencias centroméricas del cromosoma Y resultó negativa en todas las pacientes 45,X y sólo fue positiva en dos de ellas con cromosomas marcadores, en las cuales la amplificación por PCR de otras secuencias del cromosoma Y (PABY, *SRY*, *ZFY* y *Yqh*) también fue positiva. Estos datos junto con los obtenidos de las reacciones de PRINS y FISH nos permitieron establecer la estructura de estos cromosomas. El primero resultó ser un cromosoma pseudodicéntrico con punto de ruptura dentro de la PAR1, que probablemente se originó por un evento de recombinación entre las cromátidas hermanas del cromosoma Y durante la meiosis paterna; mientras que el segundo cromosoma derivado del Y sólo presentaba la delección de la mayor parte de la región heterocromática del extremo distal del brazo largo. Los resultados de los estudios de citogenética molecular, PRINS Y FISH, permitieron corroborar el origen derivado del cromosoma X de los 6 cromosomas en anillo y establecer que uno de los isocromosomas era realmente un pseudicéntrico.

El análisis con marcadores microsatélite del cromosoma X en las 10 pacientes 45,X no demostró heterocigocidad para ninguno de los 5 marcadores informativos empleados, lo cual descarta la presencia de mosaicismo críptico para el cromosoma X. Adicionalmente reveló que el cromosoma X presente en 9 de las 10 pacientes era de origen materno. Sólo fue posible estudiar con microsatélites 5 pacientes mosaico con un segundo cromosoma derivado del X, en ellas se encontró que el cromosoma anormal era de origen paterno en dos casos y materno en tres. Además el análisis con microsatélites permitió acotar los puntos de ruptura en estos 5 cromosomas X anormales.

En dos de las pacientes con cromosomas X anormales de origen materno, el pseudodicéntrico y el que presentaba una deleción del brazo largo, el análisis con microsatélites en miembros adicionales de sus familias nos permitió establecer los eventos de recombinación ocurridos durante la meiosis materna y proponer que probablemente, el cromosoma X pseudodicéntrico se haya originado por un evento de recombinación entre las cromátidas hermanas del cromosoma X materno durante una de las primeras divisiones del cigoto, mientras que la presencia de un evento de recombinación meiótica en el punto de ruptura del cromosoma del(Xq) sugiere que la pérdida del segmento cromosómico pudo ocurrir en la meiosis I materna.

Los datos obtenidos permiten sugerir que la mayoría de las pacientes Turner se deban a un error paterno, ya sea debido a la presencia de un gameto nulisómico para los cromosomas sexuales o a la de un cromosoma sexual estructuralmente anormal de origen paterno, lo cuál debido a su inestabilidad durante las divisiones mitóticas podría contribuir de manera sustancial a la presencia del cariotipo 45,X.

La correlación cariotipo-fenotipo fue difícil de establecer por la naturaleza altamente variable del mosaico en las pacientes con un segundo cromosoma sexual, tanto con respecto a la proporción de células 45,X como con relación a su distribución tisular.

# INTRODUCCIÓN

Los cromosomas sexuales humanos y los genes que portan presentan un comportamiento distinto al de los autosomas. Estas diferencias son particularmente relevantes durante el proceso meiótico mostrando características sexo específicas, las cuales tienen una participación importante en la fertilidad de los individuos y en la generación de aberraciones cromosómicas asociadas con síndromes bien definidos.

## LOS CROMOSOMAS SEXUALES HUMANOS

En los mamíferos, los pares de autosomas homólogos son virtualmente idénticos (homomórficos); y el apareamiento meiótico entre ellos, parecería ser facilitado por el alto grado de identidad de secuencias. En contraste, los cromosomas X y Y humanos y de otros mamíferos son morfológica y genéticamente diferentes (heteromórficos). El cromosoma X humano es submetacéntrico grande, contiene aproximadamente 165 Mb de DNA, es en mayor proporción eucromático y se calcula que contenga aproximadamente 1500- 2000 genes, mientras que el cromosoma Y es mucho más pequeño y principalmente heterocromático con sólo aproximadamente 60 Mb de DNA y ~ 40 genes y pseudogenes (Lahn y Page, 1997; Miller Y Therman, 2001).

En general, se considera que los cromosomas sexuales evolucionaron a partir de un par de autosomas. En los mamíferos esta especialización parece haber comenzado con la aparición de un alelo determinante testicular en un autosoma, lo cual originó al naciente cromosoma Y y llevó eventualmente a la supresión de la recombinación con su parte homóloga, el naciente cromosoma X. Esta falta de recombinación a su vez promovió la degeneración del cromosoma Y en un proceso llamado "Müller's ratchet", debido a la incapacidad para segregar genes que lleven mutaciones deletéreas, formando un haplotipo no deletéreo (Ohno, 1967; Lahn y Page, 2000). Con base en esta teoría, se puede asumir que los genes de los cromosomas sexuales evolucionaron a partir de genes autosómicos a genes X-Y homólogos y a genes específicos del X y específicos del Y.

El requisito del apareamiento meiótico entre el X y el Y ha sido mantenido por la retención de una porción de DNA homólogo en ambos cromosomas debido a la reducción progresiva de genes del cromosoma Y durante la evolución. Estas regiones homólogas X-Y se localizan en ambos extremos de los cromosomas y aparean y recombinan durante la meiosis masculina. Debido a que los genes mapeados en ellas no muestran los criterios estrictos de estar ligados al sexo se les llamó regiones pseudoautosómicas, PAR. Los genes de las PAR generalmente se mantienen activos en ambos cromosomas X en la mujer y se expresan tanto los homólogos del X como los del Y en el varón (Burgoyne, 1982; Polani, 1982; Rappold, 1993).

Un proceso irreversible durante la evolución de los cromosomas sexuales fue la supresión progresiva de la recombinación entre el X y el Y sobre regiones relativamente largas (Lahn y Page, 1999a). Este proceso afecta a los dos cromosomas sexuales de forma radicalmente diferente. Dentro de la región no recombinante del X (NRX; la porción que no recombina con el Y), los genes continúan bien preservados. En contraste, dentro de la porción no recombinante del Y (NRY), la mayoría de los genes han degenerado (Jegalian y Page, 1998; Lahn y Page, 1999a). Sin embargo, existen excepciones a la vía general de degeneración del cromosoma Y: un manojito de genes ancestrales han persistido en NRY así como en NRX en los mamíferos existentes, donde se encuentran como homólogos diferenciados (Lahn y Page, 1997).

### **Genes en el cromosoma Y**

Al parecer dos procesos adaptativos han sido los responsables de la persistencia de los miembros ligados al cromosoma Y en la NRY. El primero es la conservación de ciertos genes de mantenimiento esenciales en los cromosomas X y Y para asegurar la doble dosis de estos genes, tanto en los machos como en las hembras (Lahn y Page, 1997). Los genes ligados al Y por este proceso son similares a sus homólogos en el X ya que codifican para proteínas de mantenimiento ampliamente distribuidas. En suma, sus homólogos en el X, escapan a la inactivación para llenar el requerimiento de doble dosis en las hembras (Lahn y Page, 1997; Brown y cols, 1997). El segundo proceso es la selección al haber adquirido funciones benéficas masculinas y su subsecuente preservación (Delbridge y cols, 1999; Mazeyrat y cols, 1999). Los genes en el Y, conservados por este último proceso, son diferentes de sus homólogos en el X ampliamente expresados en que se manifiestan únicamente en el testículo.

Lahn y Page (2000) describieron un tercer tipo de genes conservados en el Y, los genes *BPY*, los cuales han sido rebautizados como *VCY*, de los cuales se pensaba no tenían homólogos en el X, como la mayoría de los genes presentes en multicopias en el Y, sin embargo, también existen en copias múltiples en el X y tanto los genes en el Y como los del X (*VCX*) se expresan únicamente en testículo, en particular en las células germinales masculinas. Esta última característica distingue a esta familia de los dos tipos de genes en el Y previamente descritos.

La mayoría de los genes localizados en el cromosoma Y pertenecen al primer tipo de genes mencionado (Genes NRY Clase I), es decir aquéllos que son necesarios para mantener una doble dosis en ambos sexos y que codifican para proteínas de mantenimiento ubicuas (Lahn 97). Estos genes se encuentran distribuidos en bloques tanto en el brazo corto (*RPS4Y*, *ZFY*, *PRKY*), como en el largo (*USP9Y*, *DBY*, *UTY*, *TB4Y*, *SMCY*, *EIF1AY*) y parecerían corresponder a las regiones conservadas del par ancestral (Yen, 1999; Bachtrog y Charlesworth, 2001; Lahn y cols, 2001). Junto con los genes de mantenimiento funcionales se encuentran varios pseudogenes (*STSP*, *KALP*, *GYG<sub>2P</sub>*), cuyos homólogos funcionales en el X escapan a la inactivación (Del Castillo y cols, 1992, Disteche, 1995; Meroni y cols, 1996) (Figura 1, Tabla 1). Algunos de los genes activos en el cromosoma Y humano son pseudogenes en otros mamíferos, por ejemplo *RPS4Y* sólo está presente en los primates y en las líneas no primates el gen *RPS4X* está sujeto a inactivación en las hembras (Jegalian y Page, 1998). Por el contrario, el *locus UBE1X* tiene un homólogo en el cromosoma Y de los monos ardilla, pero aunque no existe en el cromosoma Y humano, el homólogo en el X escapa al proceso de inactivación en las mujeres (Mitchell y cols, 1998). Es por ello que se ha sugerido que la deriva génica del cromosoma Y dirige el proceso por el cual estos genes evolucionan para ser inactivados en el cromosoma X de las hembras en los mamíferos (Jegalian y Page, 1998).

Un mecanismo mediante el cual el cromosoma Y ha adquirido genes homólogos a los del X es a través de genes autosómicos que originalmente fueron incorporados a las regiones pseudoautosómicas. Por ejemplo *STS* y *ANT3* son autosómicos en los marsupiales y han sido incorporados a la PAR de mamíferos euterios como la oveja y el perro (Graves y cols, 1998). En los humanos, *ANT3* es parte de la PAR, pero *STS* ha sido incorporado a la NRXY, en donde el homólogo del Y es un pseudogen, *STSP* (Graves, 2000).

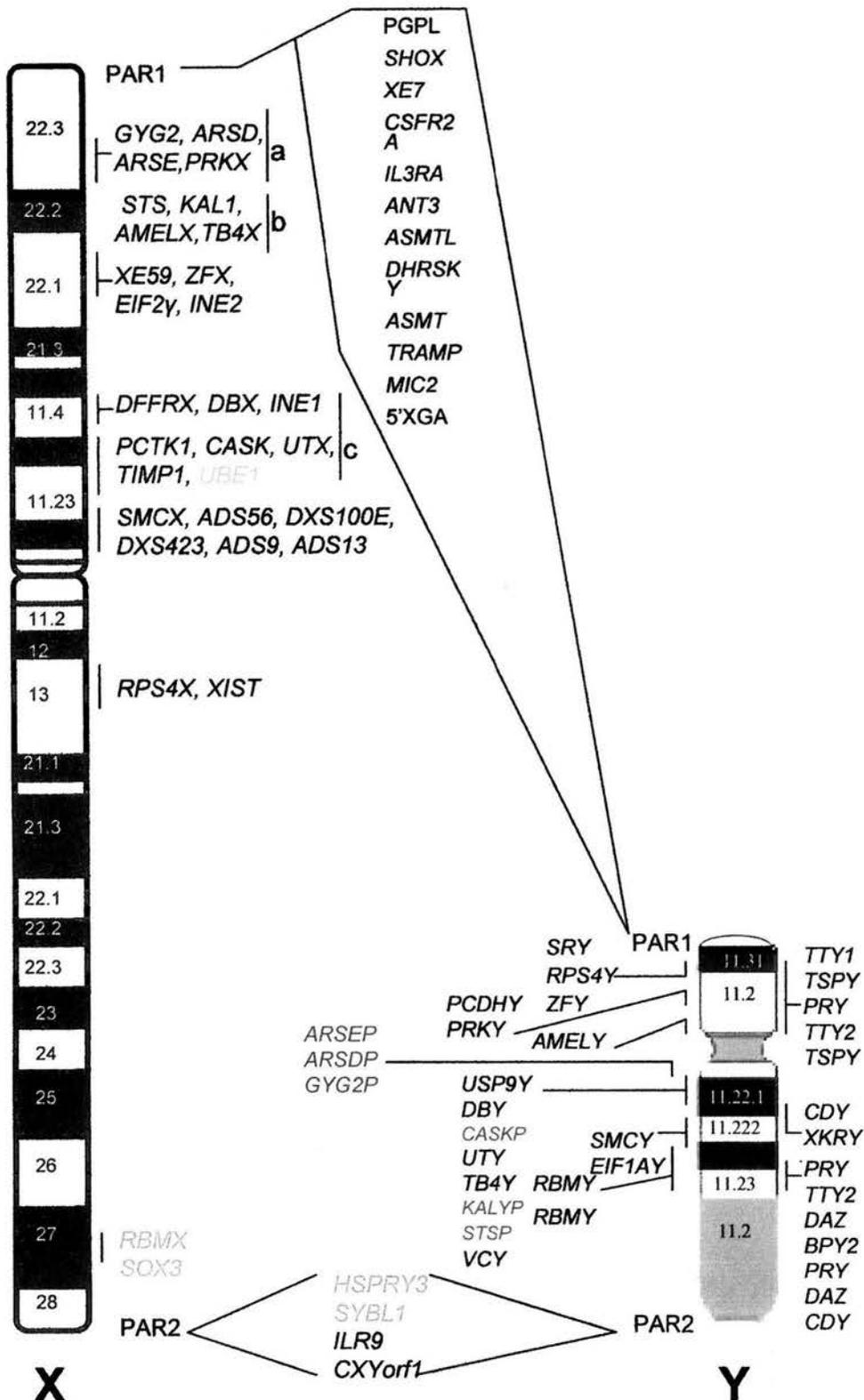


Figura 1. Idiogramas de los cromosomas X y Y en donde se muestran en el centro los genes que tienen o tuvieron homólogos en ambos cromosomas y escapan a la inactivación del cromosoma X. Se señalan en azul los pseudogenes presentes en el cromosoma Y, en verde los genes que no escapan a la inactivación del cromosoma X y en rosa el gen *UBE1* que ya no tiene homólogo en el cromosoma Y humano. Del lado derecho del cromosoma Y se encuentran los genes específicos de este cromosoma. Las letras a, b y c indican los tres estratos evolutivos de los genes del brazo corto del cromosoma X.

**Tabla 1. Genes de la región no recombinante del cromosoma Y humano**

| Tipo de Genes        | Símbolo       | Producto                                  | Función/Especificidad de expresión        | Homólogo en X / inactivado en mujeres | No. copias | Referencias  |
|----------------------|---------------|---|---|---------------------------------------|------------|--|
| <b>NRY clase I</b>   | <i>RPS4Y</i>  | Proteína ribosómica S4                    | Mantenimiento/ ubicuota                   | si/no                                 | una        | Fisher y cols, 1990  |
|                      | <i>ZFY</i>    | Factor de transcripción con dedos de Zinc | Mantenimiento/ ubicuota                   | si/no                                 | una        | Page y cols, 1987; Schneider-Gädick y cols, 1989                                   |
|                      | <i>PRKY</i>   | Proteína cinasa de Ser/Thr                | Mantenimiento/ ubicuota                   | si/no                                 | una        | Schiebel y cols, 1997  |
|                      | <i>USP9Y</i>  | Enzima desubiquitinizante                 | Mantenimiento/ ubicuota                   | si/no                                 | una        | Brown y cols, 1998; Sun y cols, 1999   |
|                      | <i>DBY</i>    | Caja de destrucción-RNA helicasa          | Mantenimiento/ ubicuota                   | si/no                                 | una        | Linder y cols, 1989; Jones y cols, 1996; Chuang y cols, 1997; Foresta y cols, 2000 |
|                      | <i>UTY</i>    | motivo TRY ubicuota                       | Mantenimiento/ ubicuota                   | si/no                                 | una        | Greenfield y cols, 1998; Warren y cols, 2000                                       |
|                      | <i>TB4Y</i>   | Timosina $\beta$ 4                        | Mantenimiento/ ubicuota                   | si/no                                 | una        | Lahn y Page, 1997  |
|                      | <i>SMCY</i>   | Selected mouse cDNA                       | Mantenimiento/ ubicuota                   | si/no                                 | una        | Wang y cols, 1995  |
|                      | <i>EIF1AY</i> | Factor de inicio de traducción 1A         | Mantenimiento/ ubicuota                   | si/no                                 | una        | Ehrman y cols, 1998  |
| <b>NRY clase II</b>  | <i>TTY1</i>   | Transcrito testicular 1                   | Espermatogénesis/ testículo               | no                                    | múltiples  | Lahn y Page, 1997  |
|                      | <i>TSPY</i>   | Proteína de unión a ciclina B             | Espermatogénesis / testículo              | no                                    | múltiples  | Schnieders y cols, 1996  |
|                      | <i>PRY</i>    | Proteína tirosin fosfatasa                | Espermatogénesis / testículo              | no                                    | múltiples  | Lahn y Page, 1997  |
|                      | <i>TTY2</i>   | Transcrito testicular 2                   | Espermatogénesis / testículo              | no                                    | múltiples  | Lahn y Page, 1997  |
|                      | <i>CDY</i>    | Proteína con cromodominio                 | Espermatogénesis / testículo              | no                                    | múltiples  | Lahn y Page, 1999a   |
|                      | <i>XKRY</i>   | Proteína de transporte de membrana        | Espermatogénesis / testículo              | no                                    | múltiples  | Lahn y Page, 1997  |
|                      | <i>DAZ</i>    | Proteína de unión a RNA                   | Espermatogénesis / testículo              | no                                    | 4          | Reijo y cols, 1995; Saxena y cols, 1996  |
|                      | <i>BPY2</i>   | Proteína básica                           | Espermatogénesis / testículo              | no                                    | múltiples  | Lahn y Page, 1997  |
| <b>NRY clase III</b> | <i>SRY</i>    | Factor de transcripción                   | Determinación sexual masculina/ testículo | si/si                                 | una        | Sinclair y cols, 1990; Stevanovic y cols, 1993                                     |
|                      | <i>RBMY</i>   | Proteína de unión a RNA                   | Espermatogénesis/ testículo               | si/si                                 | múltiples  | Ma y cols, 1993; Mazeyrat y cols, 1999   |
|                      | <i>AMELY</i>  | amelogenina                               | Gemas dentales                            | si/probable                           | una        | Nakahori y cols, 1991; Salido y cols, 1992a  |
|                      | <i>VCY</i>    | Proteína de carga variable                | Desconocida/ testículo                    | múltiples/na                          | dos        | Lahn y Page, 2000  |
|                      | <i>PCDHY1</i> | Protocaderina                             | Adhesión celular/cerebro                  | si/no                                 | una        | Yoshida y Sugano, 1999   |

na- no aplicable

Solo dos genes en el cromosoma Y con homólogos en el X han sido preservados por el proceso de especialización masculina: *SRY*, el gen determinante testicular (Sinclair y cols, 1990), y *RBMY*, un factor espermatogénico putativo (Ma y cols, 1993) (Genes NRY Clase III, Tabla 1). Tanto *SRY* como *RBMY* tienen funciones masculinas específicas, mientras que sus homólogos en el X, *SOX3* y *RBMY*, respectivamente, retienen amplios patrones de expresión que presumiblemente recuerdan el estado ancestral de expresión (Stevanovick y cols, 1993; Foster y Graves, 1994; Delbridge y cols, 1999; Mazeyrat y cols, 1999). *RBMY* ha sufrido amplificación, lo cual es la etiqueta de los genes específicos del Y expresados exclusivamente en testículo (Delbridge y cols, 1999; Mazeyrat y cols, 1999). En el ratón, existen tres ejemplos adicionales de genes en X y Y - *Zfx/y*, *Ube1y/x*, *Dffrx/y*- que se han vuelto específicos de testículo los del Y, mientras que los del X han mantenido una expresión ubicuota (Mardon y cols, 1989; Handley y cols, 1991; Kay y cols, 1991; Brown y cols, 1998). Al igual que *RBMY* en el humano, *Zfy* y *Ube1y* en el ratón han sufrido amplificación en el cromosoma Y (Mardon y cols, 1990, Mitchell y cols, 1991).

Los genes *PCDHY* (Yoshida y Sugano, 1999) y *AMELY* (Nakahori y cols, 1991), considerados inicialmente como genes con expresión ubicuota han sido reclasificados y estimados como genes con funciones masculinas benéficas, debido a que ambos homólogos tienen expresión tejido específica (Genes NRY Clase III, Tabla 1). El gen *PCDHY* que codifica para una proto-caderina se expresa exclusivamente en cerebro y se ha sugerido que pudiera tener una función masculina específica en la morfogénesis del cerebro (Blanco y cols, 2000a). Sin embargo, aún cuando existe dimorfismo sexual en el cerebro humano, esto no ha podido ser demostrado y alternativamente se ha propuesto que, dado que este gen parece ser una adición reciente del X al Y, sólo hace 3 o 4 millones de años (Schwartz y cols, 1998), podría encontrarse en un estado temprano de degeneración funcional (Lahn y cols, 2001). Los genes de la amelogenina X/Y codifican para una proteína que se agrega al naciente armazón del esmalte dental, el cual es el tejido más mineralizado de los vertebrados. Los mamíferos placentados expresan estas proteínas del *locus* en el X en algunos taxa por ejemplo los primates, gato, vaca, venado y caballo, pero no en otros, muridos y cerdos; y muy débilmente del locus del Y (Nakahori y cols, 1991; Alvesalo, 1997; Samonte y cols, 1998; Lahn y cols, 2001). En los humanos, algunos alelos de *AMLX* segregan con defectos en el esmalte dental (Ravassipour y cols, 2000). La pregunta que surge es como ha evolucionado *AMELY* para conferir un beneficio

masculino específico, postulándose que podría retardar el brote dental y por otra parte, recientemente se ha demostrado la existencia de un producto de procesamiento alternativo del gen que pudiera estar implicado en la regulación del crecimiento óseo y de cartílago, aunque los sitios cruciales para la obtención de este producto no están presentes en el homólogo del Y (Veis y cols, 2000; Lahn y cols 2001).

Otros genes con funciones benéficas masculinas y homólogos en el X son los genes de carga variable *VCX/Y* que forman una gran familia con expresión de ambos homólogos exclusivamente en testículo (Genes NRY Clase III, Tabla 1). Aún cuando se desconoce la función de estos genes se ha propuesto que pudieran tener una función antagonista en la deriva meiótica debido a que presentan características comunes con los genes de *Drosophila melanogaster*, *Stellate (Ste)* ligado al X y *crystal (Su(Ste))* ligado al Y (Kogan y cols, 2000). Es interesante señalar que existen copias de *VCX* cerca del telómero, en la región que más recientemente dejó de recombinar, dos de estos grupos flanquean al gen de la sulfatasa de esteroides y se han implicado en los eventos de recombinación que llevan a la delección de este gen (Lahn y Page, 2000; Lahn y cols, 2001).

En la NRY también existen genes específicos del cromosoma Y, que no tienen homólogos en el X y que como regla general se encuentran en multicopias y se expresan exclusivamente en testículo (familias *DAZ*, *CDY*, *TTY*, *TSPY*, *PRY*, *XKRY*, *BPY*) (Reijo y cols, 1995; Schnieders y cols, 1996; Lahn y Page, 1997; 1999a; 2000) (Genes NRY Clase II, Tabla 1). Varios de los genes testículo específicos arribaron al Y por transposición o retroposición de genes autosómicos, más que por persistencia (Saxena y cols, 1996, Lahn y Page 1999a). Algunos de éstos, como los genes *CDY* carecen de intrones y podrían haber sido incorporados por retrotransposición a partir de un autosoma (Lahn y Page, 1999a), mientras que otros tal como *DAZ* contienen intrones (Saxena y cols, 1996). La acumulación de genes específicos para espermatogénesis coincide con una función masculina benéfica que podría resultar antagonista para la mujeres. De hecho individuos fenotípicamente femeninos que portan segmentos del cromosoma Y son especialmente susceptibles al desarrollo de gonadoblastoma, habiéndose propuesto la existencia de uno o varios genes predisponentes, *GBY*, para el desarrollo de este tipo de tumores en el cromosoma Y. Aún cuando no se ha identificado al gen postulado como *GBY*, es muy probable que su localización sea pericentromérica, principalmente en el intervalo 4 (Page, 1994; Salo y

cols, 1995; Tsuchiya y cols, 1995). Un gen en multicopias localizado primariamente en la región crítica en el intervalo 3 con algunas copias homólogas en los intervalos proximales 4 y 5, *TSPY*, ha emergido como el candidato más probable para *GBY* (Lau, 1999).

Uno de los hallazgos relevantes al secuenciar y mapear al cromosoma Y fue la presencia de regiones NRY específicas amplificadas masivamente, las cuales comprenden una tercera parte de la región eucromática no recombinante. Estas regiones amplificadas presentan diferente composición, tamaño, número de copias y orientación; algunas ocurren como repetidos en tándem, otras como repeticiones invertidas y aún dispersas a lo largo de ambos brazos del cromosoma. La mayoría de los genes Y específicos se encuentran en estas regiones amplificadas (Tilford y cols, 2001).

El cromosoma Y también contiene abundantes elementos repetitivos de las familias *Alu* y *LINE* a lo largo de todo el cromosoma y una parte importante de él está constituida de DNA satélite que en su mayor parte se encuentra en la región heterocromática del extremo distal del brazo largo, aproximadamente 30Mb (Erlandsson y cols, 2000; Lander y cols, 2001; Venter y cols, 2001). Esta región heterocromática consiste principalmente de dos secuencias *DYZ1* de 3.4kb y *DYZ2* de 2.5Kb que juntas forman del 50- 70% del contenido de DNA del cromosoma Y (Cooke y cols, 1983, Lahn y cols, 2001).

Una característica distintiva de los genes en la NRY es que sus dos clases principales se asocian con dos patologías: el síndrome de Turner (ST) y la infertilidad masculina. El síndrome de Turner resulta de un cariotipo 45,X o de mosaicos con una línea celular 45,X y otra con un segundo cromosoma sexual estructuralmente normal o anormal. El cariotipo del ST puede ser visto como la falta de un cromosoma o segmento de cromosoma X o del cromosoma Y en relación a las mujeres XX o a los varones XY, lo que llevó a postular en 1965, que el síndrome refleja la haploinsuficiencia de los genes del ST, de los cuales debían existir homólogos en ambos cromosomas sexuales y escapar a la inactivación del cromosoma X (Ferguson-Smith, 1965). Los genes clase I de la NRY del Y y sus homólogos del X cumplen estas condiciones, lo que los hace candidatos a genes anti-Turner y su amplia expresión es consistente con el espectro de anomalías presentes en las pacientes con este padecimiento (Zinn y cols, 1993; Lahn y cols, 2001). Los genes pseudoautosómicos también deben contribuir al ST ya que cumplen con los

mismos requisitos (Rappold, 1993) Este síndrome permite evaluar el papel fundamental que desempeñan los genes de mantenimiento del cromosoma Y expresados ubicuotamente y resaltar la incompleta degeneración de este cromosoma en el humano. En el ratón, la degeneración del cromosoma Y parece estar relativamente más avanzada ya que los individuos XO no muestran un fenotipo alterado o reconocible (Lahn y cols, 2001).

El segundo padecimiento comúnmente asociado con el Y, la infertilidad masculina se presenta en 1 de 1000 individuos principalmente por una falla espermatogénica. Notablemente, las deleciones de *novó* del cromosoma Y constituyen aproximadamente 10% de los casos (Reijo y cols, 1995; Vogt y cols, 1996; Simoni y cols, 1997; Vogt, 1998). Los genes específicos del Y de la NRY con expresión específica en testículo, primordialmente en las células germinales y en copias múltiples son probablemente importantes para la espermatogénesis. El mapeo por deleción en individuos infértiles permitió definir tres regiones implicadas en la fertilidad, AZFa,b,c (*Azoospermia factor region a, b and c*) (Figura 1). La deleción de cualquiera de ellas afecta severamente la espermatogénesis (Ma y cols, 1993; Reijo y cols, 1995; Vogt y cols, 1996; Simoni y cols, 1996). La deleción de AZFc es la más común de las tres (Stuppia y cols, 1998). Al parecer la alta incidencia de deleciones intracromosómicas en el cromosoma Y es debida a eventos de recombinación entre bloques de secuencias repetitivas dispersas del cromosoma Y, incluyendo elementos retrovirales (Blanco y cols, 2000b; Kamp y cols, 2000). Además de los genes multicopia con expresión en testículo se han reportado alteraciones en los genes *USP9Y*, previamente llamado *DFFRY* o en *DBY (DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His)- box polipeptide Y)*, los cuales pertenecen a la clase de genes NRY que se expresan ubicuotamente y se localizan dentro de la región AZFa, en individuos con falla espermatogénica (Sun y cols, 1999; Foresta y cols, 2000). Es interesante señalar que los genes de expresión ubicuota *SMCY*, *USP9Y*, y *UTY* codifican para varios antígenos H-Y masculinos específicos que despiertan la respuesta inmune en las mujeres (Wang y cols, 1995; Warren y cols, 2000, Lahn y cols, 2001), lo que ha llevado a sugerir que también podrían conferir un beneficio masculino y debido a que los homólogos en el X retienen las funciones ancestrales, los genes en el Y pueden especializarse o por el contrario degenerar y perderse (Wyckoff y cols, 2002).

El mapeo genético comparativo entre los tres grupos principales de mamíferos - euterios, marsupiales y monotremas- mostró que los cromosomas sexuales consisten de dos regiones con

orígenes diferentes. Una región del cromosoma X está conservada en todos los mamíferos y por lo tanto debe ser parte del par ancestral. Sin embargo, la otra región del X de los mamíferos euterios es autosómica en los otros dos grupos, por lo que debe de haber sido adquirida más recientemente. Esta región agregada, comprende la mayor parte del brazo corto del cromosoma X humano y confirma su reciente adquisición por el hecho de que muchos de los genes ahí localizados escapan a la inactivación del cromosoma X (Waters y cols, 2001). Asimismo, el cromosoma Y también contiene una región conservada en todos los grupos de mamíferos y una región agregada que está presente sólo en los euterios. Esto sugiere que la diferenciación del cromosoma Y se inició antes de la divergencia de los monotremas y los terios (marsupiales y euterios) lo cual se calcula ocurrió hace 170 millones de años (Gaves, 1996; Waters y cols, 2001; Graves, 2002). La región conservada del Y incluye sólo a los genes *SRY*, *RBMV*, *RPS4Y* y *SMCY*; mientras que para la mayoría de los genes de expresión ubicua (*USP9Y*, *DBY*, *UTY*, *ZFY*, *AMELY*, *STSP*, *CFS2RA* y *SLC25A*) su adición fue más recientes, el hecho de que casi todos estos genes se encuentren en el mismo cromosoma de un marsupial, el wallaby, sugiere que hayan pasado al cromosoma Y humano en un solo evento (Graves, 2000; Waters y cols, 2001).

Graves (2002) ha propuesto que el factor determinante testicular, *SRY*, es uno de los genes típicos del cromosoma Y en degeneración y que probablemente no fue el producto original que definió al cromosoma Y, sino más bien es un producto de su degeneración. Al igual que otros genes en el cromosoma Y, evolucionó a partir de un gen, *SOX3*, en el par ancestral de cromosomas sexuales y fue divergiendo de su función original, probablemente en el cerebro, manteniendo la caja HMG de unión a DNA, lo que probablemente lo convirtió en un represor de los genes *SOX*. Al igual que otros genes del cromosoma Y, aún aquéllos cruciales para el sexo masculino, podría perderse y sus funciones ser realizadas por otros genes en la vía de la determinación gonadal al continuar la deriva génica.

### **Genes en el cromosoma X**

El cromosoma X de los mamíferos es único en el genoma debido a que están presentes dos copias en las mujeres y sólo una en los varones. Sólo unos cuantos de sus 1500 probables genes en los humanos y ratón tienen homólogos en el Y. Los sujetos masculinos por su hemigocidad

expresan los genes recesivos ligados al X y la mayoría de los genes que no tienen homólogos en el Y están sujetos al proceso de inactivación.

A diferencia de la poca conservación del cromosoma Y que existe entre los mamíferos euterios, el cromosoma X es un cromosoma altamente conservado no solo entre los primates sino entre diferentes órdenes incluyendo, en algunas regiones, a marsupiales y monotremas (Graves, 2000; Waters y cols, 2001). Se ha postulado que esto es debido a la retención de la función ancestral de los genes autosómicos y que una vez que éstos entran al proceso de inactivación, la pérdida o cambio de localización de alguno de ellos descompensaría severamente la dosis génica (Ohno, 1967; Graves, 2000). Sin embargo, la deriva génica del cromosoma Y ha marcado diferencias evolutivas en cuanto a los genes que escapan a la inactivación del cromosoma X en las hembras. En general, como ya se mencionó, se esperaría que todos los genes que escapan a la inactivación del cromosoma X tuvieran homólogos funcionales en el Y (Greenfield y cols, 1998; Disteche, 1999), esto ocurre en la mayoría de los casos, pero algunos genes como *UBE1* y *SB1.8* escapan a la inactivación pero carecen de homólogos en el cromosoma Y humano (Brown y cols, 1995; Rocques y cols, 1995; Carrel y cols, 1996; Mitchell y cols, 1998). Otros como el gen del síndrome de Kallman, *KALI*, y *STS* tienen como homólogos pseudogenes en el Y, existiendo considerables diferencias en relación a otros mamíferos como el ratón, en donde como ya se mencionó *Sts* es pseudoautosómico (Mitchell y cols, 1991; Del Castillo y cols, 1992; Disteche, 1995; Meroni y cols, 1996).

Lahn y Page (1999b) han propuesto que los genes que escapan a la inactivación del cromosoma X han evolucionado en cuatro estratos diferentes. Al estudiar 19 genes ancestrales autosómicos que persisten como homólogos diferenciados en los cromosomas X y Y humanos y medir la edad individual de los pares X-Y (por divergencia de su secuencia de nucleótidos) y con base a su localización en ambos cromosomas establecen que existieron al menos 4 eventos que suprimieron la recombinación en bloques a lo largo de los cromosomas sexuales sin alterar el orden de los genes en el cromosoma X. El primer evento, el cual debe haber marcado el inicio de la diferenciación de los cromosomas sexuales, posiblemente ocurrió hace 240 a 320 millones de años, poco después de la divergencia entre aves y mamíferos. En la figura 1 se muestran los genes y la localización de cada uno de estos estratos dentro de las NRX/Y. Se ha sugerido que los eventos iniciales se llevaron a cabo en el brazo largo y que la supresión de la recombinación más

reciente se dió en la región adyacente a la PAR localizada en el extremo distal del brazo corto del X y que probablemente los genes de este estrato formaban parte de una región pseudoautosómica de mayor tamaño (Lahn y Page 1999b, Wyckoff y cols, 2002).

Además de los genes que tienen o no homólogos funcionales en el Y existe un número adicional de genes en el X que escapan a la inactivación. En un trabajo realizado por Carrel y cols (1999) de 224 genes y secuencias de expresión blanco (EST) investigados se encontró que 34 escapan a la inactivación. La mayoría de las secuencias que escapan a la inactivación se encuentran en el brazo corto y sólo 3% de ellas en el brazo largo. Estos datos parecen confirmar que los genes del brazo corto son las adiciones autosómicas más recientes al cromosoma X y que quizá por ello la inactivación no se extiende homogéneamente en ellas, tal como ha sido reportado en las translocaciones X/autosoma (Carrel y cols, 1999; Disteche, 1999; Hall y cols, 2002; Sharp y cols, 2002). Recientemente, se comparó el estado de inactivación de 5 genes humanos, *SMCX*, *ADS56*, *DXS100E*, *SB1.8* y *ADS13*, que no se inactivan de la región localizada en Xp11.21-p11.22 con la región homóloga en el ratón, encontrándose que sólo un gen, *Smcx*, escapa a la inactivación en este último. Estos datos han llevado a sugerir que las secuencias de los promotores y las localizadas adyacentes a ellos podrían ser importantes para determinar su estado de inactivación por el establecimiento de dominios cromosómicos específicos (Tsuchiya y Willard, 2000).

El cromosoma X contiene, además de un gran número de genes de mantenimiento celular, muchos genes implicados en la inteligencia (Lehrke, 1972; Turner, 1996) y sorprendentemente una cantidad desproporcionada de genes que participan en la fertilidad en ambos sexos, incluyendo genes que regulan la espermatogénesis (Hurts y Randerson, 1999; Saifi y Chandra, 1999; Wang y cols, 2000; Graves y Delbridge, 2001; Hurts, 2001). Varias hipótesis han sido propuestas para tratar de explicar cómo se produjo la acumulación de este tipo de genes en el cromosoma X de los mamíferos euterios, entre las que cabe destacar: (1) que inicialmente un autosoma haya sido seleccionado por su alto contenido de genes relacionados con la reproducción y (2) que los genes implicados con la reproducción se acumularon en el X después de la degeneración del cromosoma Y, ya sea por transposición de autosomas al “autosuficiente cromosoma X” o por la adquisición de funciones relacionadas con la reproducción por algunos genes del X más ampliamente expresados (Graves y Delbridge, 2001; Hurts, 2001). Sin embargo,

a la fecha ninguna de ellas ha podido ser comprobada, sugiriéndose incluso que la organización general del genoma podría ser la responsable de la acumulación de genes que se expresan en un tejido particular en una determinada región cromosómica para facilitar la regulación de su expresión.

### **Regiones pseudoautosómicas**

En cada extremo de los cromosomas sexuales existen regiones homólogas X-Y, estas regiones pseudoautosómicas (PAR) aparean y recombinan regularmente en la meiosis masculina. La PAR1 localizada en los extremos de los brazos cortos, abarca 2.6 Mb y contiene 11 genes (*PGPL*, *SHOX*, *XE7*, *CSF2RA*, *IL3RA*, *ANT3*, *ASMTL*, *DHRSXY*, *ASMT*, *TRAMP* y *MIC2*) y la región 5' de un duodécimo gen (*XGA*) (Graves y cols, 1998, Gianfrancesco y cols, 2001) (Tabla 2). La recombinación entre este DNA "pseudoautosómico" en los extremos de los brazos cortos de los cromosomas (Xp y Yp) asegura la homogeneización de las secuencias en la región (Rappold, 1993). Como la mayoría de los genes autosómicos, aquéllos en la PAR1 se expresan ambos alelos en los cromosomas X en la mujer y en los alelos en el X y el Y en el varón (Disteche, 1995).

La PAR1 es esencial para el apareamiento meiótico y la recombinación; su delección causa infertilidad masculina. Estudios comparativos entre los genes humanos localizados en esta región y los genes correspondientes en otros mamíferos ha llevado a establecer que fueron adicionadas al X y al Y desde la divergencia de los marsupiales y los euterios hace 130 millones de años (Toder y Graves, 1998, Graves y cols, 1998). Una reducción importante de esta región que incluye al gen *STS* se produjo durante la divergencia de carnívoros y artiodáctilos (Toder y cols, 1997). La comparación de tres genes humanos de la PAR1, *DHRSXY*, *PGPL* y *TRAMP*, junto con estudios previos de otros genes, ha permitido proponer que la PAR en el ratón ha ido perdiendo gradualmente genes y no que a la PAR1 humana se le hayan ido adicionando (Graves y cols, 1998; Gianfrancesco y cols, 2001).

Una segunda región pseudoautosómica comparable a la anterior en Xq/Yq, fue descubierta durante el mapeo del cromosoma X (Freije y Schlessinger, 1992). La PAR2 contiene secuencias que fueron recuperadas tempranamente por ambos cromosomas y que muestran recombinación en toda su extensión (Freije y cols, 1992). Sin embargo, también presenta

**Tabla 2. Genes localizados en las regiones pseudoautosómicas de los cromosomas sexuales humanos**

| Región        | Gen                | Producto/función  | Inactivación                                   | Referencias                            |
|---------------|--------------------|---|--|--|
| PAR1          | <i>PGPL</i>        | Proteína de unión a GTP putativa  | no   | Gianfrancesco y cols, 1998             |
|               | <i>SHOX/PHOG</i>   | Baja estatura con caja homeótica  | no   | Rao y cols, 1997; Ellison y cols, 1997 |
|               | <i>XE7</i>         | Transcrito específico que escapa a inactivación del X   | no   | Ellison y cols, 1992                   |
|               | <i>CSFR2A</i>      | Cadenas $\alpha$ del receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos | no   | Gough y cols, 1990                     |
|               | <i>IL3RA</i>       | Cadenas $\alpha$ del receptor de interleucina 3   | no   | Milatovich y cols, 1993                |
|               | <i>ANT3</i>        | ADP/ATP translocasa   | no   | Slim y cols, 1993                      |
|               | <i>ASMTL</i>       | Acetil-serotonin-O-metiltransferasa, semejante a  | no   | Ried y cols, 1998                      |
|               | <i>DHRISKY</i>     | Deshidrogenasa/reductasa de la familia SDR  | no   | Gianfrancesco y cols, 2001             |
|               | <i>ASMT</i>        | Acetil-serotonin O metiltransferasa   | no   | Yi y cols, 1993                        |
|               | <i>TRAMP</i>       | Transposasa tipo AC putativa  | no   | Esposito y cols, 1999                  |
|               | <i>MIC2</i>        | Antígeno de superficie definido por anticuerpos monoclonales 12E7, F21 y O13                  | no   | Goodfellow, 1986; Gelin y cols, 1989   |
| <i>5' XGA</i> | Grupo sanguíneo Xg | no  | Ellis y cols, 1994a; 1994b; Weller y cols 1995 |  |
| PAR2          | <i>HSPRY3</i>      | Homólogo a <i>sprouty</i> de <i>D. melanogaster</i>   | si   | Ciccodicola y cols, 2000               |
|               | <i>SYBL1</i>       | Tipo sinaptobrevina   | si   | D'Esposito y cols, 1996, 1997          |
|               | <i>IL9R</i>        | Receptor de interleucina 9  | no   | Kermouni y cols, 1995                  |
|               | <i>CXYorf1</i>     | Desconocida, marco de lectura abierto conservado en X y Y                                     | no   | Ciccodicola y cols, 2000               |

propiedades diferentes a las de la PAR1. La recombinación es 6 veces mayor que en el resto del cromosoma X, pero mucho menor que el evento indispensable de recombinación en cada meiosis en la PAR Xp/Yp y no es necesaria para la fertilidad (Li y Hamer, 1995, Kuhl y cols 2001). Quizás todavía más extraño, fue el hecho de que al mapearse y estudiarse dos genes en esta región, se encontró que *IL9R* mostraba la expresión bialélica característica de los genes de Xp/Yp (Vermeesch y cols, 1997), pero que el segundo gen *SYBL1* se inactivaba tanto en el cromosoma X inactivo como en el Y, por un mecanismo único de compensación de dosis génica (D'Esposito y cols, 1997) (Tabla 2).

Ciccodicola y cols. (2000) secuenciaron y analizaron una región de 330 270 bp de la PAR en Xq/Yq, encontrando que los dos genes previamente descritos eran característicos de dos distintas sub-regiones. Los dos segmentos difieren marcadamente en su contenido de GC y secuencias repetitivas y muestran formas diversas de expresión génica. La porción proximal contiene un segundo gen, *HSPRY3*, con el mismo patrón inusual de inactivación reportado para *SYBL1*. La porción distal, además del gen *IL9R* contiene un gen embebido en la región rica en GC adyacente a los repetidos teloméricos TTAGGG, llamado *CXYorf1* y que al igual que *IL9R* escapa a la inactivación del cromosoma X (Tabla 2).

Se ha sugerido que las 320 kb de la PAR2 fueron duplicadas en el cromosoma Y recientemente durante la evolución de los primates. La comparación de las dos regiones propuestas con los homólogos de los genes de la PAR2 en otras especies de mamíferos, lemur, gato y wallaby, permitió establecer que ninguno de los genes humanos de las PAR1 y 2 colocalizan en el genoma marsupial, por lo que evolucionaron independientemente. El gen *SYBL1* es el único que en todas las especies se localiza en el cromosoma X, por lo que debe ser parte del par ancestral. *HSPRY3* también se encuentra en el X de los euterios, pero no en el de los marsupiales y debe haber sido adicionado al X hace 70-130 millones de años, sugiriéndose que al menos debieron de ocurrir dos adiciones subsecuentes durante la evolución de la PAR2 y además presentarse dos inversiones para obtener el orden de los genes en el cromosoma X humano. Este complicado proceso evolutivo apoya la idea de que los rearreglos inter cromosómicos terminales son comunes en regiones no apareadas durante la meiosis (Charchar y cols, 2003).

## INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X

La inactivación de uno de los cromosomas X en las hembras de mamíferos es necesaria para asegurar la expresión de los genes ligados al X en igual dosis en relación con el sexo masculino. Este proceso de inactivación está acoplado con la diferenciación celular durante la embriogénesis y generalmente puede inactivarse al azar el X paterno o el X materno, durante el estado de blastocisto y la progenie de cada una de estas células mantiene el mismo cromosoma X inactivo, es decir la inactivación es clonal (Heard, y cols, 1997).

Las islas CpG localizadas en los promotores de la mayoría de los genes del cromosoma X inactivo, incluyendo las de genes de mantenimiento como *HPRT*, *G6PD* y *PGK1*, se encuentran metiladas (Kass y cols, 1997). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en muchos de estos genes, el silenciamiento transcripcional precede a la metilación (Brockdorf, 2002), por lo que parecería que ésta es responsable de mantener el estado inactivo más que de iniciarlo. El proceso de inactivación se inicia con la expresión del gen *XIST* (*X inactive specific transcript*), localizado en el centro de inactivación del cromosoma X (XIC) en Xq13.2 (Brown y cols, 1991). Este gen se encuentra desmetilado en el cromosoma X inactivo y metilado en el cromosoma activo (Heard y cols, 1997). Sin embargo, parecería que la presencia del centro de inactivación y la expresión del gen *XIST* no es necesaria para mantener el estado inactivo (Brown y Willard, 1994; Csankovsky y cols, 1999). En las células totipotenciales de ratón en que se han eliminado ambas copias del gen *Dnmt1*, que codifica para la DNA metiltransferasa de mantenimiento, se observa la expresión del gen *Xist*, normalmente inactivo en el cromosoma X de los machos (Panning y Jaenisch, 1996).

El producto del gen *XIST* es un RNA que cubre *in cis* un cromosoma X y desencadena una serie de eventos que conducen a la inactivación (Clemson y cols 1996). El primero de ellos es la metilación en K9 de la histona H3 (Avner y Heard, 2001; Mermoud y cols, 2002), conforme se acumulan los RNA de *Xist* se observa la represión transcripcional de genes ligados al cromosoma X, posteriormente existe una hipoacetilación global de la histona H4 (Keohane y cols, 1996; Csankovszki y cols, 2001) y la incorporación de la macro histona H2A en los nucleosomas (Chadwick y Willard, 2001; 2002). La metilación de las islas CpG es el evento final (Brockdorf, 2002), y parecería ser el mecanismo responsable de mantener apagado

transcripcionalmente casi todo el cromosoma. El estado de metilación del cromosoma X inactivo es preservado durante su replicación por ambos tipos de DNA metil transferasas, de mantenimiento y de *novο* (DNMT1 y DNMT3 respectivamente) (Boumil y Lee, 2001; Brockdorf, 2002).

No tener un cromosoma X funcional o poseer más de uno activo es letal para las células diploides de ambos sexos (Tagaki y Abe, 1990), es por ello que sólo un cromosoma X debe ser protegido de la inactivación promovida por el gen *XIST*. Esto es logrado reprimiendo su expresión en el X presente en los individuos masculinos y en el X de las hembras que permanecerá activo. El escoger que alelo de *XIST* será reprimido es generalmente al azar en las hembras de los mamíferos euterios. Sin embargo, en la placenta del ratón, la inactivación está improntada, el cromosoma X paterno se encuentra inactivo y el materno activo (Migeon, 1994). El alelo materno de *Xist* está reprimido siempre protegiendo al cromosoma materno de la inactivación (Lee 2000). En el Xic existe otro gen *Tsix*, el cual se transcribe en forma antisentido a *Xist* abarcándolo en toda su longitud (Lee y cols, 1999) y contiene también una isla CpG que se encuentra metilada en el cromosoma X activo (Debrand y cols, 1999). Este gen parecería ser el responsable de regular el proceso de inactivación y de escoger que cromosoma X será inactivado en las hembras de ratón. *Tsix* parece ser un antagonista de *Xist* en la placenta de ratón y en el proceso de inactivación al azar en el resto de los tejidos (Boumil y Lee, 2001). Sin embargo, recientemente se identificó el homólogo humano, *TSIX* que carece de isla CpG y cuyo transcrito solo abarca los exones 5-8 del gen sentido. Estas diferencias hicieron pensar que fuera poco probable que *TSIX* regule el proceso de inactivación reprimiendo a *XIST*, lo cual fue demostrado por Migeon y cols (2002) por lo que parecería que el proceso para escoger cual cromosoma X será inactivado es diferente en el humano.

Shibata y Lee (2003), a partir de la cuantificación y caracterización de los transcritos de *Tsix* encontraron que: (a) en células embrionarias totipotenciales la concentración de RNA de *Tsix* es 10 a 100 veces mayor que la de *Xist*, (b) sólo 30-60% del RNA de *Tsix* es procesado a partir de las uniones exón-intrón conocidas y (c) que existen formas de *Tsix* heterogéneas por un procesamiento alternativo en el extremo 5' y la mayoría de las variantes comprenden una región de 1.9 kb complementaria entre los transcritos sentido y antisentido. Estos datos plantean la posibilidad de diferentes funciones para los transcritos antisentido postulándose que es probable

que los dominios funcionales de *Tsix* correspondan al extremo 5', lo cual permite sugerir que los transcritos humanos de *TSLX* pudieran tener alguna función análoga a las propuestas para el del ratón, ya sea por la región del transcrito que es complementaria a los exones 5-7 de *XIST* o simplemente ejerciendo su acción represiva por la transcripción antisentido *per se*.

Recientemente se encontró que el producto proteico del gen tumor supresor *BRCA1* colocaliza con marcadores del cromosoma X inactivo en células somáticas femeninas y que se asocia con el RNA de *XIST*. Los tumores de mama y ovario que carecen de alelos funcionales de *BRCA1* muestran defectos en la estructura de la cromatina del cromosoma X inactivo (Ganesan y cols, 2002). El uso de microarreglos en tumores asociados a *BRCA1* reveló la sobreexpresión de genes ligados al cromosoma X en comparación con tumores esporádicos o con mutaciones en *BRCA2* (Jazaeri y cols, 2002). Estos datos apoyan la participación de *BRCA1* en la inactivación del cromosoma X y plantean la necesidad de conocer la forma en que *BRCA1* y otras proteínas interaccionan con el RNA de *XIST* para regular específicamente las modificaciones en la estructura de la cromatina que llevan a la inactivación del cromosoma X. Por otra parte, se desconocen las implicaciones que tiene en el proceso neoplásico la pérdida de heterocigocidad del gen *BRCA1* que conlleva a la reactivación de genes del X (Stone y cols, 2003).

En la región pseudoautosómica Xp/Yp todos los genes analizados escapan a la inactivación del cromosoma X, al igual que un buen número de genes localizadas en regiones específicas de los brazos cortos y largos del X y que como ya se mencionó, en su mayoría tienen o tuvieron homólogos funcionales en el cromosoma Y (Figura 1). Sin embargo, de los cuatro genes de las PAR en Xq/Yq, sólo dos de ellos escapan a la inactivación, *IL9R* y *CXYorf1*, mientras que los más centroméricos, *H-SPRY3* y *SYBL1*, son inactivados tanto en el X como en el Y (Ciccodicola y cols, 2000). La inactivación epigenética de *SYBL1* por metilación del DNA fue sugerida por el hecho de que es posible reactivar los alelos silenciados en células somáticas híbridas empleando un agente desmetilante como 5-aza-deoxicitidina (Huber y cols, 1999) y por la observación de su expresión bialélica en pacientes con síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad cromosómica y anomalías faciales) debido a mutaciones en el gen *DNMT3B* (Xu y cols, 1999; Hansen y cols, 2000). Recientemente se demostró que tanto las modificaciones específicas de las histonas, metilación en K9 de H3, hipoacetilación de H3 y H4 y la metilación de citosinas actúan sinérgicamente para reprimir la transcripción de *SYBL1* tanto en el

cromosoma X inactivo como en el Y. Sin embargo, aún cuando los mecanismos epigenéticos de mantenimiento del estado silente parecen ser los mismos, aparentemente se requieren procesos diferentes para establecerlo en las células somáticas femeninas y masculinas. La inactivación de los alelos del cromosoma Y parece ser independiente de *XIST* (Matarazzo y cols, 2002).

El mecanismo por el cual algunos genes ligados al cromosoma X escapan al silenciamiento mediado por el RNA *Xist/XIST* en el ratón y humano continua siendo un misterio. Las técnicas de FISH no tienen la resolución suficiente para determinar si los genes que se mantienen activos se encuentran cubiertos por el RNA *Xist*. Sin embargo, parecería que los RNA *Xist/XIST* no cubren uniformemente al cromosoma X inactivo y que el RNA está ausente en la heterocromatina constitutiva (Clemson y cols, 1996, Duthie y cols, 1999). Los promotores de los genes inactivos pueden ser aislados de la cromatina del Xi empleando anticuerpos contra la histona H3 metilada en K9, no así los de genes que escapan a la inactivación (Boggs y cols, 2002). Por el contrario los promotores de los genes que evaden a la inactivación pueden ser precipitados contra la H3 metilada en K4 (Boggs y cols, 2002), lo cual es consistente con la presencia de metilación en K9 en cromatina transcripcionalmente inactiva y en K4 en la cromatina activa (Jenuwein y Allis, 2001). Esta correlación se presenta también en los genes transcripcionalmente activos de la PAR1, de ratón y humano, en donde los promotores se encuentran metilados en H3K4 y acetilados en la histona H4 (Jeppesen y Turner, 1993; Boggs y cols, 2002). La región Xp11.2-3 que contiene un grupo de genes que escapan a la inactivación, y la región homóloga en el ratón A2 tienen el mismo patrón de modificación de histonas que la PAR (Jeppesen y Turner, 1993; Boggs y cols, 2000). Además, las regiones que escapan a la inactivación no muestran una replicación tardía ni metilación en los dinucleótidos CpG de sus regiones promotoras (Torchia y cols, 1994; Carrel y cols, 1996). Todos estos datos indican que la cromatina de los genes activos del Xi no tiene la misma estructura que en los genes silenciados, y permite suponer que deben existir elementos en cis que determinen cuando *Xist* debe mediar la inactivación de una región particular del cromosoma X (Plath y cols, 2002).

Los genes que escapan a la inactivación tienden a encontrarse agrupados, sugiriéndose que su expresión puede ser controlada a nivel de dominios de cromatina (Carrel y cols, 1999). Ha sido demostrada la existencia de elementos limitantes o aislantes en el DNA que separan regiones de cromatina diferencialmente regulada (Chung y cols, 1993; Bell y cols, 2001; Norma y cols,

2001). Los elementos limitantes podrían jugar un papel similar aislando a los genes que escapan a la inactivación del ambiente heterocromático del Xi. Recientemente se sugirió que la presencia de secuencias *LINE* (*long interspersed nuclear elements*) promueven la extensión del RNA de *Xist*, debido a que estas secuencias son particularmente abundantes en el cromosoma X en comparación con los autosomas (Lyon, 1998). Sin embargo, transgenes de cDNA *Xist* pueden cubrir y silenciar regiones cromosómicas pobres en LINE, indicando que éste no es un requisito indispensable para el silenciamiento (Migeon y cols, 2001; Plath y cols, 2002).

## **LA MEIOSIS Y LOS CROMOSOMAS SEXUALES HUMANOS**

### **Generalidades sobre el proceso meiótico**

La meiosis es el mecanismo que asegura la producción de gametos funcionales. Para ello, existen mecanismos reguladores intrínsecos de los meiocitos que aseguran que el programa secuencial de eventos necesarios sea ejecutado correctamente. Los mecanismos intrínsecos, además responden a factores que se originan a partir del entorno ambiental de las células germinales. En los organismos multicelulares, tales señales pueden generarse en las células somáticas gonadales o ser hormonas liberadas por células localizadas a distancia (Kohli y Hartsuiker, 2001).

La meiosis produce espermatozoides y óvulos con exactamente la mitad del número cromosómico de las células que dan lugar a gametos. Para asegurar que cada gameto tenga una copia de cada par cromosómico, las células diploides emplean cuatro procesos específicos de meiosis (Champion y Hawley, 2003; Petronczki y cols, 2003).

1. Los cromosomas homólogos son unidos por alineamiento homólogo, esto es, la asociación física (apareamiento) y la formación de la sinapsis mediante el ensamblado de una estructura proteica, el complejo sinaptonémico.
2. Los pares de homólogos son mantenidos unidos a través del proceso de recombinación recíproca meiótica resuelta como entrecruzamientos y que culmina con la formación de quiasmas.
3. La orientación de los dos centrómeros de cada bivalente hacia polos opuestos del huso en formación, que junto con la inhibición de la separación de las cromátidas hermanas,

asegura la separación de los dos homólogos y la reducción del número cromosómico durante la primera división meiótica.

4. Después de la meiosis I, los cromosomas realizan una división tipo mitosis, sin replicación del DNA.

Basándose en los estudios citogenéticos iniciales, parecía razonable asumir que la sinapsis era necesaria para que se realizara el entrecruzamiento. Esto fue apoyado por el hallazgo de una mutante de *Drosophila melanogaster*, (*c(3)G*), que bloquea tanto la formación del complejo sinaptonémico como la recombinación (Page y Hawley, 2001). Sin embargo, los estudios genéticos en *Saccharomyces cerevisiae*, realizados a principio de los 90, indicaron que la supresión mutacional del complejo sinaptonémico tenía consecuencias moderadas sobre la recombinación y la segregación (Rockmill y Roeder, 1990). De hecho, en *S. cerevisiae*, la recombinación es esencial para la formación del complejo sinaptonémico (Hawley y Arbel, 1993). Observaciones similares han sido reportadas en *Arabidopsis thaliana* y en mamíferos (Baudat y cols, 2000; Grelon y cols, 2001). No obstante, la recombinación no es necesaria para la sinapsis en los ovocitos de *Drosophila* o en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (McKim y Hayashi-Hagihara, 1998; Dernburg y cols, 1998). Estos datos apoyan que ambos procesos ocurran de manera independiente y que el orden en que se realizan depende del grado de evolución de cada especie. Lo que sí constituye un mecanismo universal es que la recombinación se inicia por rupturas de doble cadena en la molécula de DNA (DSB) generadas por la proteína Spo 11 en levaduras y sus homólogos en otros organismos (Hunter y cols, 2001; Mahadevaiah y cols, 2001; Champion y Hawley, 2003; Petronczki y cols, 2003). En la figura 2 se muestran los principales eventos que se ocurren durante la primera profase meiótica y que son relevantes para asegurar una segregación cromosómica correcta, tal como acontecen en levaduras y mamíferos.

### **Regulación de las meiosis femenina y masculina**

Las características básicas de la meiosis – dos divisiones celulares, sin la intervención de una replicación de la cromatina y la reducción a la mitad del número cromosómico – se han conservado a través de la evolución. Por lo que no es sorprendente que estas reglas se apliquen en los mamíferos, incluyendo a los humanos, tanto para la meiosis femenina como para la masculina. Sin embargo, existen detalles en los procesos meióticos que son marcadamente

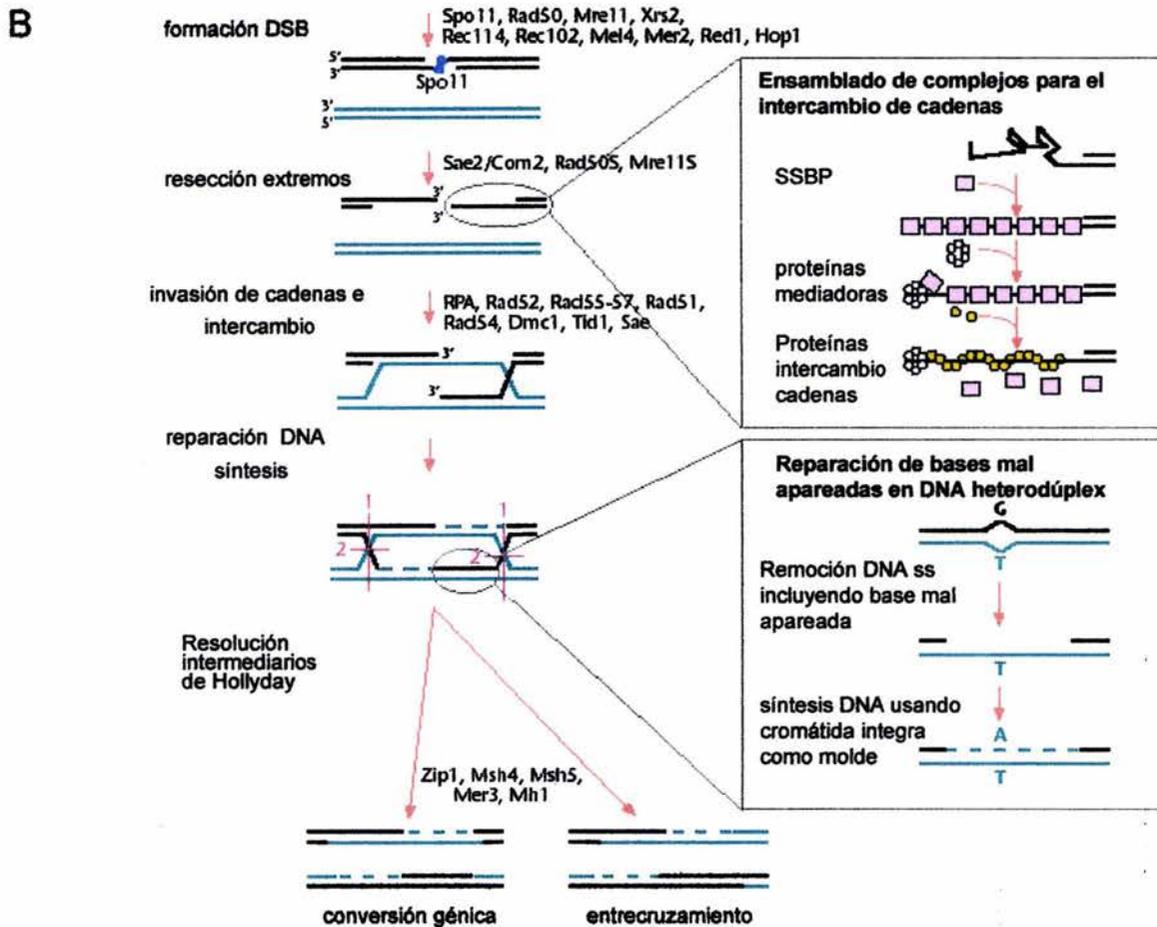
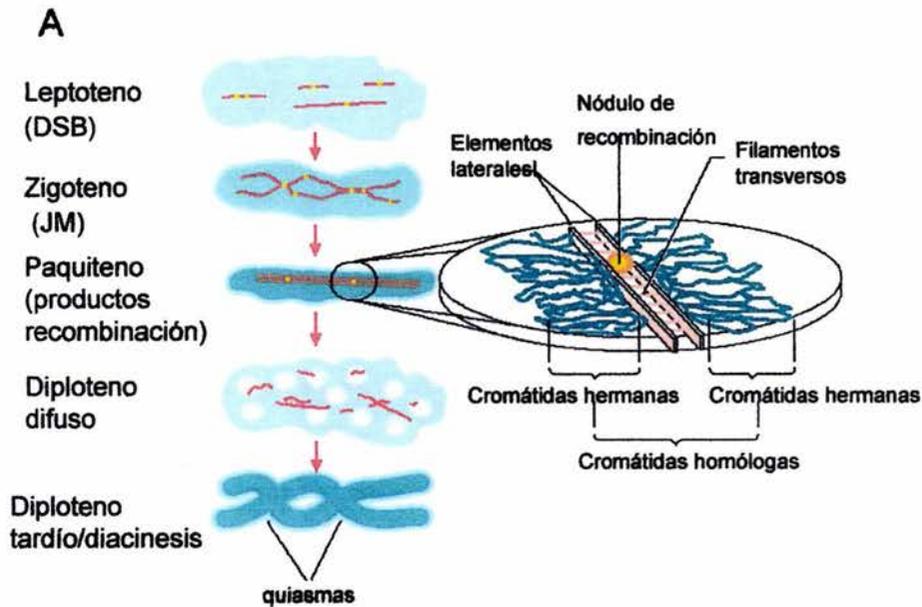


Figura 2. **A** Primera profase meiótica, eventos relevantes para la recombinación genética y formación de los quiasmas que aseguren la segregación cromosómica correcta.

**B** Mecanismo molecular de la recombinación meiótica, proteínas participantes en *S. cerevisiae* y su resolución como entrecruzamiento o conversión génica (modificado de Bishop, 2001 y Villeneuve y Hillers, 2001)

diferentes. La ovogénesis en los mamíferos se inicia durante el desarrollo fetal, y un número predeterminado de células germinales, se detiene al final de la profase I. La primera división se completa durante la ovulación, generando un ovocito secundario y el primer cuerpo polar. De estas células únicamente la primera continuará con la segunda división meiótica, que sólo será completada si la célula es fertilizada (Hunt y Hassold, 2002). Es por ello que la meiosis femenina requiere de señales específicas de inicio y alto (Duesbery y Van de Woude, 2002) e incluso puede durar varias décadas, como en el caso de los humanos. En contraste, la meiosis masculina es menos complicada, se inicia en la pubertad y es un proceso continuo, con espermatoцитos progresando desde la profase I hasta la segunda división en poco más de una semana (Hunt y Hassold, 2002).

Quizás la diferencia más importante entre ambos géneros en el humano sea la tasa de errores que ocurre en cada meiosis, ya que al menos 10-25% de todos los fetos son aneuploides (Hassold y Hunt, 2001). Los estudios realizados a partir de productos con las trisomías más frecuentes indican que aproximadamente 80-90% son el resultado de una no disyunción en la meiosis I materna. A pesar de que es posible que las aneuploidías de origen paterno sean preferentemente eliminadas, no existen evidencias de que exista una selección *in utero* para que sean discriminadas de acuerdo al origen parental. Sin embargo, es posible que las diferencias se originen durante la meiosis, lo cual es consistente con estudios directos en gametos humanos para detectar aneuploidías, donde más de 20% de los ovocitos y sólo 3-4% de los espermatoцитos presentan anomalías en el número cromosómico (Martín y cols, 1991; Griffin y cols, 1995; Spriggs y cols, 1996; Angell, 1997). De aquí que la meiosis femenina, en particular la MI parezca extraordinariamente susceptible a errores.

La vulnerabilidad de la meiosis femenina presumiblemente se origina por dos vías: ya sea por una ocurrencia mayor de errores o que los mecanismos de reconocimiento y corrección que eliminan a las células anormales sean menos eficientes que en la espermatogénesis. Existen dos puntos de control importantes que operan de manera estricta durante la meiosis masculina, uno de ellos es similar al que ocurre en la mitosis durante la transición metafase-anafase que monitorea el alineamiento correcto de los cromosomas en el huso. La existencia de este punto de control fue demostrada inicialmente en estudios en biopsias de testículo de individuos portadores de rearrreglos cromosómicos que mostraban un número significativo de univalentes en metafase I

y un decremento significativo o incluso total de metafases II (Chandley y cols, 1976; Chandley, 1988). De manera similar, en los ratones macho, las anomalías cromosómicas o defectos en genes específicos que generan cromosomas univalentes conducen a arresto en metafase I con muerte subsecuente de los espermatocitos (Hunt y Hassold, 2002). Sorprendentemente, el punto de control de metafase tiene una calidad de alta exigencia durante la meiosis masculina, y parece estar ausente en la meiosis femenina (Hunt y cols, 1995; LeMarie y cols, 1997; Roeder y Bailis, 2000; Miller y Therman, 2001). Esto ha sido demostrado en portadoras de rearrreglos cromosómicos que producen infertilidad en los varones o en cepas de ratonas expuestas a agentes que impiden la formación del huso o con mutaciones en genes que alteran la folículo-génesis y que no se asocian en ningún caso con arresto meiótico o retraso en la anafase (Hunt y cols, 1995; Le Marie y cols, 1997; Roeder y Bailis, 2000; Miller y Therman, 2001, Hodges y cols, 2002). En los ovocitos, la meiosis continúa, por lo que además las células que proceden a través de la MII presentan un incremento significativo en aneuploidías, indicando que el costo en la relajación en el control del ciclo celular se traduce en una reducción en la calidad genética de los gametos.

La falta del punto de control en metafase provee una explicación para el elevado rango de segregaciones cromosómicas anormales de meiosis I observado en las mujeres, surgiendo la interrogante de si esta diferencia está relacionada con la estructura del huso meiótico. En mitosis, el centrosoma de cada polo del huso es organizado alrededor de un centriolo. En la meiosis femenina, el centrosoma carece de centriolo. En la primera división después de la fusión del esperma y el óvulo, al menos uno de los dos centrosomas parece tener un centriolo de origen paterno. La ausencia de centriolo podría reflejar los cambios moleculares que contribuyen a la elevada frecuencia de no disyunción en la meiosis femenina (Tomado de Miller y Therman, 2001). Hodges y cols (2001) han sugerido que la presencia de remanentes del complejo sinaptonémico asociados con los cromosomas meióticos masculinos hasta la anafase II, a diferencia de lo que ocurre en la femenina, en la que los cromosomas pierden todas las proteínas del complejo sinaptonémico antes de que ocurra la primera división, podría estar implicada en la existencia mecanismos de segregación distintos en cada sexo y contribuir al alto grado de error en la meiosis femenina.

Además del punto de control en la formación del huso y en el alineamiento de los cromosomas que monitorea la transición metafase-anafase, existe un punto de control más temprano que monitorea el procesamiento de las DSB generadas para iniciar la recombinación y que se conoce como el punto control de paquiteno. Se ha sugerido que éste opera de manera similar al punto de control que detecta DNA dañado. En él el control es mucho más estricto en la meiosis masculina que en la femenina. Esto fue demostrado empleando varias cepas de ratones con mutaciones en los diferentes genes que participan en el proceso de recombinación, donde en general la meiosis se detiene más tempranamente en los machos que en las hembras, e incluso algunas mutaciones no alteran la fertilidad de estas últimas (Roeder y Bailis, 2000; Miller y Therman, 2001; Cohen y Pollard, 2001; Hunt y Hassold, 2002; Champion y Hawley, 2003). En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de estos trabajos indicando el punto de arresto durante la primera profase o la continuación del proceso meiótico en cada sexo.

### **Comportamiento de los cromosomas sexuales en las meiosis femenina y masculina**

El comportamiento de los cromosomas sexuales en las meiosis femenina y masculina en mamíferos muestra diferencias significativas. En la mujer ambos cromosomas X son equivalentes en tamaño y contenido génico y el apareamiento y recombinación meióticos pueden ocurrir teóricamente en cualquier sitio, comportándose de la misma manera que los autosomas. Sin embargo, los individuos masculinos presentan un X y un Y con diferencias en su tamaño y contenido génico. En los varones la recombinación sólo se lleva a cabo en las pequeñas regiones pseudoautosómicas (Rappold, 1993).

El apareamiento de los cromosomas humanos usualmente comienza en sitios muy cercanos a los telómeros (Lauri y Hultén, 1985). En los cromosomas X y Y el apareamiento se inicia en la PAR1, donde también tiene lugar el evento obligatorio de entrecruzamiento y la formación de únicamente un quiasma, indispensable para asegurar su segregación correcta. Este entrecruzamiento fue inicialmente observado citogenéticamente y posteriormente establecido siguiendo la segregación de alelos de RFLP en árboles genealógicos (Rouyer y cols, 1986; Page y cols, 1987). El apareamiento en los cromosomas sexuales no sólo se ha observado en la región distal de sus brazos cortos, sino que ocasionalmente se encuentran apareados también en los

**Tabla 3. Alteraciones en la meiosis por la presencia de mutaciones inducidas en estado homocigoto en el ratón. Diferencias en el efecto entre hembras y machos (Modificado de Hunt y Hassold, 2002)**

| Gen/estadio                   | leptoteno   | zigoteno | paquiteno | diploteno | diacinesis/MI | fertilidad                    |
|-------------------------------|---|----------|-----------|-----------|---------------|-------------------------------|
| <b>Recombinación</b>          |   |          |           |           |               |                               |
| <i>Spo11</i>                  | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea discontinua roja hasta el final] |          |           |           |               | ?                             |
| <i>DMC1</i>                   | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea discontinua roja hasta el final] |          |           |           |               | ?                             |
| <i>Mlh1</i>                   | [Barra negra que cubre leptoteno, zigoteno y paquiteno, luego una línea azul hasta el final]  |          |           |           |               | infértil                      |
| <i>Pms2</i>                   | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea azul hasta el final]             |          |           |           |               | fértil<br>espermias anormales |
| <i>Msh4</i>                   | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea discontinua roja hasta el final] |          |           |           |               | ?                             |
| <i>Msh5</i>                   | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea discontinua roja hasta el final] |          |           |           |               | ?                             |
| <b>Complejo sinaptonémico</b> |   |          |           |           |               |                               |
| <i>Scp3</i>                   | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea azul hasta el final]             |          |           |           |               | fértil                        |
| <b>Otros</b>                  |   |          |           |           |               |                               |
| <i>Ciclina A1</i>             | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea azul hasta el final]             |          |           |           |               | fértil                        |
| <i>Atm</i>                    | [Barra negra que cubre leptoteno, zigoteno y paquiteno, luego una línea azul hasta el final]  |          |           |           |               |                               |
| <i>Mei1</i>                   | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea discontinua roja hasta el final] |          |           |           |               | infértil                      |
| <i>Cpeb</i>                   | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea discontinua roja hasta el final] |          |           |           |               | Pocos espermias móviles       |
| <i>Mvh</i>                    | [Barra negra que cubre leptoteno y zigoteno, luego una línea azul hasta el final]             |          |           |           |               | fértil                        |

Las líneas negras representan los eventos en que la meiosis femenina y masculina son similares, las líneas naranja los eventos en las hembras y las azules en los machos; las líneas discontinuas indican que sólo sobrevive una proporción de células.

extremos distales de sus brazos largos (Chandley y cols, 1984; Speed y Chandley, 1990). Estos datos llevaron al descubrimiento de la PAR2 (Freije y cols, 1992).

La frecuencia de recombinación en la PAR situada en los brazos cortos es extremadamente alta en la meiosis masculina, siendo aproximadamente 10 veces mayor que la frecuencia normal de recombinación meiótica, lo cual probablemente se deba a que en la ovogénesis ocurre al azar, mientras que en la espermatogénesis es un sitio obligado (Hunt y LeMarie, 1992). Estudios de ligamiento tipificando espermatozoides han confirmado que en esta región existe una actividad recombinacional incrementada y que incluso pueden ocurrir en algunas ocasiones dos entrecruzamientos en una distancia física de aproximadamente 1 800 kb (Schmitt y cols, 1994). Aún cuando la recombinación en la PAR2 no es ni necesaria ni suficiente para la culminación de la espermatogénesis, su frecuencia es aproximadamente 6 veces mayor que en la meiosis femenina (Strachan y Read, 1999).

El apareamiento entre los cromosomas X y Y fue considerado de manera hipotética como un prerrequisito para que se complete la meiosis masculina (Burgoyne, 1982). Burgoyne y otros argumentaron que los espermatoцитos primarios, que contienen cromosomas sexuales univalentes, no producen espermatozoides funcionales. Estudios de segregación meiótica en ratones indican que todos los espermatozoides funcionales derivan de espermatoцитos con cromosomas X-Y que aparean y tienen un quiasma entre ellos (Keitges y cols, 1987; Cattnach y cols, 1990; Hale y cols, 1991; Burgoyne y cols, 1992). Igualmente se ha observado que la disociación X-Y conduce a esterilidad. En otras palabras, el entrecruzamiento obligado es una condición indispensable para la reproducción del individuo. Esto fue demostrado en cruces entre dos especies de ratones donde había 95% de disociación en híbridos llevando a esterilidad (Matsuda y cols, 1991; 1992; Burgoyne y cols, 1992). Individuos con anomalías estructurales de los cromosomas sexuales que no permiten el apareamiento y la recombinación entre ellos presentan azoospermia. De manera similar, una recombinación reducida frecuentemente provoca una segregación incorrecta produciendo aneuploidías (Quack y cols, 1988; Speed y Chandley, 1990; Hassold y cols, 1991; Mohandas y cols, 1992; Delobel y cols, 1998; Hassold y Hunter, 2001). Datos similares se han encontrado en estudios meióticos en individuos con cariotipos 47,XXY; 47,XXY/46,XY y 47,XYY, donde únicamente los espermatoцитos con un complemento cromosómico normal y cromosomas sexuales apareados pueden culminar la meiosis (Blanco y

cols, 1997 y 2001; Martín y cols, 2001; Bergere y cols, 2002). Estos datos demuestran que el control de la meiosis masculina sobre la formación de los quiasmas y el alineamiento correcto de los pares de homólogos es sumamente estricto y que en particular la meiosis es interrumpida por la presencia de cromosomas sexuales aquiasmáticos o univalentes (Roeder y Bailis, 2000; Hassold y Hunter, 2001; Miller y Therman, 2001; Champion y Hawley, 2003).

Los estudios meióticos en ovocitos XO de hembras de ratón demuestran que la presencia de un cromosoma univalente causa una severa disrupción durante la meiosis en los mamíferos, afectando el alineamiento y la segregación de otros pares de cromosomas, sin embargo, contrariamente a lo que ocurre en la meiosis masculina, la mayoría de los ovocitos reanuda la meiosis y culmina la primera división con la migración del univalente hacia un polo o con su división ecuacional (Hunt y cols, 1995). Por el contrario, en estudios realizados en embriones humanos (de 15 a 20 semanas de gestación) con complemento 45,X se encontró apoptosis masiva de los ovocitos, lo cual sugiere que aunque la apoptosis es un evento que ocurre normalmente durante el desarrollo de las células germinales femeninas, la presencia de un cromosoma X univalente la acelera y probablemente conduce a la disgenesia gonadal (Modi y cols, 2003).

Ocasionalmente el entrecruzamiento obligado entre el X y el Y en la meiosis masculina ocurre fuera de la PAR1 (recombinación ilegítima); en estos casos genes localizados en el límite de la región pseudoautosómica (*PABY*) tales como *SRY*, el cual se localiza proximal a sólo 5kb del límite de las regiones pseudoautosómicas en Xp/Yp (Sinclair y cols, 1990), pueden ser transferidos al cromosoma X. Esta recombinación ilegítima resulta en varones 46,XX (Page y cols, 1985; Petit y cols, 1987) y el producto recíproco es un cromosoma Y que carece de *SRY* tal como se ha encontrado en algunas mujeres con disgenesia gonadal pura 46, XY. (Levilliers y cols, 1989) Se ha sugerido que el “atrapamiento” de los cromosomas sexuales en el cuerpo XY contribuya, facilitando que se extienda el área de recombinación, y que en realidad no sólo lleve a cabo un intercambio no homólogo, sino que se presente un evento de translocación no balanceada entre los cromosomas sexuales (Stalvey y cols, 1989). Al parecer, los eventos de recombinación ilegítima o translocación son facilitados por la presencia de secuencias Alu y otros elementos repetitivos dispersos en ambos cromosomas sexuales, que proveen sitios de recombinación homóloga (Rouyer y cols, 1987; Erlandsson y cols, 2000). Aproximadamente un

tercio de los varones XX (*SRY*+) y mujeres XY (*SRY*-) se deben a intercambios anormales entre los genes *PRKY* y su homólogo *PRKX* localizados relativamente distantes de la PAR1, ~ 7Mbp, pero que muestran una gran homología, lo cual probablemente explique la frecuencia elevada de recombinación ectópica que no ocurre en otros pares de genes homólogos como *ZFY/ZFX* y *AMELY/AMELX* (Schiebel y cols, 1997).

### **Reactivación e inactivación meiótica de los cromosomas sexuales**

Otro aspecto en que difiere el comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales en varones y mujeres es que en los ovocitos primarios se requiere de la presencia de los dos cromosomas X activos para que se pueda realizar el apareamiento y la recombinación entre ellos para asegurar su correcta segregación (Gartler y cols, 1975; Kratzer y Chapman, 1981). El cromosoma X inactivo debe ser reactivado para que se pueda dar el apareamiento y recombinación entre ellos. Esta reactivación parece ocurrir en los ovocitos poco antes del comienzo de la meiosis, observándose transcripción en ambos cromosomas X y que ninguno muestra un comportamiento heteropicnótico (Miller y Therman, 2001). En cambio, en los espermatozoides primarios, los cromosomas sexuales se observan heteropicnóticos de zigoteno a diploteno, lo cual indica un estado de condensación de su cromatina e inactivación transcripcional (Hunt y LeMarie, 1992).

La presencia de un cuerpo densamente teñido en el núcleo de los espermatozoides de mamíferos durante la profase I fue observada inicialmente por Lenhossek a finales del siglo XIX. Subsecuentemente esta estructura fue identificada como el par de cromosomas sexuales altamente condensado (Painter, 1924). Originalmente se le llamó vesícula sexual, sin embargo ahora se conoce como cuerpo sexual o XY, debido a que no está rodeado de membrana (Solari, 1974). La condensación de la cromatina del X y del Y se inicia en zigoteno tardío y en paquiteno, en el cual es visible una clara organización en bouquet y todos los pares homólogos se encuentran completamente alineados, la cromatina sexual forma una estructura esférica fácilmente distinguible al microscopio óptico (Solari, 1974). En diploteno, los cromosomas sexuales dejan de mostrarse heteropicnóticos y durante diploteno-metafase I, el cuerpo X-Y parece similar a los bivalentes autosómicos, excepto por su estructura asimétrica (Therman y Susman, 1993).

En paquiteno temprano, aproximadamente un tercio del cromosoma Y está implicado en la formación del complejo sinaptonémico con la porción distal de Xp (Moses y cols, 1975; Solari,

1980). En general se supone que el apareamiento implica el tercio distal de Xp y casi todo Yp por arriba del centrómero (Moses y cols, 1975). En el ratón, el X y el Y aparecen por los extremos distales de sus brazos largos, al igual que en el chimpancé, mientras que en el orangután y el gorila ocurre de manera similar al humano. La evolución del cromosoma Y puede inferirse a través del estudio de las variaciones en el comportamiento en el apareamiento de los cromosomas sexuales en mamíferos (revisado en Schempp y Toder, 1993).

La inactivación de los cromosomas sexuales, MSCI, (*meiotic sex chromosome inactivation*) es el proceso por el cual los cromosomas X y Y de los espermatocitos primarios son inactivados transcripcionalmente; la forma asociada de los cromosomas XY heteroplicnóticos o cuerpo XY ha sido considerada como la manifestación morfológica de este proceso (Solari, 1974; McKee y Handel, 1993). Sin embargo, poco se conoce de las bases moleculares o de la función biológica de la MSCI. Lifschytz y Lindsley sugieren que ciertos genes ligados al sexo podrían ser inhibidores de la espermatogénesis y que la MSCI sirve para silenciarlos (Lifschytz y Lindsley, 1972). Otros autores la consideran como la desafortunada consecuencia de la necesidad de una máscara para ocultar las regiones que no se encuentran en sinapsis de los cromosomas sexuales, ya sea para evitar el punto de control que detecta los defectos en la sinapsis de los cromosomas e induce la muerte de las células germinales (Jablonka y Lamb, 1988; Odorisio y cols, 1998), para prevenir la iniciación de los eventos de recombinación ilegítimos que dañen las regiones diferenciales de los cromosomas X-Y. (McKee y Handel, 1993), o para asegurar que la sinapsis entre los cromosomas sexuales sea eficiente (Turner y cols, 2000b).

El cromosoma X inactivo de las células somáticas femeninas y el de las células germinales masculinas comparten algunas características como la replicación tardía (Kofman-Alfaro y Chandley, 1970) y el enriquecimiento para la histona macroH2A1.2 (Hoyer-Fender y cols, 2000). Estos datos llevaron a proponer que la MSCI debía ocurrir por un mecanismo semejante al que produce la inactivación del X en las células somáticas femeninas. En el ratón macho, la expresión de *Xist* está restringida al testículo, el sitio donde la MSCI tiene lugar (Richler y cols, 1992; Salido y cols, 1992b, McCarrey y Dilworth, 1992), además, Ayoub y cols (1997) reportaron que el RNA de *Xist* cubre los ejes de los cromosomas X y Y en el cuerpo sexual de los espermatocitos en paquiteno. Estos investigadores propusieron que la MSCI es

mediada por el transcrito de *Xist* y que debía extenderse desde el cromosoma X hasta el cromosoma Y, vía la región del apareamiento XY (Ayoub y cols, 1997).

En contra del mecanismo común propuesto, existen trabajos con ratones que presentan mutaciones dirigidas en *Xist* que no afectan la fertilidad masculina, pero que si alteran la inactivación somática en las hembras (Marahrens y cols, 1997; Csankovaszki y cols, 1999). También, se demostró que la falta de *Xist* impide la localización de la histona macro H2A1.2 en el cromosoma X de las células somáticas femeninas, pero no en el cuerpo sexual (Csankovaszki y cols, 1999). Recientemente, Mc Carrey y cols (2002) y Turner y cols (2002) comprobaron que la inactivación del cromosoma X durante la espermatogénesis es independiente de *Xist/Tsix*, en ratones con disrupciones dirigidas de *Xist* y midiendo la expresión de ambos transcritos tanto en las cepas silvestres como en las que portan las mutaciones. Ambos grupos demostraron que el cuerpo XY se forma de manera normal en los ratones macho *Xist*<sup>-</sup> (Mc Carrey y cols, 2002; Turner y cols, 2002). Se ha propuesto que la expresión de *Xist* y *Tsix* en los meiocitos masculinos podría ser el resultado de una transcripción ilegítima, resultado de la desmetilación que ocurre en la línea germinal, misma que se ha sugerido es responsable de la expresión improntada del alelo paterno (Norris y cols, 1994; Turner y cols, 2002). Además en contraste con la situación presente en los tejidos femeninos, la expresión del gen *Xist* en testículo de ratón es muy baja y no correlaciona temporalmente con la formación del cuerpo XY (Richler y cols, 1992; Salido y cols, 1992b; Mc Carrey y Dilworth, 1992). Asimismo, el mantenimiento de la inactivación del cromosoma X en los espermatoцитos parece no implicar la desacetilación de la histona H4 (Armstrong y cols, 1997), ni la metilación de las islas CpG (Bernardino y cols, 2000), como ocurre en las células somáticas femeninas.

Los mecanismos moleculares que controlan la formación del cuerpo XY parecen ser diferentes de aquéllos que participan en la inactivación del cromosoma X en las células somáticas de las hembras de mamíferos. Aún cuando estos mecanismos se desconocen, diferentes investigaciones permiten sugerir que su formación no es una propiedad intrínseca de los cromosomas sexuales, y que puede ser controlada en *trans* por factores originados a partir de los autosomas o aún por eventos que ocurren fuera de las células meióticas (Smith y Benavente, 1995; Turner y cols, 2000b). La condensación de los cromosomas sexuales para formar el cuerpo sexual es probablemente mediada por la asociación de proteínas específicas a la cromatina y por

modificaciones diferenciales de las histonas, tales como, fosforilación, ubiquitinización, metilación o acetilación (Baarends y cols, 1999; Strahl y Allis, 2000; Turner y cols, 2000b). Algunas proteínas como las histonas macro H2A1.2 (Hoyer-Fender y cols, 2000) y H2AX, en su forma fosforilada  $\gamma$ -H2AX (Mahadevaiah y cols, 2001), junto con la proteína XMR (Escalier y Garchon, 2000) se localizan preferentemente en la cromatina de los cromosomas sexuales de los espermatocitos en zigoteno tardío/ paquiteno temprano, esto es durante los estadios iniciales de condensación; lo que hace a estas proteínas fuertes candidatos para jugar una función en el inicio de la remodelación de la cromatina. En paquiteno tardío/ diploteno temprano, la proteína heterocromática HP1 $\beta$  (M31), además de encontrarse en su localización habitual pericentromérica, se encuentra concentrada en el cuerpo XY (Motzkus y cols, 1999, Turner y cols, 2001), lo que corresponde con su naturaleza heterocromática. Las proteínas M31/H2A1.2 se localizan también en la PAR1 desde paquiteno y persisten hasta diploteno, por lo que se ha propuesto que participen tanto en mantener la cohesión entre las cromátidas hermanas, como en prevenir una separación prematura del par X-Y (Turner y cols, 2001). Otras proteínas como Suv39h interactúan con M31 (Aargard y cols, 1999) y la isoforma específica de testículo, Suv39h2 se localiza en el cuerpo sexual (O'Carroll y cols, 2000), lo que la hace candidata para participar también en el proceso de MSCI.

Además de estas proteínas con una función putativa en los procesos de condensación y heterocromatización existe todo un catálogo de proteínas que se acumulan en la cromatina de los gonosomas. Algunas proteínas específicas del cuerpo XY en el ratón son: la proteína XY40 (Smith y Benavente, 1992) y la proteína XY77 (Kralewski y cols, 1997) que están asociadas con los ejes de los cromosomas sexuales pero no se encuentran en las asas de cromatina y quizá estén implicadas en enmascarar a los cromosomas X-Y, aunque no se encuentran en el inicio del proceso de la inactivación. Por otra parte, la proteína p51 está distribuida a través del cuerpo XY y en los centrómeros de los autosomas, lo que sugiere una función en el bloqueo de los eventos de transcripción y recombinación durante la gametogénesis (Smith y Benavente, 1995).

Turner y cols (2000b) describieron otra proteína asociada con los cromosomas sexuales durante la meiosis masculina, la proteína ASY o proteína asináptica. Esta molécula no tiene relación con la MSCI, pero parecería ser específica de la cromatina asináptica de las regiones no homólogas X-Y y tener una función en el punto de control de paquiteno. La presencia de esta

proteína en el cuerpo XY parecería evitar la activación en paquitene tardío del punto de control que remueve las células que presentan sinapsis incompleta a través de una vía apoptótica independiente de p53. Asimismo, Turner y cols (2000b) proponen que debido a que la MSCI inicia antes de entrar a la profase meiótica y por lo tanto, previo a la búsqueda de homología; el cuerpo XY enmascara las regiones no homólogas de los cromosomas sexuales originando una asinapsis entre ellos y disparando a su vez la sinapsis de los demás cromosomas. De esta manera actúa como un punto de control de la sinapsis.

Fernández-Capetillo y cols (2003) encontraron que la  $\gamma$ -H2AX, cuya acumulación en el cuerpo XY es independiente de las rupturas de doble cadena asociadas con la recombinación meiótica (Mahadevaiah y cols, 2001) es requerida para el remodelamiento de la cromatina y la MSCI en la meiosis en el ratón macho. Los ratones deficientes en esta proteína presentan una falla en iniciar la condensación de los cromosomas sexuales para formar el cuerpo XY y exhiben severos defectos en el apareamiento meiótico. Además proteínas como la macro H2A1.2 no se localizan preferentemente en el cuerpo XY en ausencia de H2AX, lo cual indica una clara función de esta proteína en la MSCI y muy probablemente del cuerpo XY en el control de la meiosis masculina (Fernández-Capetillo y cols, 2003).

Cuando se forma el cuerpo XY, la cromatina de los cromosomas X y Y es transcripcionalmente inactiva, como lo evidencia el hecho de que no existe incorporación de uridina tritiada y la exclusión de la RNA polimerasa II del cuerpo XY (Monesi, 1965a; 1965b; Wiltshire y cols, 1998; Turner y cols, 2000b). Sin embargo, la PAR1 probablemente escape a esta inactivación (Raman y Das, 1991). En contraste con las NRY y NRX, los autosomas en este estadio se encuentran descondensados y son transcripcionalmente activos presentando una configuración accesible a nucleasas (Solari, 1974; Wiltshire y cols, 1998). La MSCI asociada con el cuerpo sexual se refleja como una marcada regulación a la baja de varios transcritos ligados al X y al Y (Mc Carrey y Dilworth, 1992; Mc Kee y Handel, 1993; Mahadevaiah y cols, 1998; Odorisio y cols, 1998). Concomitante con este silenciamiento transcripcional, los “respaldos” autosómicos de varios genes ligados al cromosoma X son activados para mantener las funciones metabólicas esenciales en ausencia de sus contrapartes silenciadas (McKee y Handel, 1993).

Otro aspecto interesante de la meiosis masculina es el proceso de compactación y extensión de los ejes de los cromosomas sexuales. Al estudiar el comportamiento del cromosoma Y en células testiculares humanas (germinales y de Sertoli) usando hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es posible correlacionar la actividad de genes localizados en dicho cromosoma con el grado de compactación de la cromatina (Speed y cols, 1993). Los resultados de este estudio indican que debe ejercerse algún control de la espermatogénesis vía células de Sertoli en el testículo adulto y no ser autónomo de las propias células germinales. El eje del cromosoma Y en las células de Sertoli adultas se encontraba grandemente expandido comparado con el visto en las células de Sertoli fetales y neonatales. Esto mismo había sido observado en el ratón (Guttenbach y cols, 1993). Además un cromosoma Y expandido fue observado únicamente en células germinales prepuberales y exclusivamente en el estadio de zigoteno de la profase meiótica en adultos. En todos los demás estadios de las células germinales en el testículo adulto, el eje del Y estaba contraído. De aquí se sugiere que un eje extendido del cromosoma Y debe ser un prerrequisito para el apareamiento y entrecruzamiento en la PAR1, lo que asegura la supervivencia de las células germinales (Speed y cols, 1993).

Estudios realizados utilizando una sonda para pintar el cromosoma X demostraron que durante la primera profase meiótica, el eje de este cromosoma se encuentra extendido en zigoteno, compactándose posteriormente en paquiteno para formar el cuerpo XY. En las células somáticas del testículo adulto normal, el cromosoma X se encuentra totalmente expandido, contrariamente a lo observado en las células testiculares de los pacientes con síndrome de sólo células de Sertoli (Kofman-Alfaro y cols, 1994). En estos pacientes ambos cromosomas sexuales se encuentran extremadamente compactados. Estos datos sugieren una asociación entre la falla en la expansión de los ejes de los cromosomas sexuales y la pérdida del control genético de las células germinales en el testículo adulto, proponiendo que en algunas facetas de la espermatogénesis, las células germinales no son autónomas y que el control de ellas puede emanar de las células de Sertoli (Speed y cols, 1993; Kofman-Alfaro y cols, 1994). En un trabajo posterior, Chandley y Speed encuentran que aunque el cromosoma Y está condensado en las células de Sertoli prepuberales, está muy expandido en las células germinales primordiales y que la expansión del Y en las células de Sertoli coincide con la aparición de espermátidas en el epitelio germinal del ratón (Chandley y Speed, 1995). Asimismo, Armstrong y cols (1994), estudiando también el comportamiento meiótico de los cromosomas sexuales mediante FISH,

proponen que el tiempo de apareamiento y segregación del par de cromosomas sexuales es diferente y mucho más precoz comparado con los autosomas y que esto podría explicar la elevada incidencia de aneuploidías de los cromosomas sexuales en espermatozoides.

La espermatogénesis en mamíferos está controlada de forma estricta en un gran número de eventos moleculares y celulares específicos. Este control implica tanto mecanismos endócrinos como parácrinos. La estimulación endocrina de la espermatogénesis se da por las hormonas estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH), esta última actuando a través de la testosterona, producida por las células de Leydig en el testículo. Debido a que las células germinales no tienen receptores para FSH y testosterona, las señales hormonales son transducidas a través de las células de Sertoli. La regulación se da por las interacciones entre las células de Sertoli y un programa elaborado de cambios en la estructura de la cromatina y la expresión génica de las células germinales. En los últimos años se han acumulado diferentes evidencias para demostrar que las células de Sertoli no sólo intervienen como soporte estructural y nutricional, sino que además existe una íntima comunicación entre ellas y las células germinales con un tráfico bidireccional de señales, en donde cada tipo celular participa en la regulación de las funciones del otro (de Kretser y cols, 1998; Jamieson y cols, 1998; Kramer y cols, 1998; Cheng y Mruk, 2002; Eddy, 2002; Tanaka y cols, 2002; Shinohara y cols, 2003).

La presencia de microdeleciones del cromosoma Y en algunos pacientes infértiles con síndrome de sólo células de Sertoli provee evidencias adicionales de la íntima inter-regulación entre las células germinales y las células de Sertoli, proponiéndose que la pérdida de algunos genes del cromosoma Y puede afectar tanto el desarrollo de las células germinales como la función de las células de Sertoli. En cambio, en otros pacientes o en aquéllos sin deleciones del Y, anomalías específicas de las células germinales alteran parcialmente la función de las células de Sertoli (Foresta y cols, 1998; 2001; Kleiman y cols, 2001; Luetjens y cols, 2002).

## ORIGEN Y MECANISMOS DE PRODUCCIÓN DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER

El síndrome de Turner es un desorden cromosómico, con una frecuencia de 1-2% en los embarazos clínicamente reconocibles y de una en 2,500 recién nacidas vivas (Hassold y cols, 1988; Jacobs y cols, 1990). Se caracteriza por baja estatura, falta de desarrollo de caracteres sexuales secundarios en la edad de la pubertad, estrías gonadales y varios defectos somáticos (Zinn y cols, 1993). El fenotipo es muy heterogéneo y el término síndrome de Turner es frecuentemente aplicado a pacientes que no presentan los datos clásicos. Aproximadamente la mitad de las pacientes son monosómicas para el cromosoma X (Loughlin y cols, 1991; Jacobs y cols, 1997) y el resto tienen un cromosoma sexual estructuralmente anormal o son mosaicos con una segunda línea celular conteniendo un cromosoma X o Y normal o anormal (Hall y Gilchrist, 1990; Kleczkowska y cols, 1990; Gicquel y cols, 1992; Larsen y cols, 1995; Jacobs y cols, 1997) (Tabla 4).

**Tabla 4. Cariotipos asociados con un fenotipo de síndrome de Turner y sus frecuencias.** (Modificado de Kleczkowska y cols, 1990; Jacobs y cols, 1990 y 1997)

| Cariotipo   | Frecuencia                               |
|---|--|
| 45,X  | 48%                                      |
| 45,X/46,XX  | 9%                                       |
| 45,X/47;XXX/46,XX y 45,X/47;XXX   | 3%                                       |
| 45,X/46,XY  | ~3%                                      |
| 45,X/46,X,i(Xq) y 46,X,i(Xq)  | 18% (~ 80% mosaicos)                     |
| 45,X/46,X,r(X)  | 11%                                      |
| 46,X,del(Xp) y otras anomalías del X  | 5% (muchos mosaicos)                     |
| Anomalías estructurales del Y:<br>idic(Yq), idic(Yp), r(Y),del(Yp), del(Yq) | ~3% (la mayoría mosaicos con línea 45,X) |

### Monosomía 45,X y mosaicismo

En diferentes estudios utilizando marcadores moleculares se ha demostrado que en 70-80% de las pacientes 45,X el cromosoma X presente es de origen materno, lo que implica que se ha perdido el X o el Y paterno, ya sea durante la meiosis o durante las primeras divisiones del cigoto. Estos resultados se aplican tanto a los estudios realizados en pacientes Turner como en productos 45,X abortados espontáneamente, lo que indica que el origen parental del cromosoma X no influye en

la supervivencia del producto (Hassold y cols, 1988; Jacobs y cols, 1990; 1997; Larsen, y cols, 1995; Martínez –Pasarell y cols, 1999a; Hassold y cols, 2000).

Debido a que más de 99% de los productos 45,X se abortan espontáneamente durante el primer trimestre del embarazo, se ha propuesto que aquéllos que llegan a término son debidos a un error mitótico temprano en el cigoto, resultando en mosaicismo (Hook y Warburton, 1983; Cockwell y cols, 1991; Mathur y cols, 1991; Held y cols, 1992). Si éste fuera el caso, significaría que la etiología de las pacientes aparentemente no mosaicos sería casi siempre la pérdida post-cigótica de un cromosoma sexual. Si la no-disyunción ocurre con la misma frecuencia en los cigotos XX y XY, la probabilidad de que el X materno ( $X^M$ ) fuera retenido sería del doble de la esperada para la retención del X paterno ( $X^P$ ), tomando en cuenta la inviabilidad de los productos 45,Y (Mathur y cols, 1991; Jacobs y cols, 1997). Sin embargo, se ha propuesto que el exceso de productos 45,X que retienen el  $X^M$  pueda deberse a una mayor probabilidad de pérdida del  $X^P$  o del cromosoma Y durante el estado de pro-núcleos. Este es un mecanismo responsable de muchos ratones 45, $X^M$  (Chandley, 1991). Otra posibilidad es que las primeras divisiones del embrión en los mamíferos sean propensas a una no disyunción, lo cual explicaría la alta incidencia de mosaicismo cromosómico observado en estudios de embriones de preimplantación derivados de fertilización *in vitro* (Bean y cols, 2002).

En las pacientes con cariotipo 45,X se han realizado algunos estudios moleculares para detectar mosaicismo críptico. Especial atención se ha puesto a la identificación de una línea con cromosoma Y debido a que la presencia de material derivado de éste en pacientes con síndrome de Turner se correlaciona con un riesgo de 7-10% de desarrollo de gonadoblastoma y disgerminoma, requiriendo de la remoción preventiva del tejido gonadal disgenético (Gravholt y cols, 2000). El gen postulado como responsable del desarrollo del gonadoblastoma, *GBY*, no ha sido aún identificado, pero es muy probable que su localización sea pericentromérica (Page, 1994; Salo y cols, 1995). Recientemente, *TSPY*, un gen en multicopias localizado primariamente en la región crítica para *GBY* en el intervalo 3 y con algunas copias homólogas en los intervalos proximales 4 y 5, ha emergido como el candidato más probable para ser *GBY* (Hildenbrand y cols, 1999; Lau, 1999). La frecuencia de mosaicismo para el cromosoma Y reportada varía considerablemente, de 0-61%, principalmente debido a diferencias metodológicas (Larsen y cols, 1995; Fernández y cols 1996; López y cols, 1998). En contraste, existen pocos trabajos para la

detección de mosaicos crípticos con un segundo cromosoma X en pacientes 45,X y las frecuencias reportadas también muestran diferencias notables yendo de 0 a 75 %, encontrándose una proporción menor de mosaicismo en los productos de aborto que en las pacientes (Hassold y cols, 1988; Mathur y cols, 1991; Hassold y cols, 1992; Larsen y cols, 1995; Jacobs y cols, 1997; Yorifuji y cols, 1997; Martínez-Pasarell y cols, 1999a; Nazarenko y cols, 1999; Fernández-García y cols, 2000).

Sin embargo, aún con estudios moleculares en diferentes tejidos un porcentaje considerable de pacientes con fenotipo Turner parece tener un cariotipo 45,X, lo que lleva a suponer que la pérdida postcigótica de un cromosoma sexual no es el mecanismo principal implicado en la etiología del padecimiento. Considerando que en los casos en que se pierde el cromosoma X materno no hay efecto de edad, como ocurre en las trisomías autosómicas y del X, y que en la mayoría de los casos el cromosoma faltante es el paterno se ha sugerido la prevalencia de un error durante la meiosis I del padre (Jacobs y cols, 1997; Martínez-Pasarell y cols, 1999a; Nazarenko y cols, 1999).

Mediante el análisis de aneuploidías en el esperma, se ha reportado susceptibilidad particular a la no disyunción del par X-Y durante la meiosis I en los padres de pacientes con síndrome de Turner (Martínez-Pasarell y cols, 1999b). Estos datos correlacionan con los descritos en esperma de hombres normales mediante multi-FISH, que además sugieren un efecto de edad paterna (Griffin y cols, 1995; Martín y cols, 1995; Sartorelli y cols, 2001). Como ya se mencionó, la susceptibilidad del par XY a los errores meióticos parece estar relacionada con la pequeña región de apareamiento y con la presencia de un sólo quiasma (Burgoyne y cols, 1992; Hassold y Hunt, 2001). De hecho, una correlación entre la reducción en la recombinación, o incluso la presencia de cromosomas aquiasmáticos y no disyunción ha sido establecida en las trisomías de los cromosomas sexuales, 47,XXX y 47,XXY de origen paterno (Hassold, y cols, 1991; 2000; Thomas y cols, 2000; Lowe y cols, 2001).

### **Aberraciones estructurales del cromosoma X**

La aberración cromosómica estructural más frecuente en pacientes con síndrome de Turner es el isocromosoma de brazos largos del X, i(Xq), en forma pura o de mosaico. El i(Xq) tiene una frecuencia de ~ 1 en 13,000 en la población femenina humana y está presente en más del 15% de

las pacientes con síndrome de Turner, aproximadamente la mitad de las que tienen una alteración estructural (Kleczkowska y cols, 1990; Jacobs y cols, 1997). Sin embargo, existen pocos estudios para determinar el origen parental y los mecanismos implicados en la formación de los  $i(Xq)$ . Los datos reportados indican que este cromosoma anormal puede originarse durante las meiosis femenina o masculina con una frecuencia similar o incluso poscigóticamente, siendo la mayoría dicéntricos y derivados de un solo cromosoma X por un evento de recombinación entre las cromátidas hermanas con puntos de ruptura en la región proximal de los brazos cortos (Lorda-Sánchez y cols, 1991; Wolff y cols, 1996; James y cols, 1997a; Shaffer y Lupski, 2000; Miller y Therman, 2001). Aproximadamente la mitad de las pacientes con un  $i(Xq)$  son mosaicos con una línea 45,X que aparece poscigóticamente por inestabilidad del cromosoma anormal, pocas son mosaicos con una línea 46,XX apoyando un origen meiótico de la anomalía, mientras que el resto sólo tiene la línea 46,X, $i(Xq)$  (Kleczkowska y cols, 1990; Lorda-Sánchez y cols, 1991; Wolff y cols, 1996; Jacobs y cols, 1997).

Generalmente la inactivación del cromosoma X en las mujeres que portan un rearrreglo estructural del X no se produce al azar, sino que muestra un patrón sesgado, inactivándose preferentemente el cromosoma anormal. Aparentemente ocurre una selección en contra de una línea celular que asegura el mantenimiento del balance genético, lo que conduce casi siempre a fenotipos menos severos de síndrome de Turner, tal como ocurre en las pacientes con  $i(Xq)$  (Wolff y cols, 2000; Miller y Therman 2001). Recientemente, al estudiar pacientes con mosaicos 45,X/46,XX se encontró una inactivación sesgada en algunas de ellas, proponiéndose que ésta se deba, particularmente en pacientes con proporciones relativamente grandes de células 45,X, a que dichas clonas provengan en realidad de células con un cromosoma X estructuralmente anormal, no detectadas por análisis citogenéticos convencionales (Uehara y cols, 2001).

Aproximadamente 20% de las pacientes Turner con mosaicos con una línea 45,X tienen otra línea con un cromosoma sexual marcador, el cual generalmente es derivado del cromosoma X (Schmid y cols, 1974; Held y cols, 1992; Jacobs y cols, 1997). Sin embargo, en aproximadamente 6% de los casos el segundo cromosoma sexual es un derivado del cromosoma Y (Hassold y cols, 1988; Jacobs y cols, 1997). En aproximadamente 15% de las pacientes se encuentra una segunda línea con un  $r(X)$ . Parecería que los rearrreglos estructurales que involucran dos rupturas en un solo cromosoma X, independientemente de si ocurren en un mismo

brazo cromosómico (deleciones e inversiones) o en ambos (anillos e inversiones), ocurren predominantemente durante la meiosis paterna, tal como ha sido reportado para el resto de los cromosomas, probablemente debido a una mayor labilidad por el alto número de divisiones celulares (Callen y cols, 1991; Jacobs y cols, 1997; Shaffer y Lupski, 2000).

La mayoría de las pacientes con cromosomas en anillo, ya sea del X o del Y, presentan una línea 45,X. Esto es debido a que los anillos tienden a generar nuevas variantes y/o a perderse durante la división celular. Por ejemplo, un intercambio de cromátidas hermanas puede conducir a la formación de un anillo continuo doble con un solo centrómero. Cuando el centrómero se separe en la anafase, ambos centrómeros hijos pueden dirigirse al mismo polo, originando células con un anillo dicéntrico del doble del tamaño del anillo original y además una línea monosómica. Si por el contrario los centrómeros migran hacia polos opuestos, el anillo puede romperse al azar y los extremos rotos volver a unirse, generando células hijas con anillos de diferentes tamaños (Miller y Therman, 2001).

Los cromosomas en anillo son inestables tanto en mitosis como en meiosis y se pierden frecuentemente, probablemente como resultado de la formación de dicéntricos y ciclos subsecuentes de aparición de puentes - rupturas y fusión. Es por ello que generalmente aún anillos grandes del X se asocian con un fenotipo de síndrome de Turner, tanto por la existencia de la línea 45,X, como por la pérdida de secuencias, principalmente pseudoautosómicas. Se han descrito varios casos de pacientes con anillos del cromosoma X en mosaico con línea 45,X y fertilidad conservada e incluso la transmisión del anillo a través de dos o tres generaciones, lo cual ha llevado a proponer que la inestabilidad es mayor durante la mitosis que durante la meiosis femenina (Blumenthal y Allanson, 1997; Uehara y cols, 1997; Matsuo y cols, 2000a; Birkebaek y cols, 2002).

La mayoría de las pacientes con cromosomas X estructuralmente anormales presentan un fenotipo clásico de síndrome de Turner, sin embargo, algunas muestran características dismórficas no usuales y retraso mental. Este fenotipo severo ha sido asociado con la presencia de anillos muy pequeños del cromosoma X que carecen del centro de inactivación (Van Dyke y cols, 1992; Migeon y cols, 1994; Wolff y cols, 1994). Una hipótesis para explicar este fenotipo es que la pérdida del gen *XIST* resulta en una disomía funcional de las secuencias contenidas en el

anillo, sin embargo, en algunas pacientes con fenotipo severo se ha demostrado la inactivación del r(X). Interesantemente, en algunas ocasiones se ha encontrado la coexistencia de anillos inactivos y activos y por otra parte anillos pequeños activos sin un fenotipo severo, así como disomía uniparental y fenotipos variables (Migeon y cols, 1994; 2000; Jani y cols, 1995; Yorifuji y cols, 1998; Dennis y cols, 2000; Turner y cols, 2000a; Matsuo y cols, 2000b).

Las deleciones de brazo corto o brazo largo del cromosoma X producen diferentes fenotipos que van desde el femenino normal con disgenesia gonadal hasta la presencia de talla baja y otros estigmas del síndrome, con desarrollo sexual y fertilidad conservados. Es por ello que esta variabilidad de fenotipos ha sido utilizada para localizar genes o regiones específicas asociados con características particulares. Los genes que están sujetos a la inactivación del cromosoma X son candidatos poco probables para ser responsables de las características somáticas del síndrome de Turner, debido a que su dosis funcional es la misma en los individuos 45,X que en los 46,XX; aunque podrían tener una participación relevante en la disgenesia gonadal por la presencia de ambos cromosomas X activos en los ovocitos. Consecuentemente, como ya se mencionó, los genes que escapan a la inactivación y otros que tienen homólogos funcionales en el Y son los candidatos para el fenotipo somático. Más de 20 de estos genes se conocen, incluyendo los de la PAR1 (Figura 1), sin embargo, la participación de genes localizados en el brazo largo del cromosoma X, como *RPS4X*, es poco probable porque las pacientes con i(Xq) a pesar de tener 3 copias funcionales de ellos presentan los datos clínicos característicos del síndrome de Turner (Geerkens y cols, 1996). Algunas características como la talla baja y las alteraciones esqueléticas han sido asociadas con la deleción de la PAR1, y parecerían deberse a la haploinsuficiencia del gen *SHOX* (Rao y cols, 1997; Ellison y cols, 1997; Palka y cols, 2000), aunque la mayoría de los signos pueden asociarse con diferentes deleciones tanto en el brazo corto como en el brazo largo del X (Therman y Susman, 1990). Zinn y cols (1998) han propuesto la existencia de una región crítica para la formación de ovario en la región proximal Xp11.2-p22.1, debido a que deleciones de esta región se asocian con disgenesia gonadal y otras características como baja estatura, paladar alto y arqueado, cuello alado o coartación de la aorta, pero no con linfedema (Zinn y cols, 1998). También se ha sugerido que la región crítica para esta última característica se encuentre en Xp11.4/ Yp11.2 (Boucher y cols, 2001) o entre los genes *DMD* y *MAOA*, localizados en Xp21.2 y Xp11.23, respectivamente (Ogata y cols, 2001).

Se ha sugerido la existencia de al menos otras dos regiones con genes que participen en el desarrollo ovárico debido a que pacientes con deleciones del brazo largo del cromosoma X presentan disgenesia gonadal o falla ovárica prematura. Al estudiar pacientes con translocaciones X;autosoma se ha observado que si el punto de ruptura del X se encuentra en el brazo corto o proximal en el brazo largo generalmente la función ovárica está conservada, pero si se ubica entre Xq13-q26, una región crítica para la función ovárica, existe invariablemente insuficiencia gonadal con fertilidad reducida. Sin embargo, las pacientes con punto de ruptura en Xq22 constituyen una excepción, sugiriéndose la existencia de dos regiones implicadas en la función gonadal separadas por el segmento de esta última banda (Madan, 1983; Miller y Therman, 2001). Sin embargo, en estas pacientes aún no es posible descartar el efecto que pudiera tener el comportamiento de los cromosomas estructuralmente anormales en el apareamiento y recombinación durante la meiosis y por consiguiente con la formación de un ovario funcional (Speed y cols, 1990; Ogata y cols, 2001; Modi y cols, 2003).

### **Anomalías estructurales del cromosoma Y**

Con respecto a las anomalías estructurales del cromosoma Y observadas en las pacientes con síndrome de Turner, la mayoría parecen haberse originado durante la meiosis masculina y sólo algunas son producto de alteraciones ocurridas durante las primeras divisiones a partir de un producto 46,XY. Esto ha sido postulado debido a que la mayoría de los pacientes carecen de una línea celular masculina normal y casi siempre son mosaicos con una línea 45,X. Esta última aparece como consecuencia de la inestabilidad mitótica de los cromosomas Y anormales, principalmente isodicéntricos y pseudodicéntricos con puntos de ruptura tanto en los brazos cortos como en los largos y anillos de tamaño variable. Además, en las pacientes con fenotipo Turner, es posible encontrar deleciones de tamaño variable en uno u otro brazo del cromosoma Y (Barboux y cols, 1995; Kelly y cols, 1998; Quilter y cols, 1998; Robinson y cols, 1999; Jakubowski y cols, 2000). En la mayoría de las pacientes con fenotipo Turner y cromosomas derivados del Y ha sido difícil establecer una correlación genotipo – fenotipo, principalmente en aquéllas en las que está presente el gen *SRY*, incluso en doble dosis. En estas pacientes el fenotipo ha sido explicado generalmente con base en la proporción de células 45,X vs 46,X, der(Y) en los diferentes tejidos, particularmente en las células somáticas gonadales en donde la presencia de *SRY* parece ser necesaria para el desarrollo testicular o en su defecto la degeneración del tejido

gonadal tal como ocurriría en presencia de la monosomía X (Shankman y cols, 1995; Petrusevska y cols, 1996; Reddy y cols, 1996; Méndez y cols, 1999; Udler y cols, 2001).

Se ha propuesto que los cromosomas sexuales son particularmente propensos a sufrir alteraciones estructurales, tanto inter como intracromosómica, debido a la gran cantidad de elementos repetidos dispersos que contienen y que promueven eventos de recombinación homóloga no alélica (Erlandsson y cols, 2000; Shaffer y Lupski, 2000; Lander y cols, 2001; Venter y cols, 2001; Stankiewicz y Lupski, 2002). La presencia de secuencias repetidas de bajo número de copias, LCR, facilitan los eventos de recombinación ilegítima que constituyen la base para los rearrreglos genómicos y cromosómicos. Así, los rearrreglos cromosómicos son producto de recombinación intercromosómica, intracromosómica o intercromatídica. Un alineamiento intercromosómico o intercromatídico desigual de LCR orientadas en forma directa conduce a deleciones/duplicaciones o a inversiones si las secuencias son repetidos invertidos; la presencia de asas intercromatídicas también conduce a inversiones. Los eventos de recombinación intercromatídicos o intercromosómicos en regiones homólogas pueden originar cromosomas isodicéntricos y pseudodicéntricos (Shaffer y Lupski, 2000; Miller y Therman, 2001; Stankiewicz y Lupski, 2002). Estos parecen ocurrir de manera relativamente frecuente durante la recombinación meiótica de los cromosomas sexuales o incluso durante la proliferación de las células germinales masculinas, tal como ha sido documentado a través del estudio de pacientes con fenotipo Turner, disgenesia gonadal mixta y en pacientes masculinos con infertilidad en quienes se han encontrado rearrreglos intracromosómicos del Y o intercromosómicos con el X que generan derivados del Y (Savary y cols, 1992; Barboux y cols, 1995; Shankman y cols, 1995; Kelly y cols, 1998; Quilter y cols, 1998; Robinson y cols, 1999; Tzancheva y cols, 1999; Grass y cols, 2000; Jakubowski y cols, 2000; Blanco y cols, 2000a, Kamp y cols, 2000; Ogata y cols, 2000; Hernando y cols, 2002).

## **Métodos empleados para determinar el origen y mecanismos de formación de las alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas sexuales presentes en las pacientes Turner**

La caracterización del complemento cromosómico en las pacientes con fenotipo de Turner se ha hecho tradicionalmente por métodos citogenéticos convencionales. Sin embargo, la búsqueda de mosaicismo críptico, principalmente para detectar la presencia de derivados del cromosoma Y, llevó al empleo de métodos moleculares, primeramente hibridación tipo Southern y posteriormente PCR (Hassold y cols, 1988; Medlej y cols, 1991; Kocova y cols, 1993; Chu y cols, 1995; López y cols, 1998; Nishi y cols, 2002). En general estas técnicas tienen una alta sensibilidad para identificar mosaicos del cromosoma Y, sin embargo, para la detección de mosaicismo con un segundo cromosoma X es necesario emplear marcadores moleculares polimórficos, en conjunto con el análisis de los mismos marcadores en los padres de las pacientes o métodos como el PCR cuantitativo (Hassold y cols, 1988; Leonova y Hanson, 1999; Martínez-Pasarell y cols, 1999a). En ambos casos el uso aislado de métodos moleculares no provee información acerca de la estructura de los cromosomas X o Y estructuralmente anormales, sobre todo cuando estos no han sido visualizados por técnicas citogenéticas convencionales.

Por el contrario, la introducción de metodologías citogenéticas moleculares, principalmente la hibridación *in situ* fluorescente, FISH (fluorescence *in situ* hybridization) y la reacción de la polimerasa *in situ*, PRINS (primed *in situ* labeling) nos ha permitido identificar con certeza el origen de cromosomas marcadores empleando sondas y oligonucleótidos para regiones cromosómicas específicas, principalmente centroméricas (Callen y cols, 1992; González del Ángel y cols, 1993; Koch y cols, 1995; Hindkjaer y cols, 1996; Schwartz y cols, 1997; Velagaleti y cols, 1997). El uso de un mayor número de sondas para FISH permite una mejor caracterización de los cromosomas anormales, sin embargo, cuando se combinan los estudios citogenéticos moleculares con la amplificación de secuencias específicas del cromosoma Y es posible determinar de manera precisa los puntos de ruptura implicados. (Quilter y cols, 1998; Jenderny y cols, 1998; Robinson y cols, 1999; Godoy Assumpcao y cols, 2000; Ogata y cols, 2000) El análisis de marcadores moleculares polimórficos del tipo RFLP o microsatélites en las pacientes y sus padres permite determinar el origen parental de las alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, si éstas se produjeron durante la meiosis o postcigóticamente

e incluso analizar los eventos de recombinación ocurridos en los cromosomas implicados para establecer los probables mecanismos de formación de los derivados del Y y del X (Lorda-Sánchez, 1991; Callen y cols, 1992; Wolff y cols, 1996; Jacobs y cols, 1997; Grass y cols, 2000; Jakubowsky y cols, 2000; Ogata y cols, 2000).

La caracterización precisa del complemento cromosómico presente en los individuos con síndrome de Turner resulta de suma importancia para establecer correlaciones fenotipo-genotipo y es particularmente relevante para predecir el pronóstico en cuanto a fertilidad y complicaciones en las pacientes y así poder brindar un asesoramiento genético adecuado.

## OBJETIVOS

- Analizar el comportamiento de los cromosomas sexuales humanos durante la meiosis y su participación en la producción de las aberraciones cromosómicas presentes en individuos con síndrome de Turner
- Detectar la presencia de mosaicismo críptico de los cromosomas X y Y en las pacientes con constitución 45,X.
- Determinar la estructura de los cromosomas anormales encontrados en las pacientes con síndrome de Turner.
- Establecer el origen parental de las aberraciones cromosómicas presentes en las pacientes estudiadas.
- Analizar los eventos de recombinación meiótica ocurridos entre los cromosomas X maternos para inferir el origen cigótico del cariotipo y sugerir el tiempo y mecanismos de los errores que condujeron a la formación de aberraciones estructurales del cromosoma X
- Discutir la correlación entre la aberración cromosómica presente y el fenotipo de cada paciente con síndrome de Turner estudiada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 21 pacientes con fenotipo de síndrome de Turner en quienes previamente se había realizado el análisis citogenético convencional, examinándose 100 metafase con bandas GTG y 50 con bandas CBG en cada una. 10 de las pacientes seleccionadas tenían un cariotipo 45,X, y 11 presentaban una línea celular adicional con un segundo cromosoma sexual. En la tabla 5 se muestran los datos clínicos y cariotipos iniciales de las pacientes estudiadas.

Los estudios realizados por técnicas citogenéticas convencionales, bandas GTG y CBG, permitieron caracterizar el cromosoma anormal del caso 11 como un isodicéntrico derivado del cromosoma Y (Figura 3A-B). La paciente 12 presentaba un cromosoma marcador pequeño (Figura 3C); las pacientes 13 y 14 mostraron isocromosomas de brazos largos del cromosoma X, el primero monocéntrico y el segundo dicéntrico (figura 3J –K); mientras que los casos 15-20 tenían cromosomas en anillo de diferente tamaño (Figura 3D-I); siendo particularmente pequeños los de los casos 15-18. Las pacientes 19 y 20 presentaban anillos de gran tamaño que por su patrón de bandeo parecían corresponder a derivados del X y por último, la paciente 21 tenía un cromosoma X con una delección de brazo largo con punto de ruptura en q23 (figura 3L). En las pacientes 14, 19, 20 y 21 también se realizó un análisis de replicación utilizando un pulso terminal con 5-bromo-desoxiuridina y bandas R que reveló una inactivación preferencial del cromosoma X anormal en los cuatro casos (no se muestra).

A partir de las preparaciones cromosómicas de 9 de las pacientes con un segundo cromosoma sexual (casos 11, 12 y 14-20) se realizaron técnicas de citogenética molecular, reacciones independientes de PRINS para la detección de secuencias centroméricas del X y del Y y FISH para la región centromérica del X y heterocromática del brazo largo del cromosoma Y, para establecer inequívocamente el origen del marcador, X ó Y, y la estructura de los cromosomas sexuales anormales. Se analizaron 15 – 25 metafases y 50 – 100 núcleos en interfase en cada caso.

Se tomaron muestras de sangre periférica para extracción de DNA genómico de las 21 pacientes, de los padres de las 10 pacientes 45,X (del caso 10 solo se obtuvo muestra de la madre de la paciente) y de los de 5 de las pacientes con anomalías estructurales del cromosoma X (casos

**Tabla 5. Datos clínicos y citogenéticos en las 21 pacientes con fenotipo Turner estudiadas**

| Caso | Edad (años) | Talla (m) | Cariotipo inicial                   | Características clínicas  |
|------|-------------|-----------|-------------------------------------|---|
| 1    | 18          | 1.29      | 45,X                                | Implantación baja del cabello, cuello corto y ancho, nevos múltiples, tórax ancho, camptodactilia bilateral   |
| 2    | 7           | 1.08      | 45,X                                | Cuello alado, implantación baja del cabello posterior, metacarpianos y metatarsianos cortos   |
| 3    | 6/12        | 0.62      | 45,X                                | Linfedema de manos y pies, piel redundante en cuello  |
| 4    | 2 días      | 0.49      | 45,X                                | Higroma de cuello, linfedema de manos y pies, hipoplasia ungueal en los pies  |
| 5    | 19          | 1.34      | 45,X                                | Paladar hendido, implantación baja del cabello, cuello alado, teletelia   |
| 6    | 9/12        | 0.77      | 45,X                                | Linfedema de manos y pies, cuello corto y ancho, tórax ancho, teletelia   |
| 7    | 11          | 1.21      | 45,X                                | Linfedema congénito, implantación baja del cabello, cuello corto y ancho, teletelia, pezones invertidos, nevos múltiples, <i>cubitus valgus</i> , 4º metatarsiano corto   |
| 8    | 34          | 1.37      | 45,X                                | Implantación baja de cabello, clinodactilia de 5º dedo de los pies, nevos múltiples   |
| 9    | 16          | 1.37      | 45,X                                | Cuello corto y ancho, tórax ancho, teletelia, pezones invertidos, <i>cubitus valgus</i> , 4º metacarpianos cortos, hipoplasia de labios mayores y menores, hipertrofia de clitoris, nevos múltiples, riñón izquierdo mal rotado |
| 10   | 18          | 1.46      | 45,X                                | Cuello corto, tórax ancho, teletelia, <i>cubitus valgus</i> , 4º y 5º metacarpianos y metatarsianos cortos, nevos múltiples   |
| 11   | 15          | 1.29      | 45,X[27]/46,X,psu dic(Y)[73]        | Hernia inguinal congénita (un testículo disgenético y una estría gonadal fueron removidos), <i>pterygium colli</i> , <i>pectus excavatum</i> , <i>cubitus valgus</i> , cardiopatía congénita, labios menores prominentes        |
| 12   | 19          | 1.42      | 45,X[68]/46,XYqh-[32]               | Cuello corto y ancho, <i>cubitus valgus</i> , 4º metacarpiano corto, nevos múltiples  |
| 13   | 23          | 1.41      | 45,X[57]/46,X,i(Xq)[43]             | Implantación baja del cabello,cuello corto y ancho, <i>cubitus valgus</i> , 4º metacarpianos y metatarsianos cortos, nevos múltiples  |
| 14   | 7           | 1.13      | 45,X[45]/46,X,psu dic(X)[55]        | Teletelia, implantación baja de los primeros dígitos, clinodactilia del 5º dedo   |
| 15   | 30          | 1.34      | 45,X[75]/46,X,r(X)[25]              | <i>Cubitus valgus</i> , 4º metacarpiano corto, nevos múltiples, hipoacusia  |
| 16   | 9           | 1.20      | 45,X[72]/46,X,r(X)[28]              | Cuello corto y ancho, <i>cubitus valgus</i> , teletelia, algunos nevos  |
| 17   | 12          | 1.16      | 45,X[37]/46,X,r(X)[73]              | Cuello corto y ancho, <i>cubitus valgus</i> , 4º metacarpiano corto, nevos múltiples, pezones invertidos y supernumerarios  |
| 18   | 10          | 1.16      | 45,X[32]/46,X,r(X)[68]              | Cuello corto y ancho, <i>cubitus valgus</i> , 4º metacarpiano corto, nevos múltiples, sindactilia cutánea en pies, pezones invetidos y supernumerarios, labios hipoplásicos, IQ límite  |
| 19   | 5           | 1.00      | 45,X[75] /46,X,r(X)(p22q28)[25]     | Tórax ancho, teletelia, hiperquinesia   |
| 20   | 12          | 1.15      | 45,X[61]/46,X,r(X)(p21.2q24-25)[39] | <i>Cubitus valgus</i> , tórax ancho, teletelia, nevos múltiples, tratamiento con hormona de crecimiento por 6 meses   |
| 21   | 22          | 1.44      | 45,X[20]/46,X,del(X)(q23)[80]       | Tórax en escudo, <i>cubitus valgus</i> , hipoplasia de labios, nevos múltiples  |

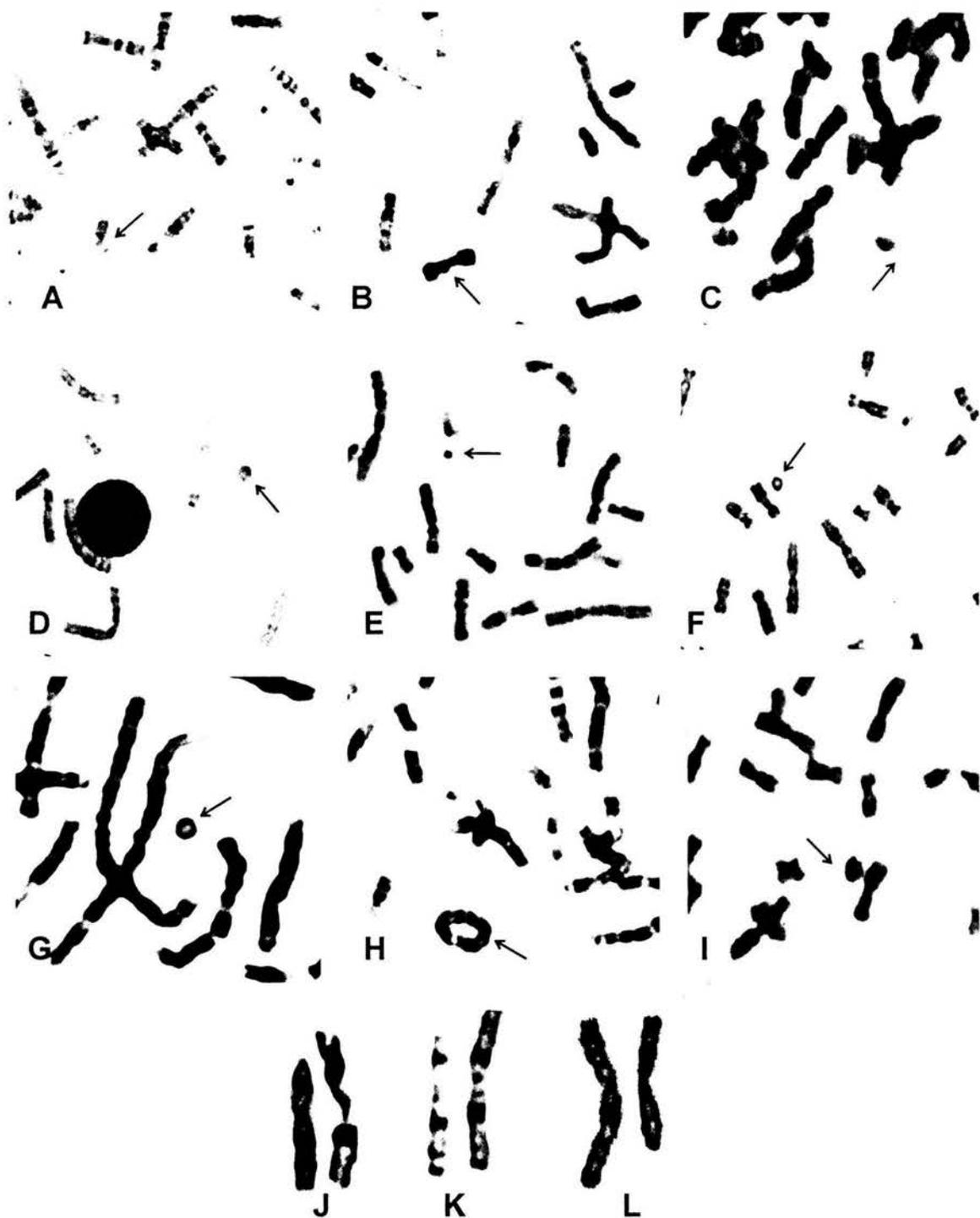
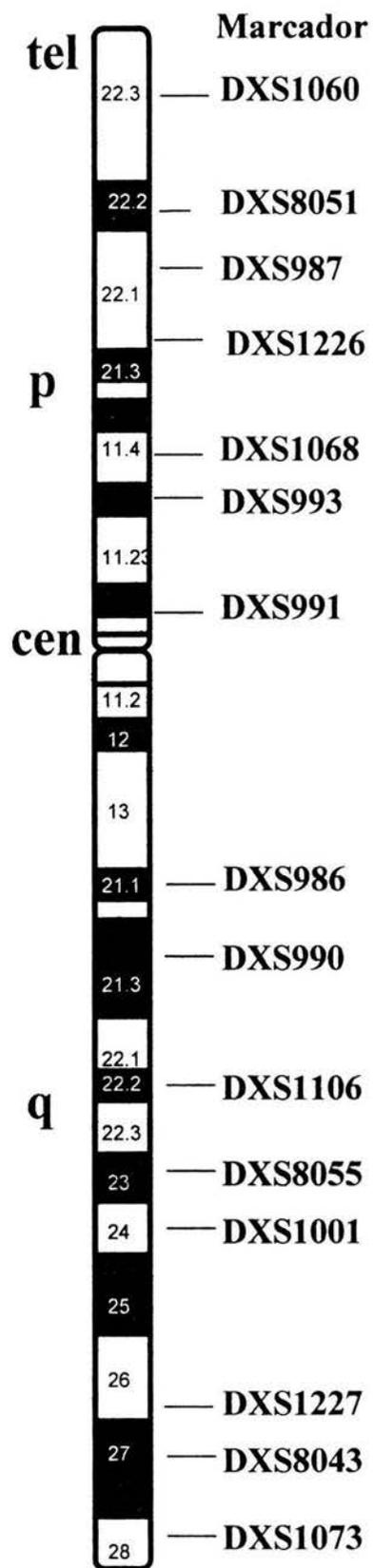


Figura 3. Metafases parciales de las pacientes Turner con un segundo cromosoma sexual. A. Bandas GTG paciente 11 B. Bandas CBG paciente 11. C. Bandas GTG paciente 12. D -I. Bandas GTG pacientes con anillo, casos 15 a 20, respectivamente. J-L. Cromosomas X bandas GTG pacientes con  $i(Xq)$ , casos 13 14 y con  $del(Xq)$ , caso 21, respectivamente.

13, 14, 18, 19 y 21). Con estas muestras se amplificaron por PCR inicialmente las secuencias centroméricas de ambos cromosomas sexuales en todas las pacientes y posteriormente en aquéllas con un segundo cromosoma sexual se amplificaron por PCR secuencias específicas del cromosoma Y, *PABY*, *SRY*, *ZFY* y *Yqh*.

En todas las pacientes 45,X (casos 1-10) y en los casos (13, 14, 18, 19 y 21) que presentaban un cromosoma anormal derivado del X se realizó un análisis empleando 15 de los marcadores microsatélite del tipo dinucleótidos (CA/GT)<sub>n</sub> del cromosoma X (p22.2-q28) del panel 28 del cromosoma X de ABI-PRISM Linkage Mapping Set Ver 2.0-PE (Figura 4). En las pacientes 45,X, fueron amplificadas por lo menos 5 marcadores, incluyendo dos localizados en el brazo corto, uno pericentromérico y dos en el brazo largo, para excluir mosaicismo críptico para el X y determinar el origen parental del cromosoma X presente. En los casos con anomalías estructurales del X los marcadores se escogieron de acuerdo con los datos citogenéticos para establecer tanto el origen parental de los cromosomas X presentes como para tratar de definir de manera más precisa los puntos de ruptura en los derivados. La frecuencia de los alelos de los marcadores empleados fue calculada previamente para 30 cromosomas independientes en población mexicana (Vázquez Mena, 2000; Monroy Jaramillo, 2002)

Adicionalmente se obtuvieron muestras de sangre de hermanos y otros familiares de las pacientes 19 y 21 para determinar la segregación de los marcadores microsatélite polimórficos en cada familia y analizar los eventos meióticos de recombinación que pudieron estar implicados en la generación de los cromosomas anormales.



**Figura 4. Localización de los marcadores microsatélite del cromosoma X utilizados**

## CITOGENÉTICA MOLECULAR

**Hibridación in situ, FISH, con sondas para Xcen (DXZ1) (Boehringer Mannheim) y Yqh (DYZ1) (Boehringer Mannheim)** de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de FISH fueron realizadas por separado para cada sonda, DXZ1 marcada con fluoresceína y DYZ1 marcada con digoxigenina y detectada con anticuerpos conjugados con fluoresceína, sobre preparaciones cromosómicas obtenidas por métodos estándar y mantenidas a -20°C en atmósfera de N<sub>2</sub> hasta su utilización.

Cada laminilla se deshidrató en etanol frío (70%, 85%, 100%, 2 min en cada uno) y se secó al aire. La solución de hibridación se preparó con formamida 65%, 2X SSC, sulfato de dextrán 40%, DNA de esperma de arenque 0.5 µg/µl, DNA-COT1 humano 1µg/µl, sonda de DNA marcado 20-40 ng y agua bidestilada para obtener un volumen final de 20 µl que se aplicaron en cada laminilla. Se colocó un cubreobjetos sobre el área de hibridación y se selló con cemento Iris. Se realizó la desnaturalización conjunta de la preparación cromosómica y de la sonda colocando la laminilla sellada en una platina precalentada a 72°C por 5- 10 min. Las laminillas se incubaron a 37°C en cámara húmeda precalentada durante toda la noche.

Los lavados post-hibridización se efectuaron en 2X SSC/ 0.2% Tween 20 a 72°C, 45°C, y 37°C por 5 min en cada uno. Para la sonda marcada con digoxigenina, las laminillas se incubaron con 20µl de anticuerpo anti-digoxigenin-conjugado con fluoresceína (200µg/ml) a 37°C, por 30 min en cámara húmeda. Después de lo cual, se lavaron 3 veces en 50 ml de PBS/0.2% Tween 20 a temperatura ambiente por 5 min cada uno.

Las laminillas se contratiñeron con yoduro de propidio con una concentración final de 1.25µg/ml en solución antidesvanecedora (1ml de p-fenilen diamino 10mg/ml en NaHCO<sub>3</sub> 0.5M pH 8 más 9ml de glicerol) y se cubrieron con un cubreobjetos. Las laminillas hibridadas se guardaron en refrigeración protegidas de la luz.

**Síntesis de DNA in situ con oligonucleótidos cebadores (PRINS, *Oligonucleotide primed in situ DNA syntesis*)** Modificada de Pellestor y cols (1995, 1996).

Las reacciones de PRINS se realizaron por separado con oligonucleótidos específicos para las regiones centroméricas de los cromosomas X y Y. Las preparaciones cromosómicas empleadas fueron obtenidas por métodos estándar y conservadas a - 20°C en atmósfera de N<sub>2</sub>.

Las laminillas fueron deshidratadas en una serie de alcoholes, 70%, 85% y 100% por dos minutos en cada uno y se dejaron secar al aire. Posteriormente se colocaron en 2xSSC por 10 min a 37°C y se volvieron a deshidratar en alcoholes graduales fríos por 2 min en cada uno. Para cada laminilla se preparó una mezcla de reacción conteniendo:

| <b>reactivo</b>  | <b>volumen</b> |
|--|----------------|
| DNTPs (dATP, dCTP, dGTP) 0.2mM   | 1.0 µl         |
| Digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim) 0.02mM                          | 1.0 µl         |
| dTTP 0.02mM  | 1.0 µl         |
| Amortiguador (KCl 50 mM, Tris-HCl 10mM pH 8.3;<br>MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM | 1.5 µl         |
| Albúmina sérica bovina 0.1%  | 1.5 µl         |
| Glicerina 87%  | 2.2 µl         |
| Oligonucleótido (50-200pmoles)   | 1.5 µl         |
| Agua bidestilada estéril   | 4.3 µl         |
| Taq polimerasa 2.5U  | 1.0 µl         |
| <b>Volumen final</b>   | <b>15.0 µl</b> |

La reacción se llevó a cabo en un termociclador MJ- PTC100 con una platina de temperatura controlada con un programa que consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 94-96°C, adicionando la mezcla de reacción una vez transcurridos 2- 3 min y colocando un cubreobjetos de 20 x 20 mm en la zona de reacción, seguido de un ciclo de alineación/extensión de 30 min a la temperatura específica de cada oligonucleótido (Tabla 6).

**Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento para las reacciones de PRINS**

| Nombre | Tipo               | Secuencia                     | Temperatura de alineación |
|--------|--------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Xc     | $\alpha$ satellite | 5' GTTCAGCTCTGTGAGTGAAA<br>3' | 68 °C                     |
| Yc     | $\alpha$ satellite | 5' CTTGGAGACCTTTGTGGAAG<br>3' | 56 °C                     |

La reacción se detuvo sumergiendo las laminillas en una solución de NaCl 500 mM/ EDTA 50mM con pH 8 y a la temperatura de alineación/extensión por 5 min. Posteriormente las laminillas se lavaron dos veces en 2X SSC/Tween-20 0.2% por 2 min a 37°C y sin dejar secar la laminilla se le adicionaron 10 $\mu$ l de anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fluoresceína o rodamina (0.25mM). Se colocó un cubreobjetos y se incubó 20-30min en cámara húmeda a 37°C.

Para quitarle el exceso de anticuerpo se lavó 5 min en una solución 0.4XSSC/Tween 20 0.2% y posteriormente en 2XSSC/Tween 20 0.2% por 2 min a 37°C, se dejaron secar y fueron contrateñidas con yoduro de propidio (1.25 $\mu$ g/ml) o DAPI (0.25 $\mu$ g/ml) en solución antidesvanecedora de la fluorescencia (p-fenilen diamina).

Las laminillas de las reacciones de FISH y PRINS se analizaron en un microscopio Laborlux de Leitz con lámpara de mercurio de 100 watts utilizando un filtro de triple banda y filtros monobanda para rojo y verde. Las fotografías se tomaron empleando la cámara integrada al microscopio con película de color asa 400, con un aumento 10X /100X, usando tiempos de sobre exposición.

## ESTUDIOS MOLECULARES

**Aislamiento de DNA genómico de sangre periférica** (Modificación de las técnicas de Buffone y Darlington, 1985 y Kempter y Grossbadem, 1992)

Se obtuvieron 3ml de sangre periférica de cada paciente en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante y se homogeneizaron por inversión. Se eliminó el paquete de los glóbulos rojos por centrifugación selectiva a 3 000rpm durante 6 min y se rompieron las células con amortiguador de lisis TTS (Tris 10 mM pH 7.6-8.0, tritón al 1% y sacarosa 300mM). Se lavó el precipitado varias veces hasta que el botón quedó blanco. Enseguida se adicionó cloruro de sodio (NaCl) de menor a mayor concentración (5mM a saturado) para eliminar proteínas agitando. Se agregó dodecil sulfato de sodio (SDS) y se mezcló con el detergente más agresivo para romper las membranas nucleares. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm/30min/4°C y se recuperó la malla del DNA que se precipitó con etanol absoluto. En este paso, la muestra se dejó reposar un mínimo de 2h a -20°C y se lavó con etanol al 70%. Se evaporó el etanol en un desecador al vacío, sin temperatura. Finalmente, se resuspendió la muestra de DNA en un volumen adecuado de amortiguador TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

La calidad y concentración del DNA extraído en cada muestra se determinó mediante análisis espectrofotométrico y electroforesis en gel de agarosa:

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

(b) Se aplicó una alícuota de 1 ml de las muestras problema de DNA genómico (de concentración desconocida) junto con una curva de un DNA estándar de 100 ng/ml en concentraciones crecientes, desde 50 hasta 500 ng/ml, (de 50 en 50) en un gel de agarosa 0.8% (p/v), en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M) teñido con bromuro de etidio 0.0002%. Las muestras se separaron por electroforesis. El gel se analizó en una lámpara de luz ultravioleta y mediante la comparación de la intensidad de las bandas con el patrón se calculó la concentración de las muestras (Sambrook y cols, 1989).

Si por ambos métodos de cuantificación de DNA las lecturas eran parecidas, entonces se promediaban las lecturas, en caso contrario se repetía la determinación. Una vez cuantificada cada muestra, se realizaron las diluciones correspondientes para obtener soluciones de DNA de cada muestra en una concentración final de 20 ng/ml.

### **Reacción en cadena de la polimerasa para amplificar Xcen y secuencias del Y**

Los oligonucleótidos y condiciones empleados para cada reacción de PCR se muestran en la tabla 7. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente forma:

| reactivo                                   | volumen                                 |
|--|---|
| dNTPs (1mM cada uno)                       | 4 $\mu$ l (20 mM cada uno)              |
| oligonucleótidos (10 mM)                   | 1 $\mu$ l de cada uno (0.2 ml cada uno) |
| Amortiguador 10X (MgCl <sub>2</sub> 1.5mM) | 5 $\mu$ l (1X)                          |
| Taq polimerasa (5U/ml)                     | 0.2 $\mu$ l (1U/ml)                     |
| DNA (50-100 ng/ml)                         | 1-2 $\mu$ l (100 ng)                    |
| H <sub>2</sub> O cbp                       | 50 $\mu$ l                              |

### **Análisis electroforético de los productos de PCR**

Los productos de cada reacción de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M, EDTA 0.001M pH 8.0), teñido con bromuro de etidio 0.0002%, incluyéndose un carril con un marcador de peso molecular (escalera de 100pb, GIBCO BRL)

### **Amplificación de regiones microsatélite del cromosoma X**

Se utilizaron en total quince marcadores microsatélites del cromosoma X contenidos en el panel 28 del ABI PRISM LINKAGE MAPPING SET VER 2.0 PE. El panel consiste en pares de oligonucleótidos para PCR que amplifican *loci* microsatélites tipo (CA/GT)<sub>n</sub> y que abarcan todo el cromosoma X, desde Xp22.3 hasta Xq28 (Figura 4). En cada par el oligonucleótido sentido (5' → 3') está marcado con un fluorocromo (6FAM, HEX o NED) y el antisentido presenta una cola de poli-adeninas en su región 5' para evitar la adición inespecífica de nucleótidos en la amplificación por PCR. Los marcadores se encuentran a una distancia promedio de 10 cM entre sí (Panel 28 *ABI Prism Linkage Mapping Set User's Manual PE*, 1997).

**Tabla 7. Pares de oligonucleótidos empleados para amplificar secuencias centroméricas de los cromosomas X/Y y regiones específicas del Y, y condiciones de las reacciones de PCR.**

|  |                       |
|--|-----------------------|
| <p><b>Par X1 y X2</b> define un fragmento de <b>130 pb</b> de secuencias alfoides repetidas de la región centromérica del cromosoma X humano (Witt y Erickson,1989)</p>                            |                       |
| X1: 5'- AAT CAT CAA ATG GAG ATT TG -3'   | T <sub>m</sub> = 52°C |
| X2: 5'- GTT CAG CTC TGT GAG TGA AA -3'   | T <sub>m</sub> = 58°C |
| Desnaturalización 95°C/3min; 30 ciclos de 94°C/1min, 63°C/2min y 72°C/3 min; extensión 72°C/10 min.  |                       |
| <p><b>Par Y1 y Y2</b> flanquea un fragmento de <b>170 pb</b> de secuencias alfoides repetidas de la región centromérica del cromosoma Y humano (Witt y Erickson,1989; 1991).</p>                   |                       |
| Y1: 5'- ATG ATA GAA ACG GAA ATA TG -3'   | T <sub>m</sub> = 52°C |
| Y2: 5'- AGT AGA ATG CAA AGG GCT CC -3  | T <sub>m</sub> = 60°C |
| Desnaturalización 95°C/3min; 30 ciclos de 95°C/1min, 58°C/2min y 72°C/3 min; extensión 72°C/10 min.  |                       |
| <p><b>Par PABY-1 y PABY-2</b> flanquea una región de <b>250 pb</b> del límite pseudoautosómico del cromosoma Y (Jäger y cols, 1990)</p>  |                       |
| PABY-1: 5'- TGG GCA CTT ACA CAT AGA CGT-3'   | T <sub>m</sub> = 62°C |
| PABY-2: 5'- CTT CTC TTT GAA GTG TAA GGA G-3'   | T <sub>m</sub> = 58°C |
| Desnaturalización 95°C/3min; 30 ciclos de 94°C/1min, 56°C/2min y 72°C/3 min; extensión 72°C/2 min.   |                       |
| <p><b>Par SRY1 y SRY2</b> amplifica una región de <b>609 pb</b> del gen <i>SRY</i> ( Bailey y cols,1992)</p>   |                       |
| SRY1: 5'- CGA CAA TGC AAT CAT ATG C-3'   | T <sub>m</sub> = 64°C |
| SRY2: 5'- TAG CGG TCC CGT TGC TGC -3'  | T <sub>m</sub> = 60°C |
| Desnaturalización 95°C/3min; 33 ciclos de 95°C/1min, 56°C/2min y 72°C/3 min; extensión 72°C/2 min.   |                       |
| <p><b>Par ZFY-1 y ZFY-2</b> flanquea una región de <b>400pb</b> del gen <i>ZFY</i> (Schneider-Gädicke y cols, 1989)</p>  |                       |
| ZFY-1: 5'-GAA TTC ATG AGG AGA CCA GAA G -3'  | T <sub>m</sub> = 64°C |
| ZFY-2: 5'- CAC AAA ACT TAC ACT TAT GCA T -3'   | T <sub>m</sub> = 58°C |
| Desnaturalización 94°C/3min; 35 ciclos de 94°C/1'30min, 60°C/1'30min y 72°C/1'30 min; extensión 72°C/7min.   |                       |
| <p><b>Par Y1.1 y Y1.2</b> define un fragmento de <b>154 pb</b> de una secuencia repetida de 3.4kb de la región heterocromática del brazo largo del cromosoma Y humano (Kogan y Gitschier,1990)</p> |                       |
| Y1.1: 5'-ATG ATA GAA CGC AAA TAT G -3'   | T <sub>m</sub> = 50°C |
| Y1.2: 5'-AGT AGA ATG CAA AGG GCT CC -3'  | T <sub>m</sub> = 60°C |
| Desnaturalización 95°C/5min; 35 ciclos de 94°C/1min, 57°C/1'30min y 72°C/2'30 min; extensión 72°C/7min.  |                       |

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada uno de los marcadores empleados están contenidas en la tabla 8.

Después de estandarizar las reacciones de amplificación, la mezcla de reacción empleada fue:

| <b>reactivo</b>  | <b>volumen</b> |
|--|----------------|
| Mezcla del par de oligonucleótidos (5 $\mu$ M de cada uno) | 1.0 $\mu$ l    |
| DNA (40ng)   | 2.0 $\mu$ l    |
| Amortiguador 10X ( <i>Gene Amp PCR Buffer II</i> )         | 1.0 $\mu$ l    |
| Mezcla de dNTPs (2.5 mM)                                   | 1.0 $\mu$ l    |
| DNA polimerasa Ampli Taq Gold™ (5U/ $\mu$ l)               | 0.08 $\mu$ l   |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)                                  | 1.0 $\mu$ l    |
| Agua estéril c.b.p.  | 3.92 $\mu$ l   |
| Mezcla total   | 10.0 $\mu$ l   |

Las condiciones se estandarizaron para poder amplificar los marcadores empleados inicialmente en cada paciente en una sola reacción y fueron las siguientes:

Desnaturalización previa a 95° C durante 12 min y:

94°C-15s    Diez  
55°C-15s    ciclos  
72°C-30s  
89°C-15s    Veintidós  
55°C-15s    ciclos  
72°C-30s

con extensión final a 72°C durante 10 min.

### **Preparación de las muestras para el analizador genético**

#### 1. Purificación de los productos de PCR por columnas de filtración en gel

Se hace pasar el producto de PCR a través de una columna de sefarosa de poro medio o fino (sephadex G-50) y por centrifugación selectiva (3000 rpm/ 6 min) se recupera el producto limpio (Sambrook y cols, 1989).

**Tabla 8. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar por PCR los marcadores microsatélite**

| <b>Locus</b>   | <b>Secuencia de los oligonucleótidos</b>                           |
|----------------|--|
| <b>DXS1060</b> | 5' AAAATTTAAAACATCTACTAGGCAGA3'<br>5' TACTGCGAACGGTGAGAG 3'        |
| <b>DXS8051</b> | 5' ACCAGAAATGAGCGATTATTG 3'<br>5' TTTTGAACCTAAGAACCTGGAG 3'        |
| <b>DXS987</b>  | 5' GTTGAGATAATGAGGCCAGT 3'<br>5' ACNTTAAAAGCCTGGTTCTTCTAAA 3'      |
| <b>DXS1226</b> | 5' CTAAACCCATCTGNCCTC 3'<br>5' TTTCCAGCAACTACCTTTCAT 3'            |
| <b>DXS1068</b> | 5' CCTCTAAAGCATAGGGTCCA 3'<br>5' CCCATCTGAGAACACGCTG 3'            |
| <b>DXS993</b>  | 5' GGATCCTGTTTACAGCCTGT 3'<br>5' CTACAGAGCAGTTCACTGGG 3'           |
| <b>DXS991</b>  | 5' ACTTCAACCACAGAAGCCTC 3'<br>5' ATCATTGAGCCAATTCTCC 3'            |
| <b>DXS986</b>  | 5' CCTAAGTGCTCATCATCCCA 3'<br>5' AGCTCAATCCAAGTTGCTGA 3'           |
| <b>DXS990</b>  | 5' AGCTATATGACCAGTACAAACATAC 3'<br>5' GACAGAAGGGACATCAACTC 3'      |
| <b>DXS1106</b> | 5' TATGAGAACTCCCTAAACAAA 3'<br>5' TGATGCACCAAATACCA 3'             |
| <b>DXS8055</b> | 5' AGTGGGTCACTCTAGTCATCAT 3'<br>5' TCAGGTTTCTGTGTGGACAT 3'         |
| <b>DXS1001</b> | 5' TACAAGTAACCCTCGTGACA 3'<br>5' GTTATGGAATCAATCCAAGTG 3'          |
| <b>DXS1227</b> | 5' AGAGGTCCGAGTCTTCCAC 3'<br>5' ATAAGGTTTACTCCCCCAA 3'             |
| <b>DXS8043</b> | 5' AGTTCTCAGAAACATTTGGTTAGGC 3'<br>5' AATTATTGGCAAAGAGTACAGGCAG 3' |
| <b>DXS1073</b> | 5' GGCTGACTCCAGAGGC 3'<br>5' CCGAGTTATTACAAAGAAGCAC 3'             |

## 2. Mezclas de los productos dependiendo del fluorocromo que porten

Se hace en las siguientes proporciones 1FAM:2HEX:2NED. Esta mezcla se diluye 1:1000 en agua estéril y se toma 1µl por cada 12 µl de ROX 350: formamida como estándar de tamaños (en una proporción 1:24). Se desnaturalizan las mezclas de reacción a 95°C/5 min e inmediatamente se ponen en hielo hasta el momento de ser aplicadas en el analizador genético. Posteriormente, se siguen las instrucciones sugeridas por el proveedor (*Gene Scan User's Manual PE*, 1999).

### **Separación de las muestras por electroforesis en capilar y análisis mediante el programa *Genescan***

Los productos de PCR con fluorescencia 6FAM(azul), HEX(verde) o NED(amarillo) se separan por electroforesis en capilar en el analizador genético ABI PRISM 310 PE, donde son analizados mediante el software *Gene Scan*. El analizador genético utiliza un sistema de detección de multicolores para distinguir alelos que se traslapan. Además determina el tamaño preciso de los productos de PCR a través de un estándar de tamaños interno, que se distingue de las muestras por estar marcado con un fluorocromo diferente, ROX-350(rojo) (ver anexo 3). Cada colorante fluorescente emite un espectro continuo de luz después de la excitación de un rayo láser. Durante una corrida de electroforesis, el sistema *ABI PRISM 310* graba la intensidad de fluorescencia como una función de tiempo y longitud de onda. Una matriz de corrección de multi-componentes se aplica a los datos de intensidad de fluorescencia y ya resueltas son codificadas en forma de color y desplegadas como picos en un electroferograma. El software cuenta con diferentes patrones para interpretar estos resultados como homocigoto, heterocigoto, etc. En el eje de las abscisas de cada electroferograma se localiza el tamaño de alelos en pares de bases (pb), y en el eje de las ordenadas una escala arbitraria de emisión de fluorescencia (*Gene Scan User's Manual PE*, 1999).

Las frecuencias alélicas de los marcadores utilizados fueron determinadas previamente y los alelos reales ordenados de menor a mayor tamaño para asignarles un número de acuerdo a su frecuencia. Estos datos están contenidos en las tesis de Vázquez Mena, CICATA-IPN 2000 y en la de Monroy-Jaramillo, Facultad de Ciencias, UNAM, 2002.

## **RESULTADOS**

### **Resultados de la amplificación por PCR de secuencias específicas del cromosoma Y en las pacientes Turner**

La amplificación por PCR de las secuencias centroméricas del cromosoma X fue positiva en todos los casos, sirviendo como un control interno, mientras que la amplificación de las secuencias centroméricas del Y sólo resultó positiva en los casos 11 y 12 (Figura 5). Adicionalmente, la amplificación por PCR de las otras 4 regiones del cromosoma Y (*PABY*, *SRY*, *ZFY* y *Yqh*) fue positiva en estas dos pacientes (Figura 6), lo que nos permite suponer la presencia de todas ellas en los der(Y). Los resultados obtenidos de la amplificación por PCR de las regiones específicas del cromosoma Y se muestran en la tabla 9. Ninguna de las 10 pacientes 45,X resultó positiva para la amplificación de *Ycen* por lo que es posible excluir que tengan una segunda línea celular que resulte en mosaicismo críptico para el cromosoma Y.

### **Estudios citogenéticos moleculares en las pacientes Turner**

Las reacciones independentientes de PRINS utilizando oligonucleótidos para las regiones alpha centroméricas de los cromosomas X y Y, nos permitieron confirmar que los marcadores de las pacientes 11 y 12 se originaron a partir de un cromosoma Y, siendo dicéntrico el de la paciente 11 (Figs 7A-B), corroborar que el cromosoma anormal de la paciente 14 es un pseudodicéntrico derivado del X (Fig 7E) y demostrar que los anillos presentes en las pacientes 15 a 20 son realmente derivados del X (Figs 7 F-K).

Los resultados obtenidos mediante FISH con la sonda para la región heterocromática del brazo largo del cromosoma Y permitieron corroborar citogenéticamente en las pacientes con cromosoma Y los datos moleculares previamente obtenidos, revelando que el cromosoma dicéntrico de la paciente 11 mostraba dos señales positivas, una en cada extremo, mientras que el de la paciente 12 presentaba una región heterocromática pequeña en *Yq* (Figs 7C-D). Los hallazgos de la citogenética molecular, análisis por PCR y el cariotipo final de las pacientes estudiadas se resumen en la tabla 9.

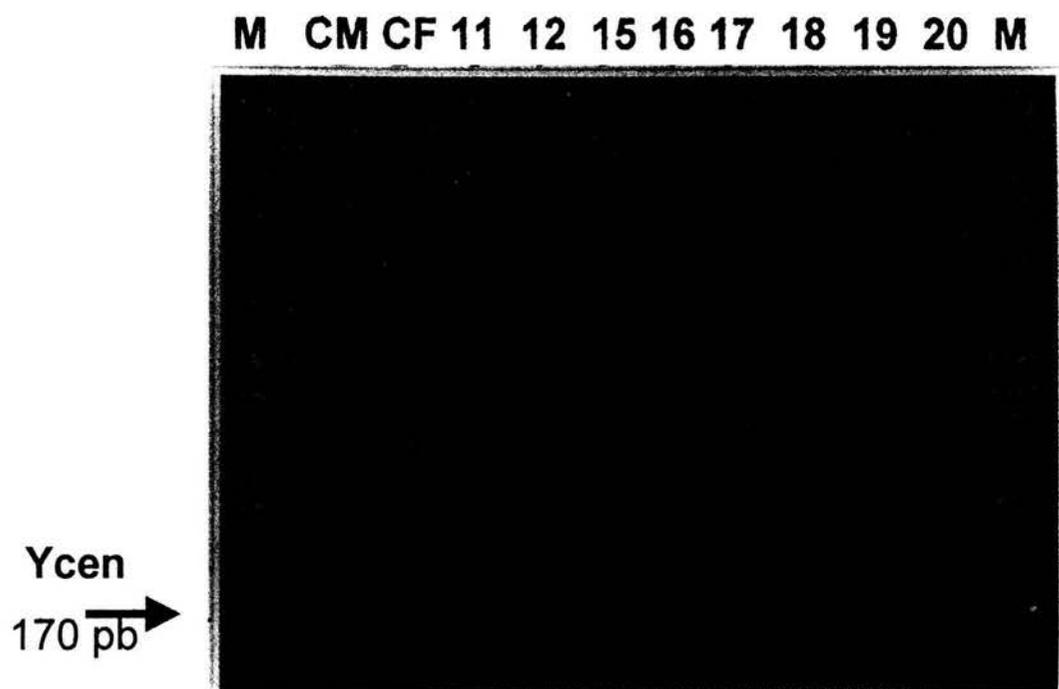


Figura 5. Análisis electroforético de los productos de PCR para Ycen en las pacientes 11, 12 y 15 a 20. M marcador peso molecular, CM control masculino, CF control femenino.

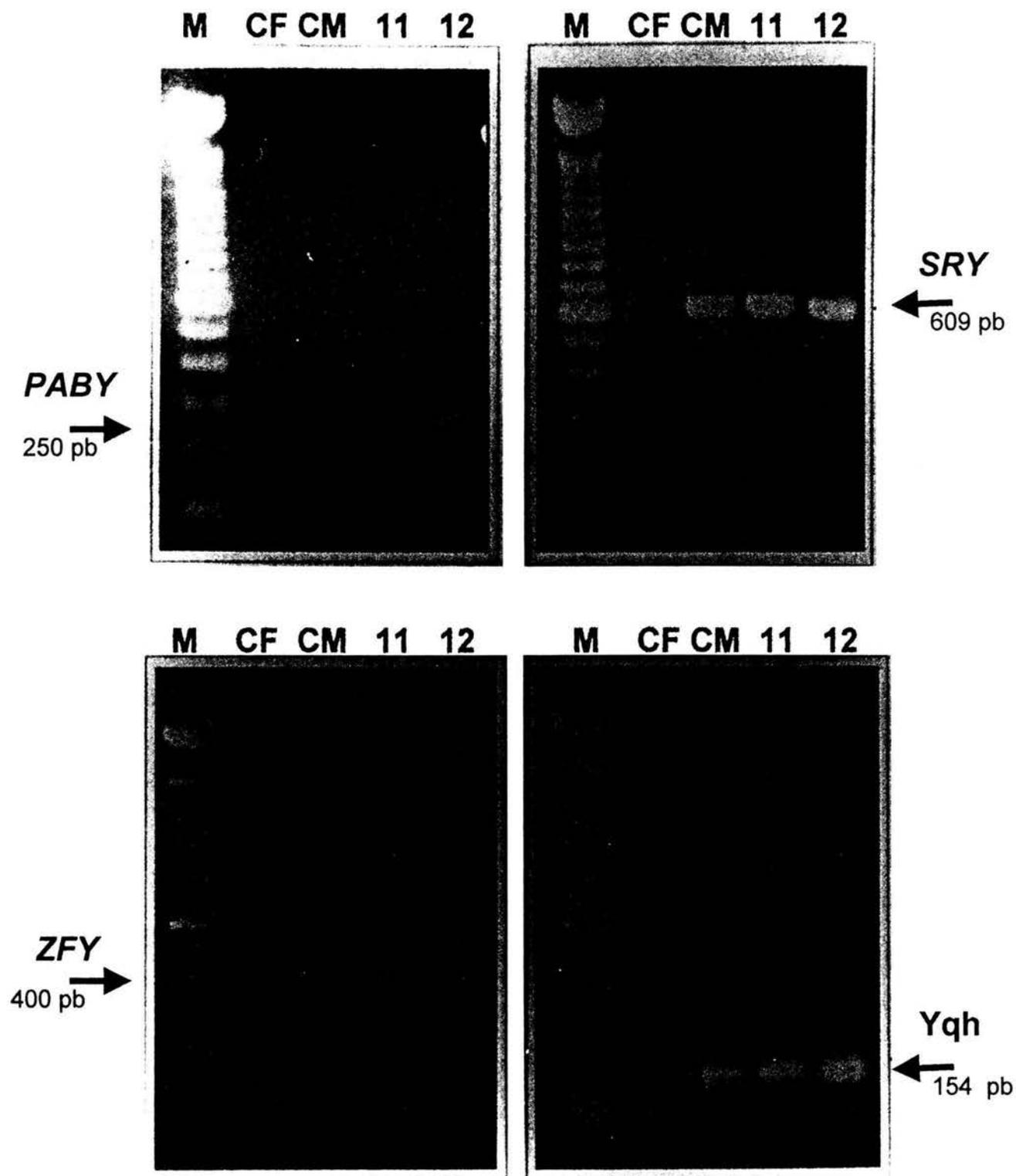


Figura 6. Resultados de la amplificación por PCR de secuencias específicas del cromosoma Y en las pacientes 11 y 12. M. marcador peso molecular, CF control femenino y CM control masculino.

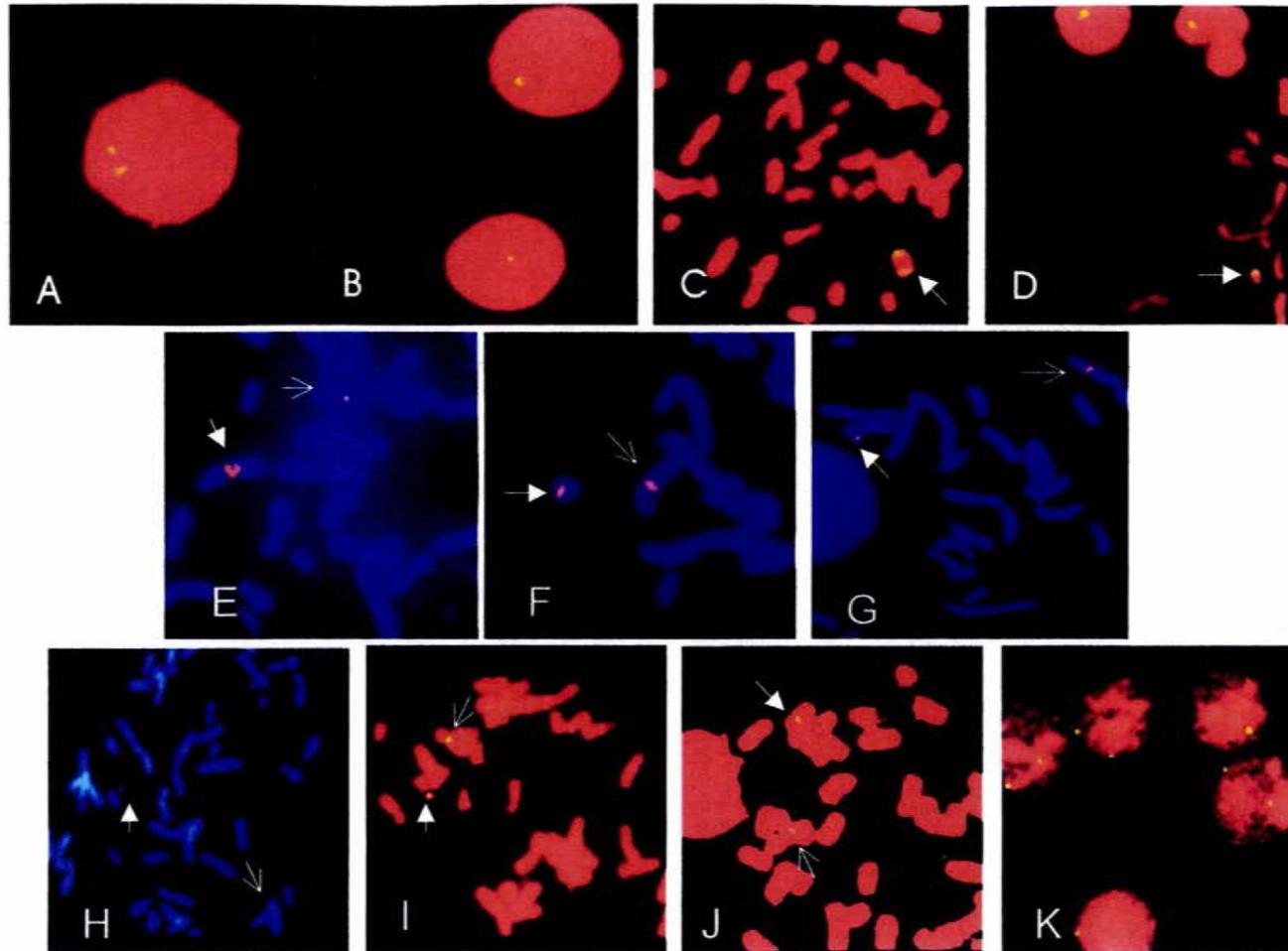


Figura 7. Resultados de los estudios citogenéticos moleculares. **A y B:** Reacción de PRINS para Ycen revelada con anticuerpos antidigoxigenina conjugados con fluoresceína y contratinción con PI en las pacientes 11 y 12, respectivamente. **C y D:** FISH con la sonda para Yqh marcada con digoxigenina y revelado con anticuerpos conjugados con fluoresceína en las pacientes 11 y 12, respectivamente. **E-H** Reacción de PRINS para Xcen revelado con anticuerpos marcados con rodamina y contratinción con DAPI en las pacientes 14-17 respectivamente. **I-K.** FISH con sonda para Xcen marcada con fluoresceína y contratinción con PI en las pacientes 18-20 respectivamente.

**Tabla 9. Datos obtenidos de la amplificación por PCR de secuencias específicas del cromosoma Y y de las técnicas de citogenética molecular**

| CASO | PCR  |      |      |     |     |     | PRINS |      | FISH |     | CARIOTIPO FINAL  |
|------|------|------|------|-----|-----|-----|-------|------|------|-----|--|
|      | Xcen | Ycen | PABY | SRY | ZFY | Yqh | Xcen  | Ycen | Xcen | Yqh |  |
| 11   | +    | +    | +    | +   | +   | +   | 1     | 0/2  | 1    | 0/2 | 45,X[27]/46,X,psudic(Y)(p11.3)[73].ish psudic(Y) (DYZ1++,DYZ3++) |
| 12   | +    | +    | +    | +   | +   | +   | 1     | 0/1  | 1    | 0/1 | 45,X[68]/46,XYqh-[32].ish(Yqh-)(DYZ1+,DYZ3+)                     |
| 14   | +    | -    | -    | -   | -   | -   | 1/3   | 0    | 1/3  | -   | 45,X[45]/46,X,psudic(X)(p11.2) [55].ish psudic(X) (DXZ1++)       |
| 15   | +    | -    | -    | -   | -   | -   | 1/2   | 0    | 1/2  | -   | 45,X[75]/46,X,r(X)[25].ish r(X)(DXZ1+)                           |
| 16   | +    | -    | -    | -   | -   | -   | 1/2   | 0    | 1/2  | -   | 45,X[72]/46,X,r(X)[28].ish r(X)(DXZ1+)                           |
| 17   | +    | -    | -    | -   | -   | -   | 1/2   | 0    | 1/2  | -   | 45,X[35]/46,X,r(X)[73].ish r(X)(DXZ1+)                           |
| 18   | +    | -    | -    | -   | -   | -   | 1/2   | 0    | 1/2  | -   | 45,X[50]/46,X,r(X)[50].ish r(X)(DXZ1+)                           |
| 19   | +    | -    | -    | -   | -   | -   | 1/2   | 0    | 1/2  | -   | 45,X[74]/46,X,r(X)(p22.3q28)[26].ish r(X)(DXZ1+)                 |
| 20   | +    | -    | -    | -   | -   | -   | 1/2   | 0    | 1/2  | -   | 45,X[61]/46,X,r(X)(p21.2q24-25)[39].ish r(X) (DXZ1+)             |

## **Análisis con marcadores microsatélites del cromosoma X en las pacientes con síndrome de Turner**

En general el uso de 5 marcadores informativos fue suficiente para determinar el origen parental de los cromosomas X en todas las pacientes estudiadas. En la paciente 10, en quien no fue posible obtener una muestra de su padre, su único cromosoma X fue de origen materno con base a que la propósa y su madre comparten los alelos de los 5 *loci* analizados. Ninguna de las 10 pacientes 45,X resultó heterocigota para alguno de los microsatélites empleados, excluyendo una segunda línea celular con mosaicismo críptico para el cromosoma X (Tabla 10). En la figura 8 se muestra un ejemplo de un marcador informativo para establecer el origen parental del cromosoma X presente.

En tres de las 5 pacientes con mosaico analizadas con microsatélites del X, el cromosoma X anormal fue de origen materno, casos 14, 19 y 21, con cariotipos 45,X/46,X,psu dic(X)(p11.2), 45,X/46,X,r(X)(p22.2q28) y 45,X/46,X,del(X)(q23), respectivamente. En los casos 13 y 18, con cariotipos 45,X/46,X,i(Xq) y 45,X/46,X,r(X)(p11.3q13?), respectivamente, los derivados del X fueron de origen paterno. Ninguna de estas pacientes presentó disomía uniparental del X y los resultados obtenidos permitieron corroborar los puntos de ruptura en los 5 cromosomas anormales (Tabla 11).

El análisis adicional de otros miembros de las familias de la paciente 19, con el cromosoma X pseudodicéntrico y de la paciente 21 con la delección de Xq, ambos de origen materno, permitió establecer los haplotipos de los cromosomas X maternos (Figuras 9 y 10). Los datos obtenidos fueron analizados para inferir los eventos de recombinación ocurridos durante la meiosis materna que pudieran estar implicados en el mecanismo de formación de los cromosomas anormales.

**Tabla 10. Resultados obtenidos con los marcadores del cromosoma X en las pacientes 45,X y edad de sus padres al nacimiento de la propósa.**

| Caso | Cariotipo | Marcadores del cromosoma X usados |         |        |         |         |        |        |         |         |         | Edad de los padres (años) |        | Origen parental cromosoma X presente |
|------|-----------|-----------------------------------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|---------|---------------------------|--------|--------------------------------------|
|      |           | DXS1060                           | DXS8051 | DXS987 | DXS1226 | DXS1068 | DXS991 | DXS986 | DXS1106 | DXS8055 | DXS1073 | Padre                     | Madre  |                                      |
| 1    | 45,X      | M                                 | ND      | ND     | ND      | U       | M      | M      | M       | M       | U       | 47                        | 44     | Materno                              |
| 2    | 45,X      | U                                 | ND      | P      | ND      | U       | P      | P      | U       | P       | P       | 32                        | 33     | Paterno                              |
| 3    | 45,X      | U                                 | ND      | M      | ND      | U       | M      | M      | M       | M       | U       | 19                        | 18     | Materno                              |
| 4    | 45,X      | U                                 | U       | M      | ND      | M       | M      | ND     | M       | ND      | M       | 34                        | 36     | Materno                              |
| 5    | 45,X      | U                                 | M       | M      | U       | ND      | M      | M      | ND      | ND      | M       | 35                        | 33     | Materno                              |
| 6    | 45,X      | U                                 | M       | U      | M       | ND      | M      | M      | ND      | ND      | M       | 28                        | 33     | Materno                              |
| 7    | 45,X      | ND                                | M       | M      | M       | ND      | M      | ND     | M       | M       | ND      | 32                        | 29     | Materno                              |
| 8    | 45,X      | ND                                | U       | M      | M       | ND      | M      | ND     | M       | M       | ND      | 35                        | 19     | Materno                              |
| 9    | 45,X      | ND                                | M       | M      | ND      | ND      | M      | M      | ND      | M       | ND      | 15                        | 26     | Materno                              |
| 10   | 45,X      | ND                                | M       | M      | M       | ND      | M      | ND     | M       | M       | ND      | 20                        | 16     | Materno                              |
|      |           |                                   |         |        |         |         |        |        |         |         |         | X=29.7                    | X=28.7 |                                      |

M: alelo materno, P: alelo paterno, U: no informativo, ND: no determinado

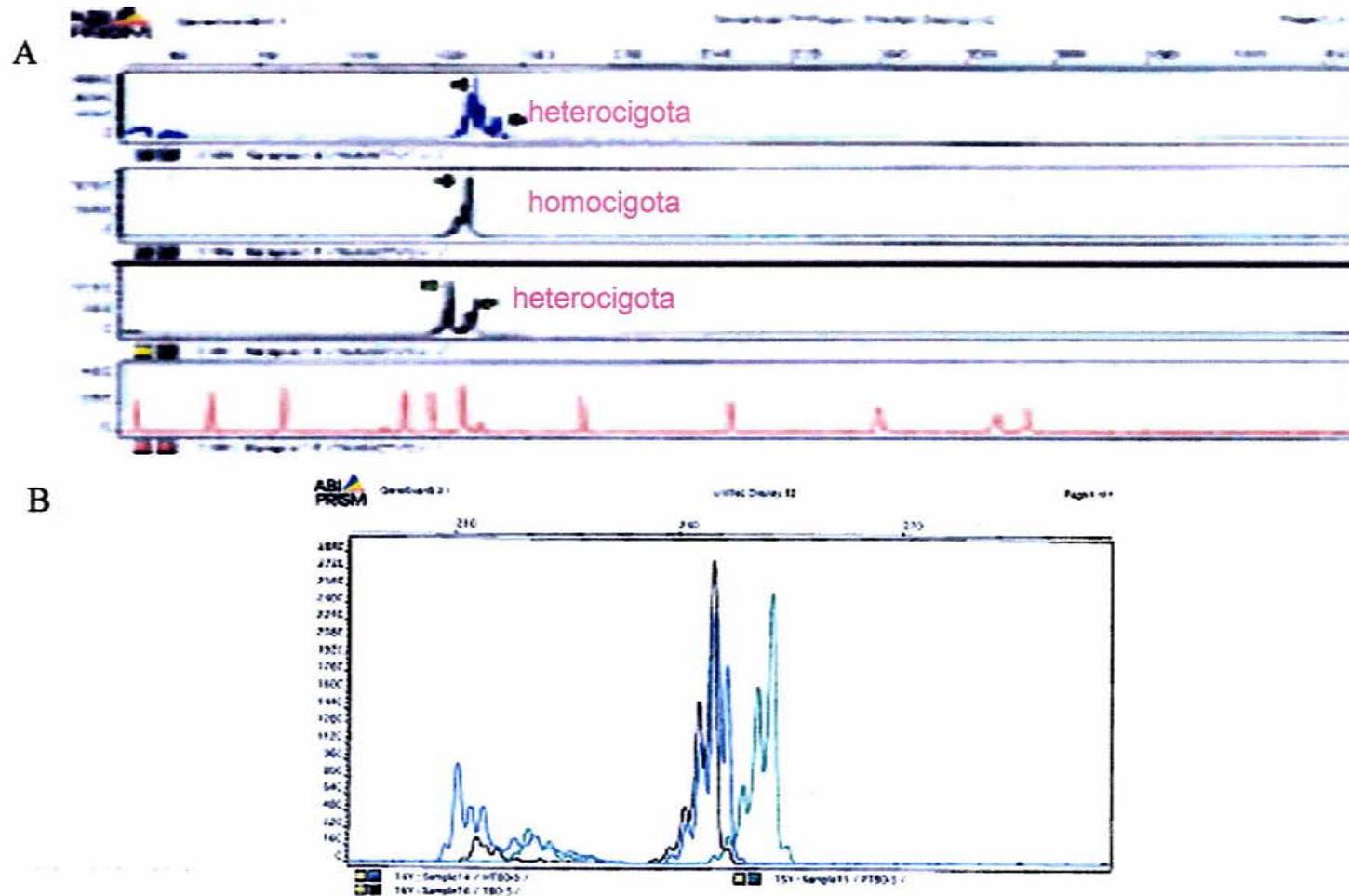


Figura 8. **A.** Electroferogramas típicos de Genescan. Se muestran 3 *loci* microsatélites marcados con diferentes fluorocromos del DNA control del CEPH. En azul, DXS986 con [FAM], en verde DXS1047 con [HEX] y en negro DXS8043 con [NED]. En rojo la curva estandar de tamaños con [ROX350]. **B.** Electroferograma del *locus* DXS en una paciente 45,X donde el único alelo presente en la paciente (en negro) corresponde con uno de los dos alelos maternos (en azul), se observa también el alelo paterno (en verde).

**Tabla 11. Resultados de los marcadores del cromosoma X en las pacientes con cromosomas X anormales y edad de sus padres al nacimiento de la propósa.**

| Caso | Cariotipo                   | Marcadores del cromosoma X usados |         |        |         |        |         |         |         |         |        | Edad padres (años) |         | Origen del cromosoma X anormal |
|------|-----------------------------|-----------------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|--------------------|---------|--------------------------------|
|      |                             | DXS1060                           | DXS8051 | DXS987 | DXS1226 | DXS993 | DXS991  | DXS986  | DXS1001 | DSX1073 | Padre  | Madre              |         |                                |
| 13   | 45,X/46,X,i(Xq)             | U                                 | U       | M/-    | M/-     | ND     | M/-     | M/P     | ND      | M/P     | 40     | 33                 | Paterno |                                |
| 14   | 45,X/46,X,psudic(X) (p11.2) | ND                                | P/-     | P/-    | P/-     | P/M?   | P/M     | P/M     | ND      | ND      | 33     | 33                 | Materno |                                |
| 18   | 45,X/46,X,r(X)(p11.3q13?)   | U                                 | M/-     | M/-    | M/-     | U      | M/P     | M/-     | M/-     | U       | 26     | 24                 | Paterno |                                |
| 19   | 45,X/46,X,r(X)(p22.2q28)    | P/-                               | P/-     | P/M    | U       | P/M    | P/M     | ND      | P/M     | P/M     | 28     | 31                 | Materno |                                |
|      |                             | DXS8051                           | DXS1226 | DXS993 | DXS986  | DXS990 | DXS1106 | DXS8055 | DXS1227 | DXS8043 |        |                    |         |                                |
| 21   | 45,X/46,X,del(X)(q23)       | P/M                               | P/M     | P/M    | P/M     | P/M    | P/M     | P/-     | P/-     | P/-     | 45     | 43                 | Materno |                                |
|      |                             |                                   |         |        |         |        |         |         |         |         | X=34.4 | X=32.8             |         |                                |

M: alelo materno, P: alelo paterno, U: no informativo, ND: no determinado

Nota: alelo del cromosoma en la primera línea celular/ alelo en la segunda línea celular

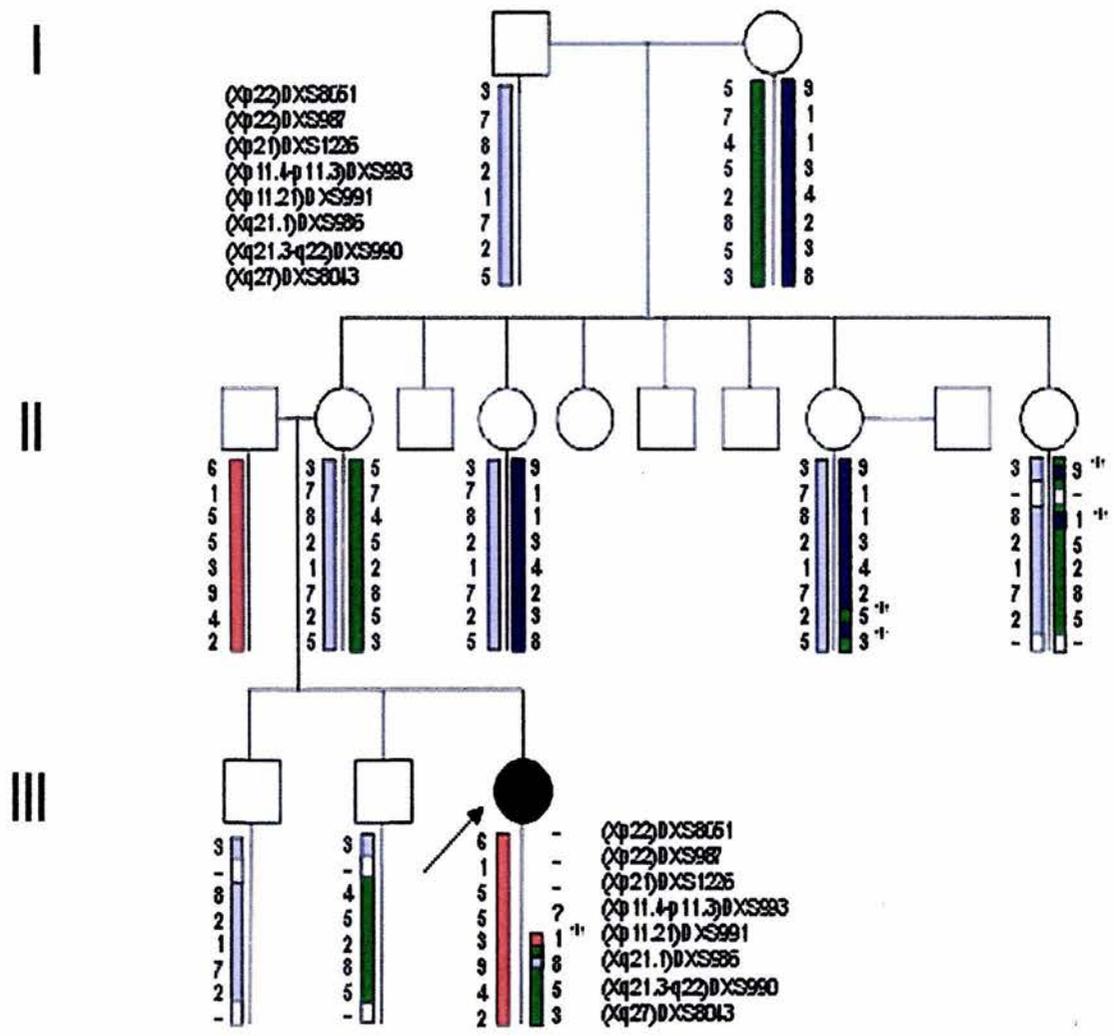


Figura 9. Árbol genealógico y análisis de haplotipos de la paciente 14. Los haplotipos de I.1 y I.2 se obtuvieron por deducción. (\* recombinación meiótica)

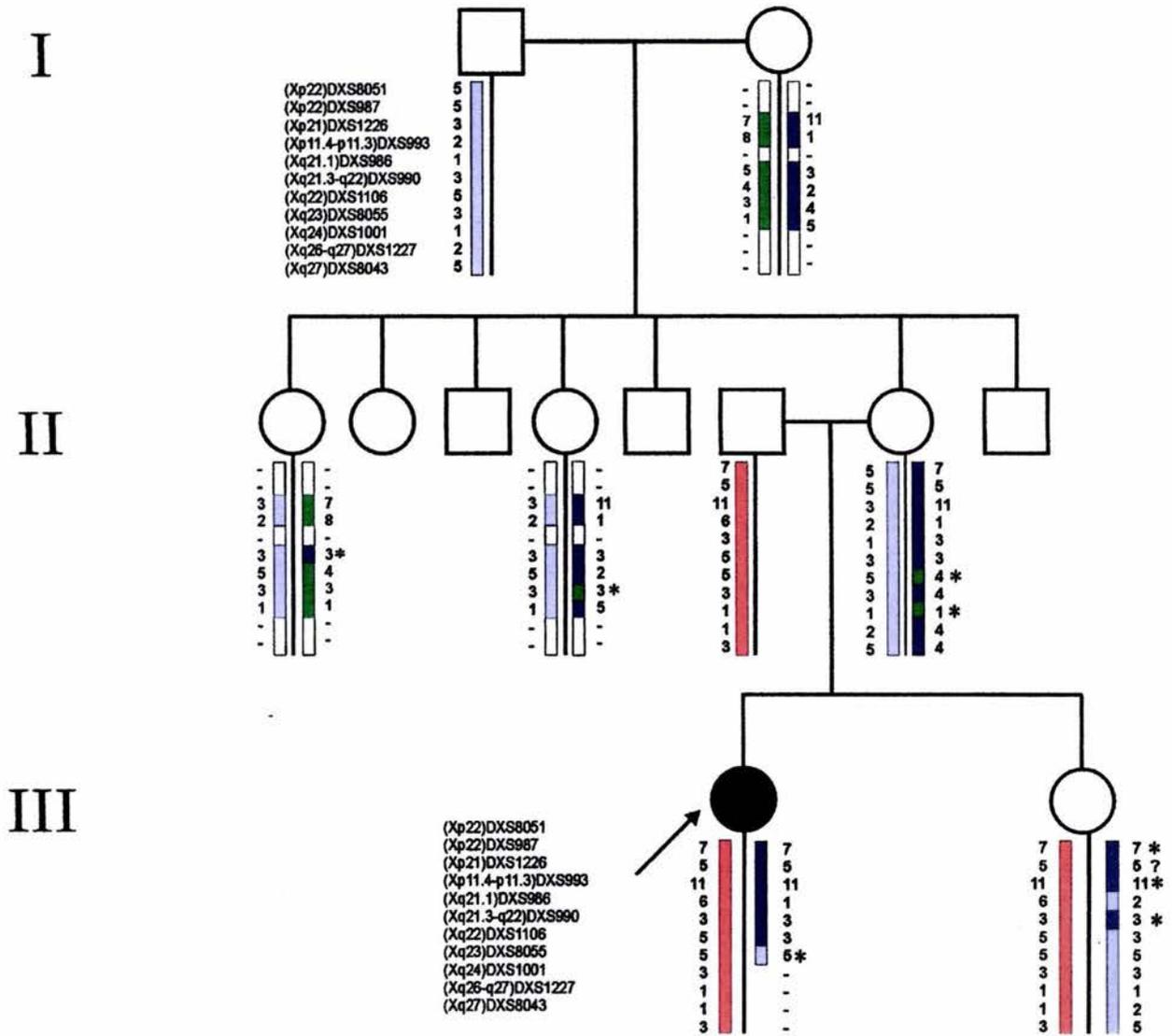


Figura 10. Árbol genealógico y análisis de haplotipos de la paciente 21. (\* recombinación meiótica)

## DISCUSIÓN

El comportamiento de los cromosomas sexuales durante las meiosis femenina y masculina es diferente en varios aspectos, principalmente en cuanto a la recombinación y el estado de activación de los genes localizados en ellos. Particular interés se ha puesto a la relación que tienen estos eventos en la fertilidad del individuo, tanto a nivel del desarrollo y mantenimiento gonadal como en la producción de gametos normales. En esta última es importante la relación que guarda la recombinación meiótica con los errores producidos durante la segregación cromosómica que conducen a gametos aneuploides. A pesar de que los mecanismos de segregación son los mismos en las meiosis femenina y masculina, en los humanos existen algunas diferencias sexo específicas, principalmente en los tiempos, mecanismos de control y duración del proceso.

A pesar de que es bien conocido el efecto de la edad materna en la incidencia de trisomías, las causas que la originan aún no han sido dilucidadas. Estudios recientes señalan una importante participación de la recombinación meiótica en la segregación correcta, al demostrar una alta incidencia de cromosomas aciasmáticos en productos con trisomía 21 tanto en madres jóvenes como añosas (Lamb y cols, 1997; Savage y cols, 2000). Sin embargo, esto llevó a proponer que en las madres añosas además se requieran otros eventos, tales como alteraciones en la organización de los microtúbulos y en los complejos de cohesinas, que aunados a la falta de un punto de control en la transición metafase-anafase aumentaría la posibilidad de errores en la segregación cromosómica. Aparentemente otro factor importante en el efecto de la edad materna es el estado hormonal, es decir que tan cerca están de la menstruación, que altera la maduración de los ovocitos y podría afectar también la producción de proteínas para el huso y por lo tanto la segregación cromosómica (Hassold y cols, 2000; Heemst y Heyting, 2000; Hassold y Hunt, 2001; Hodges y cols, 2002; Hunt y Hassold, 2002). La no-disyunción del cromosoma X materno ha sido estudiada en productos 47,XXX y 47,XXY de origen materno, la mayoría de los casos corresponden a errores de meiosis I en donde la ausencia de recombinación representa un factor predisponente importante con efecto de la edad. Sin embargo, en los casos producto de errores en meiosis II no se encontraron alteraciones en la recombinación, ni efecto de la edad, por el contrario, se evidenció un efecto de la edad materna en aquellos casos debidos a errores postcigóticos (Thomas y cols, 2001). Asimismo un estudio reciente, en que se observaron los

patrones de recombinación meiótica en ovocitos fetales, señala que en general no se presentan patrones anormales de recombinación en el par sexual, aunque si se observan cromosomas X asináplicos con baja frecuencia que seguramente son la fuente de bivalentes aquíasmáticos y de no disyunción de los cromosomas X; ya que como ha sido demostrado un par cromosómico asináplico no detiene el desarrollo fetal y contribuye a la poza de ovocitos del ovario adulto (Tease y cols, 2002).

La contribución paterna en la generación de trisomías de autosomas es mínima comparada con la materna, no así en la producción de individuos 47,XXY y 47,XXX donde se ha observado un aporte equitativo y un efecto de edad en ambos sexos (Koehler y cols, 1996; Hassold y Hunt, 2001; Lowe y cols, 2001; Moore y Best, 2001). Esta contribución paterna a las aneuploidías de los cromosomas sexuales se ha atribuido a la mayor labilidad del par XY para la no disyunción durante la primera división meiótica (Chandley y cols, 1984; Hassold y cols, 1991; Burgoyne y cols, 1992; Delobel y cols, 1998). Contrariamente a lo que ocurre en las trisomías de autosomas, en las pacientes 45,X, el cromosoma presente en la mayoría de los casos es el materno, lo que indica la falta de un cromosoma sexual paterno, X o Y (Jacobs y cols, 1990; 1997; Uematsu y cols, 2002) (Tabla 12).

Existen dos mecanismos posibles que lleven a una constitución cromosómica 45,X. Uno es la generación de gametos nulisómicos para los cromosomas sexuales como consecuencia de una no disyunción meiótica, seguida de fertilización con un gameto normal. Si se asume una probabilidad igual de generación de gametos nulisómicos en cada sexo, el origen del cromosoma X presente en las pacientes 45,X debería ser materno en las dos terceras partes, debido a la no viabilidad de los productos 45,Y. Esta hipótesis parecería explicar los datos encontrados en los estudios en que se ha determinado el origen parental de los cromosomas X presentes en las pacientes 45,X (Tabla 12), lo que implicaría que hubiera un efecto de la edad materna en los casos 45,X<sup>P</sup>, sin embargo, los datos reportados descartan su participación. (Hassold y cols, 1988; Jacobs y cols, 1997) El otro mecanismo posible para originar un cariotipo 45,X, es la pérdida mitótica de uno de los cromosomas sexuales en células con cariotipos con un segundo cromosoma sexual estructuralmente normal o anormal. Los cromosomas anormales, dicéntricos, anillos, isocromosomas, son inestables durante las divisiones celulares y tienden a perderse; adicionalmente se ha propuesto que la inactivación preferencial de los cromosomas X anormales

**Tabla 12. Reportes en la literatura de estudios sobre el origen parental del cromosoma X normal en pacientes con síndrome de Turner**

| Sujetos | Cariotipo 45,X + segunda línea con |    |       |    |                |                |                 |                |    |   | Referencia |                                 |
|---------|------------------------------------|----|-------|----|----------------|----------------|-----------------|----------------|----|---|------------|---------------------------------|
|         | solo                               |    | i(Xq) |    | r(X)/mar(X)    |                | del(Xp)/del(Xq) |                | Y  |   |            |                                 |
|         | M                                  | P  | M     | P  | M              | P              | M               | P              | M  | P |            |                                 |
| 5       |                                    |    | 2     | 3  |                |                |                 |                |    |   |            | Callen y cols, 1987             |
| 8       |                                    |    | 2     | 6  |                |                |                 |                |    |   |            | Harbison y cols, 1988           |
| 34      | 27                                 | 7  |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Hassold y cols, 1988            |
| 66      | 53                                 | 13 |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Hassold y cols, 1990            |
| 52      | 36                                 | 16 |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Jacobs y cols, 1990             |
| 9       | 7                                  | 2  |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Villamar y cols, 1990           |
| 8       | 6                                  | 2  |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Cockwell y cols, 1991           |
| 14      |                                    |    | 5     | 9  |                |                |                 |                |    |   |            | Lorda-Sánchez y cols, 1991      |
| 34      | 16                                 | 0  | 5     | 2  | 6              | 2              | 0               | 1              |    |   |            | Loughlin y cols, 1991           |
| 25      | 18                                 | 7  |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Mathur y cols, 1991             |
| 33      | 29                                 | 4  |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Hassold y cols, 1992            |
| 45      | 35                                 | 10 |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Lorda-Sánchez y cols, 1992a     |
| 52      | 23                                 | 9  | 4     | 6  | 7              | 3              |                 |                |    |   |            | Chu y cols, 1994                |
| 24      | 8                                  | 7  |       |    | 4              | 5              |                 |                |    |   |            | Collins y cols, 1994            |
| 43      | 28                                 | 15 |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Larsen y cols, 1995             |
| 188     | 69                                 | 24 | 15    | 20 | 24             | 9              | 8               | 2              | 12 | 1 |            | Jacobs y cols, 1997             |
| 35      |                                    |    | 17    | 18 |                |                |                 |                |    |   |            | James y cols, 1997a             |
| 21      |                                    |    |       |    |                |                | 19              | 2              |    |   |            | James y cols, 1998              |
| 6       |                                    |    |       |    | 3 <sup>a</sup> | 3 <sup>a</sup> |                 |                |    |   |            | Yorifuji y cols, 1998           |
| 14      | 9                                  | 3  | 1     | 0  |                |                | 1               | 0              |    |   |            | Martínez-Pasarell y cols, 1999a |
| 110     | 79                                 | 31 |       |    |                |                |                 |                |    |   |            | Skuse y cols, 1999              |
| 30      | 7                                  | 9  | 4     | 2  | 3              | 2              |                 |                |    |   |            | Tsezou y cols, 1999             |
| 5       |                                    |    |       |    | 3 <sup>b</sup> | 2              |                 |                |    |   |            | Matsuo y cols, 2000b            |
| 7       |                                    |    |       |    | 6 <sup>c</sup> | 1              |                 |                |    |   |            | Turner y cols, 2000a            |
| 50      | 16                                 | 5  | 6     | 5  | 4              | 3              | 4               | 0              | 7  | 0 |            | Uematsu y cols, 2002            |
| 15      | 9                                  | 1  | 1     | 1  | 1              | 1              | 0               | 1 <sup>d</sup> |    |   |            | este trabajo                    |

<sup>a</sup> un caso con disomía uniparental materna y otro con disomía uniparental paterna

<sup>b</sup> en dos casos con paternidad comprobada no se detectaron alelos paternos, probable disomía uniparental materna

<sup>c</sup> disomía uniparental materna en un r(X) y en otros tres no se determinó el origen del anillo

<sup>d</sup> caso con delección de Xq

contribuye en este proceso (Held y cols, 1992; Miller y Therman, 2001). Esta segunda posibilidad es apoyada por la propuesta de que la mayoría de los productos 45,X que llegan a término son en realidad mosaicos (Held y cols, 1992).

En la literatura existen múltiples reportes de búsqueda de mosaicismo críptico para el cromosoma Y en las pacientes con fenotipo Turner, en los cuales la frecuencia varía considerablemente de 0 a 60%, dependiendo fundamentalmente de la selección de las pacientes y de los métodos empleados (Larsen y cols, 1995; Fernández y cols, 1996; López y cols, 1998; Nishi y cols, 2002). En ninguna de las 10 pacientes 45,X estudiadas se detectaron por PCR secuencias centroméricas del cromosoma Y, descartando la presencia de una segunda línea celular con un cromosoma derivado del cromosoma Y.

Contrariamente, existen pocos reportes de búsqueda de mosaicismo críptico para el cromosoma X en pacientes con síndrome de Turner diagnosticadas citogenéticamente como 45,X, el cual puede estar presente en 0 a 75% de estas pacientes (Hassold y cols, 1988; Mathur y cols, 1991; Hassold y cols, 1992; Larsen y cols, 1995; Jacobs y cols, 1997; Yorifuji y cols, 1997; Martínez-Passarell y cols, 1999a; Nazarenko y cols, 1999; Fernández-García y cols, 2000; Uematsu y cols, 2002) (Tabla 12). En nuestras pacientes 45,X, la ausencia de heterocigocidad para alguno de los marcadores del cromosoma X utilizados excluye la presencia de mosaicismo críptico (Tabla 10), lo cual estaría en contraposición con lo reportado en la literatura (Hassold y cols, 1988; Mathur y cols, 1991; Hassold y cols, 1992; Larsen y cols, 1995; Jacobs y cols, 1997; Yorifuji y cols, 1997; Martínez-Passarell y cols, 1999a; Nazarenko y cols, 1999; Fernández-García y cols, 2000; Uematsu y cols, 2002). El hecho de no haber encontrado en ninguna de nuestras pacientes mosaicismo críptico puede deberse: (i) a lo pequeño de la muestra, sólo 10 sujetos, (ii) a que el análisis se efectuó en un solo tejido o (iii) a que ya había sido descartado en el análisis citogenético convencional, dado que se analizaron 100 metafases. A pesar de que nuestros datos difieren de los previamente reportados, podemos asumir que estas pacientes no son mosaicos en sangre periférica debido a que se empleó un método muy sensible de amplificación por PCR y el examen de repetidos CA. Aunque no se validó formalmente la sensibilidad del método empleado, la probabilidad de detectar mosaicos del X aún en niveles muy bajos se incrementa considerablemente por el uso de al menos 5 marcadores polimórficos informativos en cada caso, tal como ya ha sido reportado (Larsen y cols, 1995; Martínez-

Passarell, y cols, 1999a). Es importante señalar que la electroforesis en capilar con detección de fluorescencia inducida con láser es una herramienta analítica con una sensibilidad extremadamente alta, del orden de yocto moles (Righetti y Gelfi, 1997). Sin embargo, no podemos excluir la presencia de un cromosoma marcador muy pequeño derivado del brazo largo del X debido a que no se incluyó un marcador microsatélite pericentromérico en Xq. Actualmente, en diferentes trabajos reportados en la literatura, se está empleando con este fin el polimorfismo del repetido CAG presente en el gen del receptor de andrógenos localizado en Xq12.1 (Leonova y Hanson, 1999; Martínez Passarell y cols, 1999a, Matsuo y cols, 2000b, Uechara y cols, 2002).

Se ha especulado que la mayoría de los individuos vivos con complemento cromosómico 45,X provienen de un error mitótico temprano en el cigoto y en realidad son mosaicos (Hook y Warburton, 1983; Held y cols, 1992). Leonova y Hanson (1999) demostraron la presencia de heterocigocidad para el gen del receptor de andrógenos en 20 pacientes Turner mosaicos, confirmando que la mayoría de los mosaicos 45,X/46,XX son producto de la pérdida de un cromosoma X en algunas líneas celulares a partir de un cigoto originalmente 46,XX, más que de un rescate de las concepciones 45,X por una no-disyunción mitótica durante la embriogénesis temprana. De hecho, si el cigoto original fuera 45,X<sup>M</sup>, los sujetos que fueran mosaicos crípticos tendrían una disomía uniparental. En nuestros 10 casos 45,X es imposible descartar una disomía uniparental con los métodos utilizados, pero de acuerdo con Jacobs y cols (1997) y Leonova y Hanson (1999) esto es un evento altamente improbable. Por otra parte, se ha sugerido que la disomía uniparental puede contribuir al retardo mental en las pacientes Turner (Yorifuji y cols, 1998) y ninguna de nuestras pacientes 45,X presenta esta anomalía.

Con respecto al origen parental de los cromosomas X en las pacientes 45,X, en 9 de ellas fue materno y solo en el caso 2 fue paterno (Tabla 10). Estos datos concuerdan con lo descrito en otras series (Hassold y cols, 1988; 1992; Jacobs y cols, 1990; 1997; Villamar y cols, 1990; Mathur y cols, 1991; Cockwell y cols, 1991; Loughlin y cols, 1991; Lorda Sánchez y cols, 1992a; Collins y cols, 1994; Chu y cols, 1994; Larsen y cols, 1995; Yorifuji y cols, 1997; Martínez – Passarell y cols, 1999a; Tsezou y cols, 1999) (Tabla 12). Para explicar la alta prevalencia del cromosoma X materno se ha propuesto que pueda ser debida a que los productos 45,X retengan el cromosoma X materno debido a un incremento en la pérdida del cromosoma paterno en el

estado de pronúcleos (Chandley, 1991). En un trabajo reciente, se encontró una frecuencia baja de mosaicismo críptico (2.3%) con una proporción de células normales menor del 10% en la mayoría de las pacientes con síndrome de Turner estudiadas. Los autores concluyeron que a pesar de que algunas anormalidades pueden ocurrir en el estado de pronúcleos o durante la primera división del cigoto, la mayoría debe ser el resultado de errores durante la espermatogénesis (Jacobs y cols, 1997). Los datos encontrados en este trabajo, están de acuerdo con esta propuesta, permitiendo sugerir que la mayoría de las pacientes Turner con cariotipo 45,X no son mosaicos y que probablemente son el resultado de un error durante la espermatogénesis que llevó a la formación de un gameto nulisómico. Esta propuesta que puede ser apoyada, por la susceptibilidad del par sexual a la no disyunción durante la meiosis I, demostrada tanto en esperma de hombres normales (Griffin y cols, 1995; Martín y cols, 1995; Guttenbach y cols, 2000; Sartorelli y cols, 2001), como en padres de individuos con síndromes de Klinefelter (Lowe y cols, 2000) y Turner (Martínez-Passarell y cols, 1999b; 1999c; Soares y cols, 2001b).

Se ha hipotetizado que el apareamiento y recombinación entre los cromosomas X y Y es un prerequisite para que la meiosis masculina pueda completarse. En los humanos, individuos que carecen de apareamiento X-Y son estériles y una recombinación reducida se ha asociado con una segregación incorrecta produciendo individuos aneuploides (Hassold y cols, 1991). Así mismo se ha postulado que la inactivación de los cromosomas sexuales en paquiteno, formando el cuerpo XY es importante en la regulación del proceso meiótico y para asegurar la segregación correcta del par sexual (Turner y cols, 2000b y 2001). Dentro de los factores que originan una segregación incorrecta de los cromosomas sexuales en la meiosis masculina se ha correlacionado la falta de recombinación en la PAR1 en Xp y Yp en individuos 47,XXY de origen paterno (Hassold y cols, 1991; Mohandas y cols, 1992). En los estudios realizados en productos aneuploides existe una asociación entre la aneuploidía y los patrones alterados de recombinación, tanto en los errores paternos como en los maternos. La reducción de la recombinación se debe a ausencia total o a un número reducido de intercambios. De esta forma se estima que cerca de 70% de los casos paternos 47,XXY resultan de una meiosis donde el bivalente XY falla para aparearse o recombinar (Hassold y cols, 1991). Estos hallazgos son contrastantes con los observados en una situación normal, donde existen entrecruzamientos obligatorios, que se encuentran implicados en una adecuada segregación de los bivalentes (Koehler y cols, 1996). Por tanto, es importante mencionar que la formación de al menos un quiasma obligatorio resulta

imprescindible para una correcta segregación, sobre todo en aquellos bivalentes como los cromosomas sexuales y los cromosomas acrocéntricos del grupo G. Estos cromosomas tienen la capacidad de formar sólo un quiasma, en el caso del par XY, por lo limitado de su región homóloga (PAR1) y en el caso de los cromosomas acrocéntricos por su tamaño pequeño.

El estudio del comportamiento de los cromosomas sexuales durante la meiosis masculina resulta relevante para tratar de establecer su participación en la generación de productos 45,X. La frecuencia de no-disyunción de los cromosomas X y Y durante la meiosis masculina ha sido estudiada utilizando FISH para un análisis directo en los espermatozoides. Estos trabajos han demostrado que los errores ocurren principalmente durante la primera división meiótica, encontrándose células hiperhaploides (24,XY) con frecuencias que van de 0.08 a 0.34% (Chevret y cols, 1995; Griffin y cols, 1995; Martin y cols, 1995; Spriggs y cols, 1996). De acuerdo con lo ya mencionado, el apareamiento o asociación XY en diacinesis representa el punto de recombinación obligatoria que tiene como función establecer una correcta segregación, si éste no se encuentra presente los cromosomas sexuales migran de manera independiente resultando en gametos aneuploides. Sin embargo, si se considera el porcentaje de aneuploidía XY obtenido por FISH en el análisis de espermatozoides, 0.08 a 0.34% (Chevret y cols, 1995; Griffin y cols, 1995; Martin y cols, 1995; Spriggs y cols, 1996; Sartorelli y cols, 2001) y se compara con los resultados obtenidos en los estudios de diacinesis en las muestras de testículo adulto, 4% a 14%, (Speed y cols, 1993; Gálvez-Galicia, 2002) se observa que la frecuencia de no-disyunción determinada por FISH en los espermatozoides es mucho menor que la frecuencia de no asociación X-Y encontrada en los estudios realizados en diacinesis. El porcentaje obtenido de no asociación XY en espermatozoides parecería no verse reflejado en la producción de espermatozoides aneuploides maduros. Esto puede ser explicado con base en los estudios de Blanco y cols (2001) que demuestran que en células germinales con aneuploidías para los cromosomas sexuales, 47,XXY ó 46,XY/47,XXY, la presencia de puntos de control a niveles premeióticos, de espermatozoides primarios, secundarios o espermátidas, posiblemente arresten a las células anormales originando una eliminación continua de éstas en la línea germinal a lo largo de la espermatogénesis, reduciendo significativamente la cantidad de gametos aneuploides para los cromosomas sexuales.

El efecto de la edad paterna en la no disyunción del par XY ha resultado controvertido, existiendo trabajos que apoyan este efecto estudiando individuos con 47,XXY de origen paterno (Lorda-Sánchez y cols, 1992b) o la frecuencia de espermatozoides XY mediante FISH (Griffin y cols, 1995; Guttenbach y cols, 2000; Lowe y cols, 2001; Sartorelli y cols, 2001). Sin embargo otros no encuentran dicho efecto en el síndrome de Klinefelter de origen paterno (Jacobs y cols, 1988; Thomas y cols, 2000) o estudiando espermatozoides (Martín y cols, 1995; Robins y cols, 1995). En un trabajo realizado por Shi y cols. (2002) se demostró que no existe un efecto de edad en la tasa de recombinación meiótica entre los cromosomas X y Y humanos. Aún cuando se ha señalado que ~75% de los espermatozoides 24,XY provienen de meiosis I en las que no hubo recombinación entre los cromosomas sexuales (Shi y cols, 2001) y que > 80% de los productos 47,XXY son el resultado de una falla en la recombinación de los cromosomas sexuales (Hassold y cols, 1991; Thomas y cols, 2000), en ambos casos no es posible discriminar si la no disyunción aquismática fue el resultado de una falla en el apareamiento de los cromosomas sexuales o de un apareamiento normal en ausencia de recombinación, siendo esta última más probable si consideramos el arresto meiótico ante la incapacidad para aparear. En el resto de los productos Klinefelter y espermatozoides XY en donde hay cromosomas normoquiasmáticos y no disyunción estarían implicados otros mecanismos en la falla en la segregación, postulándose que podría ser un evento de recombinación doble o múltiple o muy cercana a los telómeros, aunque por otra parte el evento de recombinación aunque indispensable, no es suficiente para asegurar una segregación correcta del par sexual (Shi y cols, 2002). Este efecto resulta aún más difícil de evaluar en las pacientes 45, X que carecen de un cromosoma paterno, en donde no es posible medir la recombinación meiótica y tampoco la edad paterna parece ser un factor etiológico importante en el origen de los individuos 45,X (Jacobs y cols, 1997). Los datos encontrados respecto a la edad de los padres de las 10 pacientes 45,X estudiadas parecen confirmar esta hipótesis (Tabla 10). Sin embargo estudios realizados mediante FISH en espermatozoides de padres de pacientes 45,X han revelado una mayor incidencia, que en sujetos control, de aneuploidía XY y de los cromosomas acrocéntricos, comparable a la encontrada en padres de niños con síndrome de Down de origen paterno. Esto es derivado probablemente de una mayor susceptibilidad a los errores meióticos en estos individuos, más que un evento dependiente de la edad (Martínez-Passarell y cols, 1999b; Soares y cols, 2001a y b).

Por otra parte, en los casos estudiados con anomalías estructurales del cromosoma X en esta serie, las edades parentales fueron ligeramente mayores que el promedio de edad para los padres de las pacientes 45,X; 34.4 vs 29.7 para los padres y 32.8 vs 28.7 años para las madres (Tablas 10 y 11). Asimismo si comparamos la edad promedio de las madres para los cromosomas estructuralmente anormales de origen materno, casos 14, 19 y 21 con los de origen paterno, casos 14 y 18, también se observa un incremento, 35.7 vs 28.5 años. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura donde se encontró una edad materna significativamente mayor para los isocromosomas de origen materno ( $31.2 \pm 7.5$ ) versus los derivados paternos ( $24.2 \pm 3$ ) (Lorda-Sánchez y cols, 1991). Sin embargo, para los derivados de origen paterno no se observa este efecto, 33 vs 35.3 años.

La identificación de cromosomas sexuales marcadores es de suma importancia para el diagnóstico clínico y manejo de las pacientes con fenotipo Turner y cariotipos mosaico. Esto generalmente es difícil mediante el uso de técnicas citogenéticas convencionales, e incluso en ocasiones resulta imposible determinar su origen (X o Y) y localizar de manera precisa los puntos de ruptura en los cromosomas estructuralmente anormales. La técnica de PCR para identificar la presencia o ausencia de secuencias específicas del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner con o sin cromosomas marcadores ha sido ampliamente utilizada, mostrando frecuencias que van de 0 a 61% dependiendo de los métodos empleados y la selección de las pacientes (Gicquel y cols, 1992; Larsen y cols, 1995; Shankman y cols, 1995; López y cols, 1998; Nishi y cols, 2002). Sin embargo aún cuando esta metodología permite la detección de mosaicos crípticos para el cromosoma Y con una gran sensibilidad, no provee información acerca del cromosoma Y presente. Para corroborar su origen cromosómico y caracterizar adecuadamente la estructura de marcadores derivados de cromosomas sexuales se han usado diferentes metodologías como: técnicas de FISH (Callen y cols, 1992; Plattner y cols, 1993; Schwartz y cols, 1997), FISH-centromérico multicolor (Nietzel y cols, 2001), PRINS (Velagaleti y cols, 1997) o combinaciones de FISH y amplificación de secuencias específicas por PCR (Jacobs y cols, 1997; Fernández y cols, 1996; 2000; Quilter y cols, 1998; Robinson y cols, 1999; Grass y cols, 2000).

En el presente trabajo, usando una combinación de técnicas citogenéticas y moleculares fue posible establecer inequívocamente el origen, X o Y, y caracterizar a los cromosomas estructuralmente anormales presentes en las 11 pacientes con cariotipos mosaico (Casos 11 - 21). La amplificación por PCR de secuencias centroméricas del cromosoma Y solo resultó positiva en 2 de las pacientes con un segundo cromosoma sexual (Casos 11 y 12) (Figura 5), en cambio ninguna de las otras 9 con cromosomas sexuales anormales tenía una segunda línea celular con cromosoma Y. Los 6 anillos de los casos 15 a 20 resultaron derivados del X (Casos 15-20). Para las restantes con isocromosomas de brazo largo del X (casos 13 y 14) y una delección en Xq (caso 21), el análisis molecular ayudó a definir su estructura y determinar de manera precisa los puntos de ruptura.

Los datos obtenidos del análisis citogenético molecular y de las amplificaciones por PCR (Figuras 5-7, Tabla 9) sugirieron la presencia de un cromosoma pseudodicéntrico en la paciente 11. La presencia de *PABY* indica que el punto de ruptura se encuentra por arriba de este *locus* dentro del segmento pseudoautosómico. Estos datos nos permiten proponer que este cromosoma pudo haberse originado durante la meiosis paterna, probablemente debido a un evento de recombinación anormal entre las regiones pseudoautosómicas de ambas cromátidas hermanas del cromosoma Y (Figura 11), tal como ha sido postulado para otros derivados del cromosoma Y, incluyendo algunas translocaciones XY (Savary y cols, 1992; Shankman y cols, 1995; Grass y cols, 2000). De acuerdo con esto, el cariotipo final de la paciente sería: 45,X[27]/46,X,psu dic(Y)(Yqter→Yp11.3::Yp11.3→Yqter)[73].ish psu dic(Y)(DYZ1++, DYZ3+ +). En la paciente 12, el cromosoma derivado del Y contiene todas las secuencias analizadas (Figuras 5-7, Tabla 9) con únicamente una disminución de la región heterocromática.

En los dos casos con un cromosoma marcador derivado del Y, el fenotipo fue femenino con estigmas de Turner a pesar de la presencia de *SRY*, incluso en doble dosis en el cromosoma Y pseudodicéntrico. Se ha propuesto que la distribución tisular y diferencias en la proporción de las líneas 45,X versus la línea con cromosoma Y son las responsables de la variación en el fenotipo de los individuos con cariotipo 45,X/46,XY *SRY* positivos con respecto al desarrollo testicular (Petrusevska y cols, 1996; Reddy y cols, 1996; Méndez y cols, 1999; Udler y cols, 2001). Por otra parte, la conexión funcional establecida entre las células germinales y las células de soporte en relación con la actividad del cromosoma Y, puede estar relacionada con el

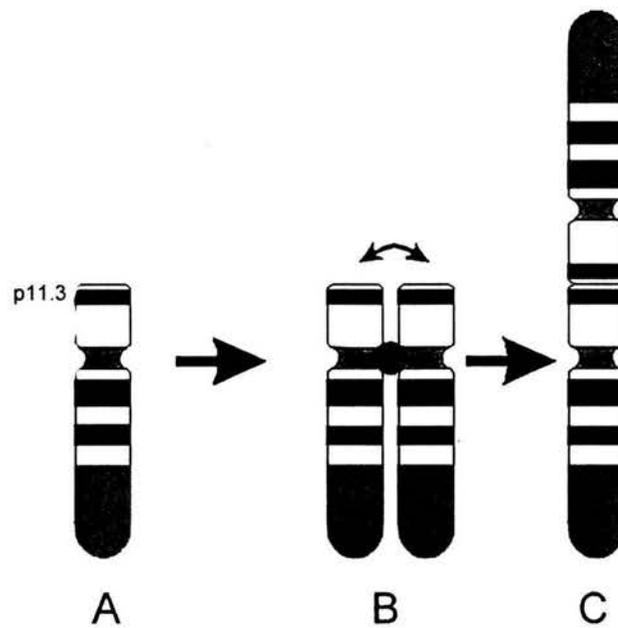


Figura 11. Posible mecanismo de formación del cromosoma Y pseudodicéntrico. **A.** Idiograma bandas G del cromosoma Y **B.** Intercambio entre las cromátidas hermanas del cromosoma Y y fusión en Yp11.3 durante la meiosis I paterna. **C.** Cromosoma Y pseudodicéntrico resultante del intercambio anormal.

desarrollo testicular que alcanzan los individuos en edad adulta. De acuerdo a lo reportado por Speed y cols (1993), las células de Sertoli presentan una alta condensación del cromosoma Y en individuos recién nacidos, mientras que en los individuos adultos se encuentra descondensado, dándose el cambio en el estado de condensación al iniciarse la espermatogénesis durante la pubertad (Chandley y Speed, 1995). De esta forma, el control sobre algunos eventos de la espermatogénesis quizá no sea autónomo de las células germinales, sino que puede emanar de las células de Sertoli que forran las paredes de los túbulos y que muestran una cercana interdependencia con las células germinales. Trabajos recientes han documentado un intercambio de señales entre las células germinales y las células de Sertoli necesario para el desarrollo y funcionamiento correcto de ambos tipos celulares en el testículo (Foresta y cols, 1998; Kleiman y cols, 2001; Eddy, 2002; Shinohara y cols, 2003). Estos datos explicarían por qué en algunos individuos mosaico 45,X/46,XY con desarrollo testicular, las gónadas se vuelven disgenéticas por la ausencia de genes del cromosoma Y necesarios para la espermatogénesis, ya sea en las células germinales o en las de Sertoli.

Estos datos podrían explicar el fenotipo femenino con estigmas de Turner de las pacientes 11 y 12. La paciente 11 fue sometida a cirugía durante la infancia, debido a la presencia de una hernia inguinal congénita, encontrándose un testículo disgenético y una estría gonadal contralateral. A la paciente 12 se le sugirió una cirugía electiva para remover el tejido gonadal debido al elevado riesgo de gonadoblastoma en las pacientes Turner con gónadas disgenéticas y secuencias del cromosoma Y (Page, 1994, Salo y cols, 1995; Gravholt, 2000). Recientemente, se ha sugerido que este gen pudiera ser *TSPY*, cuya expresión ha sido demostrada en tejido testicular y derivado de gonadoblastomas, pero no en estrías gonadales (Tsuchiya y cols, 1995; Hildebrand y cols, 1999). Apoyando la teoría de que los genes en el cromosoma Y que ejercen un efecto benéfico para el sexo masculino pueden resultar deletéreos para el sexo femenino, se ha sugerido que este gen está implicado en la espermatogénesis y que su expresión en tejido gonadal disgenético sería responsable de la proliferación celular anormal.

Las anomalías estructurales del cromosoma X parecen ocurrir en proporciones iguales en ambos progenitores (Lorda- Sánchez y cols, 1991; Chu y cols, 1994; Collins, y cols, 1994; Dalton y cols, 1998; Tsezou y cols, 1999). De las 5 pacientes con anomalías estructurales del X estudiadas con marcadores microsatélite, tres presentaban cromosomas derivados de origen

materno y dos de origen paterno (Tabla 11). Algunos reportes señalan que la frecuencia de rupturas cromosómicas en la meiosis paterna es mayor que en la materna, sin embargo, debido a la probabilidad de errores en la recombinación meiótica entre ambos cromosomas X maternos, es posible que las anomalías estructurales del X se originen en igual proporción en ambos sexos (Jacobs y cols, 1997).

Los isocromosomas de Xq pueden ser el resultado de una división anormal del centrómero o de un intercambio de cromátidas hermanas, pero debido a que la mayoría de los isocromosomas son dicéntricos, este último mecanismo parece ser el más probable (Harbison y cols, 1988; Hassold y cols, 1988; Jacobs y cols, 1990; 1997). La existencia de isocromosomas con heterocigocidad para los dos brazos Xq ha sido documentada, sugiriéndose la recombinación meiótica entre homólogos como un mecanismo alternativo para su formación (Lorda-Sánchez y cols, 1991). Por otra parte, la mayoría de los cromosomas X dicéntricos son en realidad pseudodicéntricos, con sólo un centrómero activo (Therman y cols, 1986; Sullivan y Willard, 1998). Es ampliamente conocido que estos cromosomas pueden ser mitóticamente inestables dando lugar a la línea 45,X presente en cerca del 80% de las pacientes con este tipo de anomalía cromosómica (Wolff y cols, 1996; Dalton y cols, 1998). En el caso 13, el isocromosoma fue de origen paterno, y por análisis citogenético convencional es aparentemente monocéntrico, dato que podría ser confirmado por el hecho de que la paciente no presenta el alelo paterno para DXS991 localizado en Xp11.1. Este cromosoma debió originarse por una división transversal del centrómero o por un evento de recombinación entre las cromátidas hermanas, muy cercano a la región de heterocromatina constitutiva lo que permitió la fusión de los centrómeros. Es probable que esto haya ocurrido durante la espermatogénesis o en la primera división del cigoto debido a la ausencia de una línea celular con complemento cromosómico normal.

En la paciente 14, con un cromosoma X pseudodicéntrico de origen materno, se encontró únicamente un alelo materno en DXS991, pero debido a que DXS993 resultó ser un marcador no informativo es difícil determinar si la paciente es homocigota para DXS993 o si el alelo materno se perdió durante la formación del dicéntrico (Tabla 11, Figura 9). El análisis de la segregación de los marcadores microsatélites en los familiares de la paciente permitió definir un evento de recombinación en DXS991 que probablemente coincida con el punto de ruptura para el rearreglo que generó el cromosoma pseudodicéntrico. Sin embargo, debido a que la paciente

presenta un solo alelo materno de los marcadores utilizados, resulta improbable que el dicéntrico se haya originado por un evento de recombinación entre los homólogos durante la meiosis I, que hubiera generado un cromosoma heterocigoto para los marcadores maternos. Alternativamente, el punto de ruptura podría estar por arriba de DXS991 o aún por encima de DXS993. Como se muestra en la figura 12, dada la ausencia de una línea 46,XX en la paciente, es probable que este cromosoma anormal se haya originado en la primera división postcigótica por un intercambio entre las cromátidas hermanas del X materno con la pérdida posterior del cromosoma dicéntrico inestable en algunas células. Sin embargo, no es posible descartar que el rearrreglo se haya producido de igual forma pero durante la meiosis II, es decir que el cigoto fuera originalmente  $46,X,idic(Xq)^M$ .

Generalmente se considera que los cromosomas en anillo se forman a partir de rupturas cromosómicas que ocurren a cada lado del centrómero con la subsecuente reunión de los extremos proximales y pérdida de los fragmentos distales. Aproximadamente 6- 11% de las pacientes Turner tienen una línea celular con uno o más cromosomas en anillo (Schmid y cols, 1974; de Almeida y cols, 1985; Jacobs y cols, 1990; 1997), siendo la mayoría derivados del cromosoma X (Crolla y Llerena, 1988; Jacobs y cols, 1997). Generalmente los anillos grandes del cromosoma X que incluyen al gen *XIST* no se asocian con un fenotipo severo, aunque se han descrito pacientes con un IQ bajo (Collins y cols, 1994) o incluso algunas con retraso mental (Matsuo y cols, 2000a). En contraste, las pacientes con  $r(X)$  muy pequeños que carecen de *XIST* generalmente tienen un fenotipo más severo que incluye retraso mental, dismorfismo facial y anomalías congénitas, no característicos del síndrome de Turner (Lindgren y cols, 1992; Van Dyke y cols, 1992; Migeon y cols, 1994; Wolff y cols, 1994; McGinniss y cols, 1997). Esto último no parece ocurrir siempre, recientemente se reportaron dos pacientes con retraso mental y cromosomas X en anillo que incluían al *locus XIST* activo (Migeon y cols, 2000). En contraste, se han descrito individuos con un fenotipo no severo y  $r(X)$  que carecen de este gen (Yorifuji y cols, 1998; Turner y cols, 2000a). Las 6 pacientes con anillos del cromosoma X estudiadas (casos 15-20) acudieron a consulta por presentar datos clásicos de síndrome de Turner y todas, incluyendo las que tienen anillos muy pequeños (casos 15-18), tienen una inteligencia normal. Cabe señalar que la paciente 18 presenta un IQ limítrofe y en la 19 se refiere hiperquinesia. En estas pacientes, la ausencia de secuencias centrómicas del cromosoma Y permitió inferir que sus cromosomas en anillo eran derivados del cromosoma X, hecho que fue confirmado mediante el

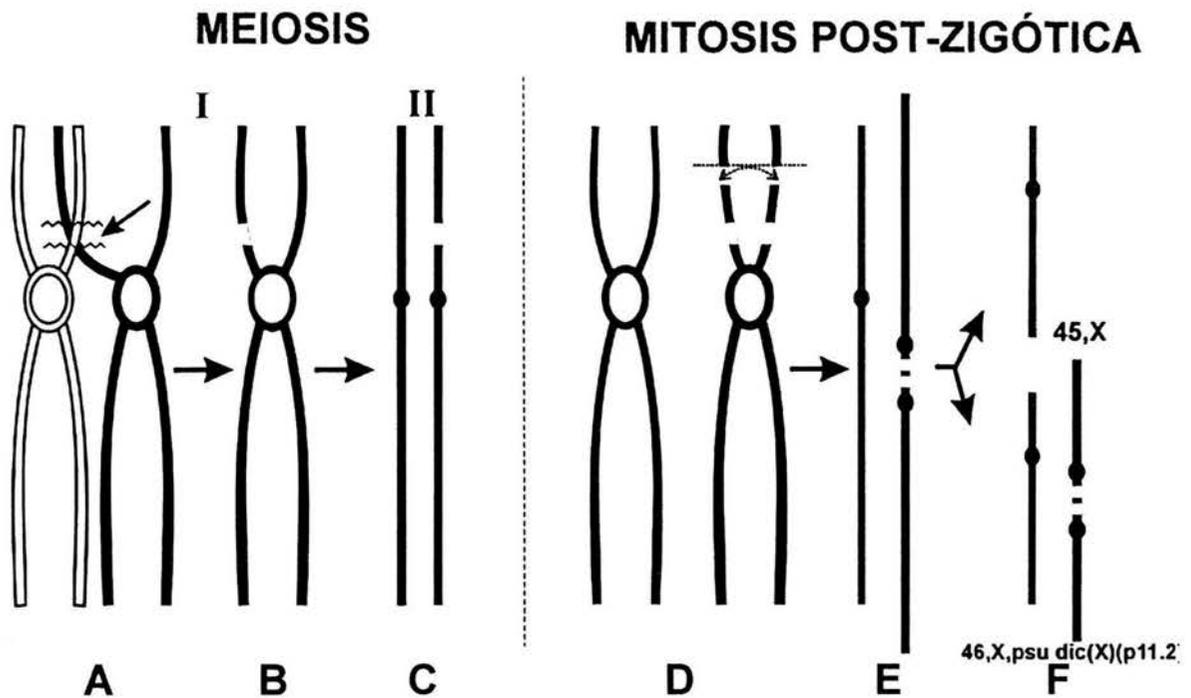


Figura 12. Posible origen del cromosoma X pseudodicéntrico. A. Recombinación intersticial entre los cromosomas X durante la meiosis I materna. B y C. Resultados de las meiosis I y II maternas respectivamente, con una pequeña región recombinada en Xp. D. Cromosomas X, paterno (gris) y materno (negro), durante la primera división post-zigótica en la propósita; con un intercambio entre las cromátidas hermanas del cromosoma materno con fusión de brazos cortos y pérdida de los segmentos terminales. E. Línea celular con el cromosoma X paterno y el cromosoma X dicéntrico materno. F. Resultado final de divisiones post-zigóticas con la pérdida del cromosoma dicéntrico inestable generando la línea 45,X e inactivación de un centrómero para estabilizar el pseudodicéntrico en la línea con 46 cromosomas.

análisis citogenético molecular realizado con PRINS y FISH para identificar secuencias centroméricas del cromosoma X (Figura 7, Tabla 9). En los casos 19 y 20, con anillos grandes, los puntos de ruptura pudieron ser inferidos a partir de las técnicas de bandeado convencionales. Sin embargo, para poder delimitar los puntos de ruptura en los anillos pequeños era necesario el análisis molecular con marcadores del cromosoma X. Esto sólo fue posible para las pacientes 18 y 19, la primera con un anillo pequeño y la segunda con el anillo de mayor tamaño.

La presencia de un fenotipo menos severo en las pacientes con los anillos grandes del X, casos 19 y 20, probablemente sea consecuencia de la inactivación preferencial de los cromosomas anormales. Los puntos de ruptura del anillo del caso 19 coinciden con los reportados en un caso familiar, madre e hija, con retraso mental probablemente debido a un patrón de inactivación al azar (Matsuo y cols, 2000a). En contra de lo esperado, ninguna de las pacientes estudiadas con anillos pequeños, casos 15-18, presentó un fenotipo severo, lamentablemente en estas pacientes no fue posible determinar el estado de inactivación de los anillos o si contenían al gen *XIST*, sin embargo el fenotipo observado en ellas, tal como ha sido propuesto por otros autores (Yorifuji y cols, 1998; Migeon y cols, 1996; 2000; Turner y cols, 2000a; Matsuo y cols, 2000b; Wolff y cols, 2000) puede ser el resultado de:

- inactivación preferencial del cromosoma X en anillo
- ausencia de secuencias del cromosoma X que cuando se encuentran en disomía funcional resultan en un fenotipo severo
- distribución diferencial del mosaicismo resultando en la ausencia de la línea con el anillo en tejidos importantes para el desarrollo del fenotipo severo (cerebro)
- presencia de un cromosoma X inactivo en algunos tejidos en tiempos críticos
- ausencia de disomía uniparental, debido a que esta última impide la cuenta y selección de los cromosomas X a inactivarse.

En las pacientes con cromosomas en anillo en que se realizó el estudio con marcadores polimórficos del X (casos 18 y 19) fue posible confirmar el origen parental de los cromosomas anormales, siendo paterno y materno, respectivamente. Ninguna paciente presenta disomía uniparental del X. En el caso 18, el único marcador paterno presente en la paciente fue DXS991 localizado en Xp11.1, debido a que DXS993 en Xp11.3 fue no informativo no sabemos si el punto de ruptura está por arriba de este último o entre ambos marcadores (Tabla 11). Debido a

que no fue posible emplear marcadores pericentroméricos de Xq no se pudo confirmar el punto de ruptura en el brazo largo, el cual suponemos debe estar por arriba de DXS186 ya que esta paciente no muestra un fenotipo severo. Es probable que el punto de ruptura esté en Xq13, lo que implicaría la presencia del gen *XIST* activo que resultaría en el apagado de los genes presentes en él, lo que evitaría una disomía funcional de una cantidad relativamente grande de eucromatina del cromosoma X(p11.3-21q13?)(Yorifuji, y cols, 1998; Turner, y cols, 2000a).

Los puntos de ruptura observados citogenéticamente en la paciente 19 pudieron corroborarse con el análisis molecular, con un punto de ruptura en brazo corto entre DXS8051 y DXS987, lo que indica la pérdida de la PAR1 y de algunos genes con patrón de expresión bialélico y el otro por debajo del último marcador utilizado DXS1073 localizado en Xq28, probablemente con pérdida de la PAR2. Desafortunadamente, en esta paciente no se estudiaron otros familiares para poder analizar el mecanismo de formación del anillo derivado del X materno. En esta niña sería relevante conocer la proporción del mosaico en la gónada para predecir su fertilidad, debido a que su anillo conserva las regiones cromosómicas implicadas en la función ovárica, además de permitir la recombinación meiótica y segregación tal como se observa en casos familiares con anillos grandes del X (Blumenthal y Allanson, 1997; Uehara y cols, 1997; Matsuo y cols, 2000a; Birkebaek y cols, 2002).

En el caso 21, con una deleción en Xq23 observada citogenéticamente, el análisis con marcadores moleculares del cromosoma X demostró la presencia de un sólo alelo de DXS1106 en Xq22 indicando homocigocidad para este polimorfismo (Tabla 11, Figura 10). Los datos obtenidos sugieren un evento de recombinación en DXS1106, por lo que el punto de ruptura estaría entre este marcador y DXS8055 en Xq23, permitiendo sugerir que el cromosoma X anormal probablemente se originó durante un evento de recombinación en la meiosis materna, aunque no puede ser excluido un evento postcigótico temprano (Figura 13).

En general, en las pacientes con anomalías estructurales de los cromosomas sexuales estudiadas no fue posible establecer una correlación fenotipo-cariotipo debido a que la naturaleza altamente variable del mosaicismo con el cromosoma sexual marcador puede exhibir datos no predecibles tanto en términos de anomalías de la diferenciación sexual como con respecto a los datos neurocognitivos. Sin embargo, podemos decir que la paciente 12, con una segunda línea

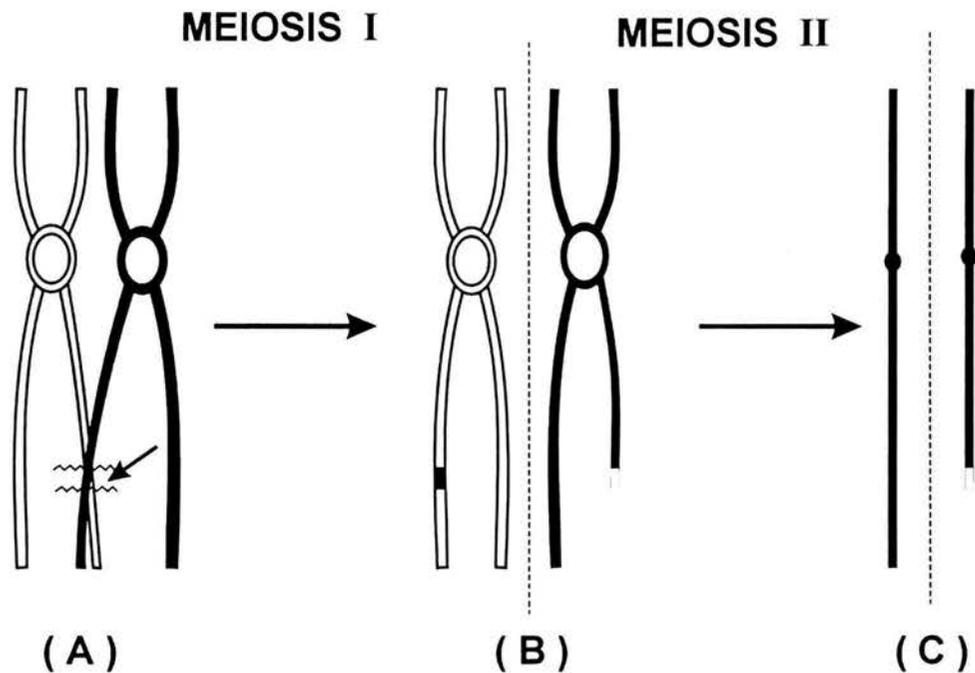


Figura 13. Posible origen del derivado del cromosoma X de la paciente 21. **A.** Recombinación meiótica entre los cromosomas X maternos resultando en la ruptura y pérdida de un segmento cromosómico terminal. **B.** Los cromosomas X maternos después de la primera división meiótica mostrando la delección Xq en una cromátida, y **C.** Los cromosomas X de la segunda división meiótica materna, incluyendo el cromosoma con la delección de Xq

celular con cromosoma Y y las paciente con isocromosomas del X presentan una talla mayor (>1.40m) que las 45,X (1.36m promedio) en las que han pasado la edad de la pubertad o las que muestran anillos del X (1.34m). Contrariamente a lo esperado la paciente 11, con el pseudodicéntrico del cromosoma Y, no muestra una talla mayor (1.29m), lo que podría deberse a la pérdida de la copia del gen *SHOX* del cromosoma Y o a un efecto mayor de la línea 45,X. Asimismo, lo contrario podría observarse en la paciente 10 que presenta cariotipo 45,X y mide 1.46m.

La mayoría de las pacientes Turner tienen disgenesia gonadal, por lo que usualmente son infértiles y sólo en raras ocasiones muestran menarca espontánea seguida de una menopausia temprana. Adicionalmente, únicamente 2% de las pacientes con síndrome de Turner pueden embarazarse de forma natural, aunque tienen una tasa elevada de abortos, mortinatos o recién nacidos malformados (Abir y cols, 2001). Por lo general, las pacientes Turner con función ovárica son mosaicos con un complemento cromosómico XX o XXX en sus células germinales. La presencia de pacientes fértiles con cromosomas X en anillo grandes y de algunas con deleciones terminales de Xp o deleciones en Xq, pero no de pacientes en que falta el brazo corto del cromosoma X, incluyendo a los isocromosomas de Xq, apoyan la propuesta de que la disgenesia gonadal sea el resultado de la haploinsuficiencia de genes localizados en Xp11.2-p22.1 (Zinn y cols, 1998) y/o en Xq13-26 (Madan, 1983; Therman y cols, 1990) o en Xq26-27 (Tharapel y cols, 1993, Dalton y cols, 1998) más que de la incapacidad para la recombinación meiótica por la presencia de un solo cromosoma X o de cromosomas estructuralmente anormales. Esto último podría ser apoyado por los estudios meióticos en ratonas 45,X y en ovocitos fetales humanos, en donde se ha demostrado que la presencia de cromosomas univalentes no es suficiente para detener la meiosis (Hunt y cols, 1995; Hodges y cols, 2001; Tease y cols, 2002) o por la infertilidad de las pacientes con i(Xq), en quienes la recombinación debería ser posible y sin embargo, sólo son fértiles cuando tienen una línea XX (James, 1997b). De acuerdo a esto, de nuestras pacientes estudiadas, sólo la paciente 19, como ya se mencionó podría ser fértil, mientras que en el resto de ellas con aberraciones estructurales del X habría haploinsuficiencia de los genes para la conservación de la función ovárica en Xp, isocromosomas y anillos, y/o de los localizados en Xq, anillos y del Xq. Por otra parte, aunque en las pacientes 45,X se ha descartado la presencia de una segunda línea celular XX o XXX en sangre periférica, una línea podría estar

presente en tejido gonadal en las pacientes pediátricas, no así en las pospúberes ya que todas ellas presentan amenorrea primaria.

El uso combinado de técnicas como PCR para secuencias específicas del cromosoma Y, el análisis de marcadores microsatélite del cromosoma X y métodos de citogenética molecular como PRINS y FISH permite una mejor identificación y caracterización del cariotipo presente en las pacientes con síndrome de Turner que el empleo de técnicas convencionales o métodos aislados de biología molecular. El análisis por PCR provee un método eficiente y altamente sensible para detectar mosaicismo con cromosoma Y en muy bajas proporciones en las pacientes Turner y para indicar cuando los cromosomas marcadores tienen su origen en el cromosoma Y. Sin embargo, deben emplearse adicionalmente métodos de citogenética molecular, tales como FISH o PRINS para poder caracterizar la estructura de los cromosomas marcadores. Esta situación es particularmente relevante para el asesoramiento genético, especialmente cuando dichos marcadores son encontrados durante el diagnóstico prenatal. En este trabajo, fue posible comprobar que la técnica de PRINS es simple, rápida, altamente específica y accesible y que constituye una mejor alternativa que el FISH cuando se utilizan secuencias de DNA alfa satélite para caracterizar cromosomas sexuales estructuralmente anormales, debido a que requiere de menor tiempo y puede ser un método semi-automatizado que utiliza un mínimo de reactivos.

Por otra parte, el análisis con marcadores microsatélite del cromosoma X permite excluir mosaicismo críptico para el cromosoma X en las pacientes 45,X, así como también determinar el origen parental de los cromosomas sexuales en las pacientes Turner, datos que resultan de gran relevancia para tratar de establecer los mecanismos responsables del cariotipo presente en ellas. Sin embargo, aún con los datos obtenidos en este y otros trabajos reportados en la literatura, resulta difícil confirmar si la mayoría de las pacientes con cariotipo 45,X son en realidad mosaicos derivados de un cigoto con 46 cromosomas. Uematsu y cols (2002) parecen apoyar esta suposición basándose en el origen materno del cromosoma X normal presente en la mayoría de las pacientes Turner en que se ha investigado el origen parental de los cromosomas sexuales presentes (Tabla 12). Estos investigadores proponen que los cigotos originales portan un cromosoma sexual paterno estructuralmente anormal, producto de una mayor susceptibilidad a la ocurrencia de rupturas cromosómicas y recombinación anormal durante la espermatogénesis (Uematsu y cols, 2002). En este estudio, los datos encontrados podrían apoyar esta propuesta; si

consideramos que en 9 de las 10 pacientes 45,X falta el cromosoma paterno, hay dos pacientes con anomalías del cromosoma Y y dos que tienen derivados anormales del X paterno, resultaría que en 13 de las 17 pacientes en que se determinó el origen parental hay un problema derivado del cromosoma sexual paterno. Esta propuesta puede ser apoyada por los datos encontrados por Bean y cols, 2001 que señalan que las primeras divisiones del cigoto en los mamíferos son propensas a una no disyunción, lo que también ayudaría a explicar la alta incidencia de mosaicismo observada al estudiar productos de preimplantación obtenidos por fertilización *in vitro* (Bean y cols, 2001). Sin embargo, resulta imposible descartar la presencia de nulisomía de los cromosomas sexuales en el gameto paterno como causa de los productos 45,X; ya que como se mencionó, el par XY presenta una susceptibilidad relativamente elevada a la no disyunción durante la primera división meiótica masculina.

## CONCLUSIONES

- La ausencia de secuencias centroméricas del cromosoma Y y la falta de heterocigosidad para los 5 marcadores microsatélites informativos del cromosoma X descartó la existencia de mosaicismo críptico con un cromosoma Y o X normal o anormal en las pacientes 45,X.
- En 90% de las pacientes 45,X el cromosoma X presente fue el materno, faltando el cromosoma sexual paterno.
- No se observa efecto de edad paterna en las pacientes 45,X
- La amplificación por PCR de secuencias centroméricas del cromosoma Y permitió inferir el origen de los cromosomas sexuales anormales en las 11 pacientes con cariotipo mosaico.
- La estructura de los dos cromosomas derivados del cromosoma Y (casos 11 y 12) pudo ser confirmada mediante amplificación por PCR de secuencias específicas del cromosoma Y (PABY, *SRY*, *ZFY* y Yqh) y el uso de técnicas de citogenética molecular.
- Dado el punto de ruptura por arriba de PABY en Yp11.3 en el cromosoma Y pseudodicéntrico (caso 11), es probable que sea producto de un evento de recombinación en la PAR1 entre las cromátidas hermanas del cromosoma Y durante la meiosis paterna.
- En el caso del cromosoma X pseudodicéntrico (caso 14) y de los cromosomas en anillo (casos 15-20) la aplicación de PRINS y FISH para centrómero de X confirmó la presencia de dos centrómeros en el primer caso y el origen como derivados del cromosoma X en los 6 anillos.
- El uso de marcadores microsatélite informativos permitió determinar el origen parental de los cromosomas X, y corroborar los puntos de ruptura en los X anormales de las 5 pacientes mosaico analizadas (casos 13, 14, 18, 19 y 21).

- El origen parental de los cromosomas X anormales fue materno en el caso del pseudodicéntrico (caso 14), el anillo grande (caso 19) y la deleción de Xq (caso 21); mientras que el isocromosoma (caso 13) y el anillo pequeño (caso 18) derivan del cromosoma paterno.
- La edad de los padres fue ligeramente mayor en los casos con cromosomas X anormales estudiados con microsatélites que en las pacientes 45,X.
- El análisis de los haplotipos en las familias de los 2 casos estudiados con cromosomas X anormales maternos, sugiere que el cromosoma pseudodicéntrico se originó durante la primera división pos-cigótica, mientras que la deleción en Xq probablemente fue resultado de un evento de recombinación durante la meiosis materna.
- La correlación fenotipo- cariotipo, tanto en lo que se refiere a las características clínicas como con respecto al desarrollo gonadal, resulta difícil de establecer en las pacientes mosaico debido a las diferentes proporciones y distribución de la línea 45,X.
- El uso combinado de diferentes métodos moleculares apoyados con la citogenética convencional resulta de gran utilidad para determinar el origen y estructura de los cromosomas sexuales presentes en las pacientes con fenotipo Turner.
- La mayoría de los casos de síndromes de Turner son debidos a un error en los cromosomas sexuales del padre ya sea por un error durante la primera división meiótica o bien debido a su pérdida durante las primeras divisiones del cigoto.

## REFERENCIAS:

- Aargard L, Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersouger A, Singh PB, et al. 1999. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins that interact with the heterochromatin component M31. *EMBO J* 18: 1923-38
- Abir R, Fisch B, Nahum R, Orvieto R, Nitke S, Ben Rafael Z. 2001. Turner's syndrome and fertility: current status and possible putative prospects. *Hum Reprod Update* 7: 603-13
- Alvesalo L. 1997. Sex chromosomes and human growth. A dental approach. *Hum Genet* 101: 1-5
- Angell R. 1997. First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet* 61: 23-32
- Armstrong SJ, Kirkham AJ, Hultén MA. 1994. XY chromosome behavior in the germline of the human male: a FISH analysis of spatial orientation, chromatin condensation and pairing. *Chromosome Res* 2: 445-52
- Armstrong SJ, Hultén MA, Keohane AM, Turner BM. 1997. Different strategies of X-inactivation in germinal and somatic cells: histone H4 underacetylation does not mark the inactive X chromosome in the mouse male germline. *Exp Cell Res* 230: 399-402
- Avner P, Heard E. 2001. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2: 59-67
- Ayoub N, Richler C, Wahrman J. 1997. *Xist* RNA is associated with the transcriptionally inactive XY body in mammalian male meiosis. *Chromosoma* 106: 1-10
- Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Roest HP, Ooms M, Vreeburg J, Hoeijmakers JH, Grootegoed JA. 1999. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev Biol* 207: 322-33
- Bachtrog D, Charlesworth B. 2001. Towards a complete sequence of the human Y chromosome. *Genome Biology* 2: reviews 1016.1-.5 <http://genomebiology.com/2001/2/5/reviews/1016>
- Bailey WA, Zwingman TA, Reznick VA, Griswold WR, Mendoza SA, Jones KL, Freidenberg GR. 1992. End-stage renal disease and primary hypogonadism associated with a 46,XX karyotype. *AJDC* 146: 1218-23
- Barboux S, Vilain E, Raoul O, Gilgenkrantz S, Jeandidier E, Chadenas D, Souleyreau N, Fellous M, McElreavey K. 1995. Proximal deletions of the long arm of the Y chromosome suggest a critical region associated with a specific subset of characteristic Turner stigmata. *Hum Mol Genet* 4: 1565-8
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S. 2000. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6: 989-98
- Bean CJ, Hunt PA, Millie EA, Hassold TJ. 2002. Analysis of a malsegregating Y chromosome: evidence that the earliest cleavage divisions of the mammalian embryo are non-disjunction-prone. *Hum Mol Genet* 10: 963-72
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G. 2001. Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic. *Science* 291:447-50
- Bergere M, Wainer R, Nataf V, Bailly M, Gombault M, Ville Y, Selva J. 2002. Biopsied testis cells of four 47, XXY: fluorescence in-situ hybridization and ICSI results. *Hum Reprod* 17: 32-7

- Bernardino J, Lombard M, Niveleau A, Dutrillaux B. 2000. Common methylation characteristics of sex chromosomes in somatic and germ cells from mouse, lemur and human. *Chromosome Res* 8: 513-25
- Birkebaek NH, Cruger D, Hansen J, Nielsen J, Bruun-Peterson G. 2002. Fertility and pregnancy outcome in Danish women with Turner syndrome. *Clin Genet* 61: 35-9
- Bishop DK. 2001. Meiotic recombination pathways. *Encyclopedia of life sciences*. Nature publishing group. www.els.net
- Blanco J, Rubio C, Simon C, Egozcue J, Vidal F. 1997. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 99: 413-6
- Blanco J, Egozcue J, Vidal F. 2001. Meiotic behavior of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescence *in-situ* hybridization. *Hum Reprod* 16: 887-92.
- Blanco P, Sargent CA, Boucher CA, Mitchell M, Affara NA. 2000a. Conservation of PCDHX in mammals: expression of the human X/Y genes predominantly in brain. *Mamm Genome* 11: 906-14
- Blanco P, Shlumukova M, Sargent CA, Jobling M, Affara N, Hurles ME. 2000b. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. *J Med Genet* 37: 752-8
- Blumenthal AL, Allanson JE. 1997. Turner syndrome in a mother and daughter: r(X) and fertility. *Clin Genet* 52: 187-91
- Boggs BA, Allis CD, Chinault AC. 2000. Immunofluorescent studies of human chromosomes with antibodies against phosphorylated H1 histone. *Chromosoma* 108:485-90
- Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, Allis CD. 2002. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet* 30:73-76
- Boucher CA, Sargent CA, Ogata T, Affara NA. 2001. Breakpoint analysis of Turner Patients with partial Xp deletions: implications for the lymphoedema gene localization. *J Med Genet* 38: 591-8
- Boumil RM, Lee JT. 2001. Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 10: 2225-32
- Brockdorff N. 2002. X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind *Xist* RNA. *Trends Genet* 18: 352-8
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tolorenzi R, Willard H. 1991. A gene from the region of the human X inactivation center is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349: 38-44
- Brown CJ, Willard HF. 1994. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature* 368:154-56
- Brown CJ, Miller AP, Carrel L, Rupert JL, Davies KE, Willard HF. 1995. The DXS423E gene in Xp11.21 escapes X chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 4: 251-5
- Brown CJ, Carrel L, Willard HF. 1997. Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *Am J Hum Genet* 60: 1333-43
- Brown GM, Furlong RA, Sargent CA, Erickson RP, Longepied G, Mitchell M, Jones MH, Hargreave TB, Cooke HJ, Affara NA. 1998. Characterization of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and

mapping to the Sxr<sup>b</sup> interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Hum Mol Genet* 7: 97-107

- Buffone GJ, Darlington GJ. 1985. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 31: 164-5
- Burgoyne PS. 1982. Generic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. *Hum Genet* 61: 85-90
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Sutcliffe MJ, Palmer SJ. 1992. Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal "spermatogenesis" gene mapping to the long arm. *Cell* 71: 391-8
- Callen D, Mulley JC, Baker EG, Sutherland GR. 1987. Determining the origin of human X isochromosomes by use of DNA sequence polymorphisms and detection of an apparent i(Xq) with Xp sequences. *Hum Genet* 77: 236-40
- Callen DF, Eyre HJ, Ringenbergs ML, Freemantle CJ, Woodroffe P, Haan EA. 1991. Chromosomal origin of small ring marker chromosomes in man: characterization by molecular genetics. *Am J Hum Genet* 48: 769-82.
- Callen DF, Eyre H, Yip MY, Freemantle J, Haan EA. 1992. Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. *Am J Med Genet* 43: 709-15.
- Carrel L, Clemson CM, Dunn JM, Miller AP, Hunt PA, Lawrence JB, Willard HF. 1996. X inactivation analysis and DNA methylation studies of the ubiquitin activating enzyme E1 and PCTAIRE-1 genes in human and mouse. *Hum Mol Genet* 5: 391-401
- Carrel L, Cottle AA, Goglin KC, Willard HF. 1999. A first-generation X-inactivation profile of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14440-4
- Cattanach BM, Rasberry C, Burtenshaw MO, Evans EP. 1990. Illegitimate pairing of the X and Y chromosomes in Sxr mice. *Genet Res* 56: 121-8
- Chadwick BP, Willard HF. 2001. Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Hum Mol Genet* 10: 1101-13
- Chadwick BP, Willard HF. 2002. Cell cycle-dependent localization of macroH2A in chromatin of the inactive X chromosome. *J Cell Biol* 157: 1113-23
- Champion MD, Hawley RS. 2003. Playing for half the deck: the molecular biology of meiosis. *Nat Cell Biol (fertility supplement)* s50-6
- Chandley AC, Maclean N, Edmond P, Fletcher J, Watson GS. 1976. Cytogenetics and infertility in man. II. Testicular histology and meiosis. *Ann Hum Genet* 40: 165-76
- Chandley AC, Goetz P, Hargreave TB, Joseph AM, Speed RM. 1984 On the nature and extent of XY pairing at meiotic prophase in man. *Cytogenet Cell Genet* 38: 241-7
- Chandley AC. 1988. Meiosis in man. *Trends Genet* 4:79-84
- Chandley AC. 1991. On the parental origin of the novo mutation in man. *J Med Genet* 28:217-23.
- Chandley AC, Speed RM. 1995. A reassessment of Y chromosomal behaviour in germ cells and Sertoli cells of the mouse revealed by in situ hybridisation. *Chromosoma* 104: 282-6
- Charchar FJ, Svartman M, El-Mogharbel N, Ventura M, Kirby P, Matarazzo MR, Ciccodicola A, Rocchi M, D'Esposito M, Graves JAM. 2003. Complex events in the evolution of the human pseudoautosomal region 2 (PAR2). *Genome Res* 13: 281-6
- Cheng CY, Mruk DD. 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 82: 825-74

- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Pelletier R, Cozzi J, Séle B. 1995. Meiotic segregation of the X and Y chromosome I analyzed by three – color FISH in human interphase spermatozoa. *Cytogenet Cell Genet* 71:126-30
- Chu CE, Donaldson MDC, Kelnar CJH, Smail PJ, Greene SA, Paterson WF, Connor JM. 1994. Possible role of imprinting in the Turner phenotype. *J Med Genet* 31: 840-42
- Chu CE, Connor JM, Donaldson MDC, Kelnar CJH, Smail PJ, Greene SA. 1995. Detection of Y mosaicism in patients with Turner's syndrome. phenotype. *J Med Genet* 32: 578-80
- Chuang RY, Weaver PL, Liu Z, Chang TH. 1997. Requirement of the DEAD-Box protein ded1p for messenger RNA translation. *Science* 275: 1468-71
- Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G. 1993. A 50 element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74:505–14
- Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, Migliaccio C, Miano MG, Matarazzo MR, Vacca M, Franze A, Cuccuresse M, Cocchia M, Curci A, Terracciano A, Torino A, Cocchia S, Mercadante G, Pannone E, Archidiacono N, Rocchi M, Schlessinger D, D'Urso M. 2000. Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet* 9: 395-401
- Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB. 1996. *XIST* RNA paints the inactive X-chromosome at interphase: Evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol* 132: 259-75
- Cockwell A, MacKenzie M, Youings S, Jacobs P. 1991. A cytogenetic and molecular study of a series of 45,X fetuses and their parents. *J Med Genet* 28: 151-5
- Cohen PE, Pollard JW. 2001. Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *BioEssays* 23: 996-1009
- Collins AL, Cockwell AE, Jacobs PA, Dennis NR. 1994. A comparison of the clinical and cytogenetic findings in nine patients with a ring(X) cell line and 16 45,X patients. *J Med Genet* 31: 528-33
- Cooke HJ, Fantes J, Green D. 1983. Structure and evolution of human Y chromosome DNA. *Differentiation* 23: Suppl: S48-55
- Crolla JA, Llerena JC. 1988. A mosaic 45,X/46,X,r(?) karyotype investigated with X and Y centromere-specific probes using a non-autoradiographic in-situ hybridization technique. *Hum Genet* 81: 81-4
- Csankovszki G, Panning B, Bates B, Pehrson JR, Jaenish R. 1999. Conditional deletion of *Xist* disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation. *Nat Genet* 22: 323-4
- Csankovszki G, Nagy A, Jaenish R. 2001. Synergism of *Xist* RNA, DNA methylation and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 153:773-83
- Dalton P, Coppin B, James R, Skuse D, Jacobs P. 1998. Three patients with a 45,X/46,X,psu dic (Xp) karyotype. *J Med Genet* 35: 519-24
- de Almeida JCC, Llerena JC Jr, Gomez DM, Martins RR, Jung M, Reis DF, Cuñha AG. 1985. G-11 staining in Turner's syndrome with mos 45,X/46,X,r(X). *Ann Genet* 28: 37-41
- De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Hum Reprod Suppl* 1:1-8

- Del Castillo I, Cohen-Salmon M, Blanchard S, Lutfalla G, Petit C. 1992. Structure of the X-linked Kallman syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet* 2: 305-10
- Debrand E, Chureau C, Arnaud D, Avner P, Heard E. 1999. Functional analysis of the DXPas34 locus, a 3' regulator of Xist expression. *Mol Cell Biol* 19: 8513-25
- Delbridge ML, Lingelfelter PA, Diesteche CM, Graves JA. 1999. The candidate spermatogenesis gene RBMY has a homologue on the human X chromosome. *Nat Genet* 22: 223-4
- Delobel B, Djelati R, Gabriel-robez O, Croquette MF, Rosseaux-Prevost R, Rousseaux J, Rigot JM, Rumpler Y. 1998. Y-autosome translocations and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Hum Genet* 102: 98-102
- Dennis NR, Collins AL, Crolla JA, Cockwell AE, Fisher AM, Jacobs PA. 1993. Three patients with ring (X) chromosomes and a severe phenotype. *J Med Genet* 30:482-6.
- Dennis N, Coppin B, Turner C, Skuse D, Jacobs P. 2000. A clinical and molecular study of 47 females with r(X) chromosomes. *Ann Hum Genet* 64: 277-93
- Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM. 1998. Meiotic recombination in *C. elegans* initiated by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94: 387-98
- D'Esposito M, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, Esposito T, Flagiello L, Mazzarella R, Schlessinger D, D'Urso M. 1996. A synaptobrevin-like gene in Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nat Genet* 12: 227-9
- D'Esposito M, Matarazzo MR, Ciccodicola A, Strazzullo M, Mazzarella R, Quaderi NA, Fujiwara H, Ko MS, Rowe LB, Ricco A, et. al. 1997. Differential expression pattern of XqPAR-linked genes SYBL1 and IL9R correlates with the structure and evolution of the region. *Hum Mol Genet* 6: 1917-23
- Disteche, CM. 1995. Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends Genet* 11: 17-22
- Disteche CM. 1999. Escapees on the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14180-2
- Duesbery NS, Van de Woude GF. 2002. An arresting activity. *Nature* 416: 804-5
- Duthie SM, Nesterova TB, Formstone EJ, Keohane AM, Turner BM, Zakian SM, Brockdorff N. 1999. Xist RNA exhibits a banded localization on the inactive X chromosome and is excluded from autosomal material in cis. *Hum. Mol. Genet.* 8:195-204
- Eddy EM. 2002. Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res* 57: 103-28
- Ehrmann IE, Ellis PS, Mazeyrat S, Duthie S, Brockdorff N, Mattel MG, Gavin, MA, Affara NA, Brown GM, Simpson E, Mitchell MJ, Scott DM. 1998. Characterization of genes encoding translation initiation factor eIF-2 $\gamma$  in mouse and human: sex chromosome localization, escape X-inactivation and evolution. *Hum Mol Genet* 7: 1725-37
- Ellis NA, Ye TZ, Parron S, German J, Goodfellow PN, Weller P. 1994a. Cloning of PBDX, an MIC2-related gene that spans the pseudoautosomal boundary on chromosome Xp. *Nat Genet* 6: 394-400
- Ellis NA, Tippett P, Petty A, Reid M, Weller PA, Ye TZ, German J, Goodfellow PN, Thomas S, Banting G. 1994b. PBDX is the XG blood group gene. *Nat Genet* 8:285-90
- Ellison JW, Ramos C, Yen PH, Shapiro LJ. 1992. Structure and expression of the human pseudoautosomal gene XE7. *Hum Mol Genet* 1: 691-6

- Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W. 1997. PHOG, a candidate gene involved in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 6: 1341-7
- Erlandsson R, Wilson JF, Paabo S. 2000. Sex chromosomal transposable element accumulation and male-driven substitutional evolution in humans. *Mol Biol Evol* 17: 804-12
- Escalier D, Garchon HJ. 2000. XMR is associated with the aynapsed segments of sex chromosomes in the XY body of mouse primary spermatocytes. *Chromosoma* 109: 259-65
- Esposito T, Gianfrancesco F, Ciccodicola A, Montanini L, Mumm S, D'Urso M, Forabosco A. 1999. A novel pseudoautosomal human gene encodes a putative protein similar to Ac-like transposases. *Hum Mol Genet* 8: 61-7
- Ferguson-Smith MA. 1965. Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. *J Med Genet* 2: 142-55
- Fernández-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero DR, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A. 2003. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male meiosis. *Dev Cell* 4: 497-508
- Fernández R, Méndez J, Pásaro E. 1996. Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. *Hum Genet*: 98: 29-35
- Fernández-García R, García-Doval S, Costoya S, Pásaro E. 2000. Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: a study of "hidden" mosaicism. *Clin Genet* 58: 201-8.
- Fisher EMC, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Bentley Lawrence J, Willard HF, Bieber FR, Page DC. 1990. Homologous ribosomal protein genes on the X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* 63: 1205-18
- Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Moro E, Pistorello M, Barboux S, Rossato M. 1998. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 13: 302-7
- Foresta C, Ferlin A, Moro E. 2000. Deletion and expression analysis of *AZFa* genes on the human Y chromosome revealed a major role for *DBY* in male infertility. *Hum Mol Genet* 9: 1161-9
- Foresta C, Betella A, Moro E, Roverato A, Merico m, Ferlin A. 2001. Sertoli cell function in infertile patients with and without microdeletions of the azoospermia factors on the Y chromosome long arm. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2414-9
- Foster JW, Graves JA. 1994. An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome; implications for the evolution of the mammalian testis determining gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1927-31
- Freije D, Schlessinger D. 1992. A 1.6 Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus. *Am J Hum Genet* 51: 66-80
- Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. 1992. Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* 258: 1784-7
- Gálvez Galicia E. 2002. Efecto de la edad en el apareamiento XY durante la meiosis masculina. Tesis Bióloga. Facultad de Ciencias. UNAM

- Ganesan S, Silver DP, Greenberg RA, Avni D, Drapkin R, Miron A, Mok SC, Randrianarison V, Brodie S, Salstrom J, Rasmussen S, Klimke A, Marrese C, Marahens Y, Deng CX, Feunteun J, Livingston DM. 2002. BRCA1 Supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 111: 393-405
- Gartler SM, Andina R, Grant N. 1975. Ontogeny of the X chromosome inactivation in the female germ line. *Exp Cell Res* 91: 454-7
- Geerkens C, Just W, Held KR, Vogel W. 1996. Ulrich-Turner syndrome is not caused by haploinsufficiency of RPS4X. *Hum Genet* 97: 39-44
- Gelin C, Aubrit F, Phalipon A, Raynal B, Cole S, Kaczorek M, Bernard A. 1989. The E2 antigen, a 32 kd glycoprotein involved in T-cell adhesion processes, is MIC2 gene product. *EMBO J* 8: 2353-9
- Gianfrancesco F, Esposito T, Montanini L, Ciccodicola A, Mumm S, Mazzarella R, Rao E, Giglio S, Rappold G, Forabosco A. 1998. A novel pseudoautosomal gene encoding a putative GTP-binding protein resides in the vicinity of the Xp/Yp telomere. *Hum Mol Genet* 7: 407-14
- Gianfrancesco F, Sanges R, Esposito T, Tempesta S, Rao E, Rappold G, Archidiacono N, Graves JAM, Forabosco A, D'Urso M. 2001. Differential divergence of three human pseudoautosomal genes and their mouse homologs: implications for sex chromosome evolution. *Genome Res* 11: 2095-100
- Gicquel C, Cabrol S, Schneid F, Le Bouc Y. 1992. Molecular diagnosis of Turner syndrome. *J Med Genet* 29: 547-51
- Godoy Assumpcao J, Hackel C, Marques-de-Faria AP, Palandi de Melo M. 2000. Molecular mapping of an idic(Yp) chromosome in an Ulrich-Turner patient. *Am J Med Genet* 91: 95-8
- González del Angel A, Blanco B, Del Castillo V, Carnevale A. 1995. Identificación de cromosomas sexuales marcadores mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH). *Rev Invest Clin* 47: 117-25
- Goodfellow PJ, Darling SM, Thomas NS, Goodfellow PN. 1986. A pseudoautosomal gene in man. *Science* 234: 740-3
- Gough NM, Gearing DP, Nicola NA, Baker E, Pritchard M, Callen DF, Sutherland GR. 1990. Localization of the human GM-CSF receptor gene to the X-Y pseudoautosomal region. *Nature* 345: 734-6
- Grass FS, Brown CA, Backeljaw PF, Lucas A, Brasington C, Gazak JM, Nakano S, Ostrowski RS, Spence JE. 2000. Novel ring chromosome composed of X and Y-derived material in a girl with manifestations of Ulrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 93: 343-8
- Graves JA. 1996. Mammals that break the rules: genetics of marsupials and monotremes. *Annu Rev Genet* 30: 233-60
- Graves JAM. 2000. Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis- a feminist view. *Biol Reprod* 63: 667-76
- Graves JAM. 2002. The rise and fall of SRY. *Trends Genet* 18: 259-64
- Graves JAM, Wakefield MJ, Toder R. 1998. The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Hum Mol Genet* 7: 1991-6
- Graves JAM, Delbridge ML. 2001. The X-a sexy chromosome. *BioEssays* 23: 1091-94
- Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW, Muller J. 2000. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 199-202.

- Greenfield A, Carrel L, Pennisi D, Philippe C, Quaderi N, Siggers P, Steiner K, Tam PPL, Monasco AP, Willard HF, Koopman P. 1998. The UTX gene escape X inactivation in mice and humans. *Hum Mol Genet* 7: 737-42
- Grelon M, Vezon D, Gendrot G, Pelletier G. 2001. AtSpo11 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* 20: 589-600
- Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Sheean LA, Feingold E, Sherman SL, Hassold TJ. 1995. Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Hum Mol Genet* 4:227-32.
- Guttenbach M, Winking H, Schmid M. 1993. Organization of the Y chromosome in testis cells of fetal and adult mice as determined by in situ hybridization. *Chromosoma* 102: 618-22
- Guttenbach M, Kohn FM, Engel W, Schmid M. 2000. Meiotic nondisjunction of chromosomes 1, 17, 18, X, and Y in men more than 80 years of age. *Biol Reprod* 63:1727-9
- Hale DW, Hunt PA, Tucker PK, Eicher EM. 1991. Synapsis and obligate recombination between the sex chromosomes of male laboratory mice carrying the Y\* rearrangement. *Cytogenet Cell Genet* 57: 231-9
- Hall J, Gilchrist D. 1990. Turner syndrome and its variants. *Pediatr Clin North Am* 37: 1421-40.
- Hall LL, Clemson CM, Byron M, Wyder K, Lawrence JB. 2002. Unbalanced X;autosome translocations provide evidence for sequence specificity in the association of Xist RNA with chromatin. *Hum Mol Genet* 11: 3157-65
- Handley PM, Mueckler M, Siegel NR, Ciechanover A, Schwartz AL. 1991. Molecular cloning, sequence, and tissue distribution of the human ubiquitin-activating enzyme E1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 258-62
- Hansen RS, Sotuer R, Wijmenga C, Vary JC, Stanek AM, Canfield TK, Luo P, Matarazzo MR, D'Esposito M, Fiel R, et al. 2000. Escape from gene silencing in ICF syndrome and evidence for advanced replication time as a major determinant. *Hum Mol Genet* 9: 2575-87
- Harbison M, Hassold T, Kobrynn C, Jacobs PA. 1988. Molecular studies of the parental origin and nature of human X isochromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 47: 217-22.
- Hassold T, Benham F, Leppert M. 1988. Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am J Hum Genet* 42: 534-41
- Hassold T, Arnovitz K, Jacobs PA, May K, Robinson D. 1990. The parental origin of the missing or additional chromosome in 45,X and 47,XXX females. *Birth Defects Orig Artic Ser* 26: 297-304
- Hassold TJ, Sherman SL, Pettay D, Page DC, Jacobs PA. 1991. XY chromosome nondisjunction in man is associated with diminished recombination in the pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 49:253-60
- Hassold T, Pettay D, Robinson A, Uchida I. 1992. Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. *Hum Genet* 89: 647-52
- Hassold T, Sherman S, Hunt P. 2000. Counting cross-overs: characterizing meiotic recombination in mammals. *Hum Mol Genet* 9: 2409-19
- Hassold T, Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human. *Nat Rev Genet* 2: 280-291
- Hawley RS, Arbel T. 1993. Yeast genetics and the fall of the classical view of meiosis. *Cell* 72: 301-3

- Heard E, Clerc P, Avner P. 1997. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet* 31:571-610
- Heemst DV, Heyting CH. 2000. Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. *Chromosoma* 109:10-26.
- Held KR, Keber S, Kaminsky E, Singh S, Goetz P, Seemanova E, Goedde HW. 1992. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: Does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet* 88: 288-94
- Hernando C, Carrera M, Ribas I, Parear N, Baraibar R, Egozcue J, Fuster C. 2002. Prenatal and postnatal characterization of Y chromosome structural anomalies by molecular cytogenetic analysis. *Prenat Diagn* 22: 802-5
- Hildebrand R, Schroder W, Brude E, Schepler A, Koning R, Stutte HJ, Arnemann J. 1999. Detection of *TSPY* protein in a unilateral microscopic gonadoblastoma of a Turner mosaic patient with a Y-derived marker chromosome. *J Pathol* 189: 623-6
- Hindkjaer J, Brandt CA, Stromkjaer H, Koch J, Kolvraa S, Bolund L. 1996. Primed In Situ labeling (PRINS) as a rational procedure for identification of marker chromosomes using a panel of primers differentially tagging the human chromosomes. *Clin Genet* 50: 437-41
- Hodges CA, LeMarie-Adkins R, Hunt PA. 2001. Coordinating the segregation of sister chromatids during the first meiotic division: evidence for sexual dimorphism. *J Cell Sci* 114: 2417-26
- Hodges CA, Ilagan A, Jennings D, Keri R, Nilson J, Hunt PA. 2002. Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. *Hum Reprod* 17: 1171-80
- Hook EB, Warburton D. 1983. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet* 64:24-7.
- Hoyer-Fender S, Constanzi C, Pehrson JR. 2000. Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp Cell Res* 258: 254-260
- Huber R, Hansen RS, Strazzullo M, Pengue G, Mazzarella R, D'Urso M, Schlessinger D, Pilia G, Gartler SM, D'Esposito M. 1999. DNA methylation in transcriptional repression of two differentially expressed X-linked genes, *GPC3* and *SYBL1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 616-21
- Hunt P, Le Marie R. 1992. Sex-chromosome pairing: evidence that the behavior of the pseudoautosomal region differs during male and female meiosis. *Am J Hum Genet* 50: 1162-70
- Hunt P, Le Marie R, Embury P, Sheean L, Kroz K. 1995. Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis. *Hum Mol Genet* 4: 2007-12
- Hunt PA, Hassold TJ. 2002. Sex matters in Meiosis. *Science* 296: 2181-21893
- Hunter N, Bôrner GV, Lichten M, Kleckner N. 2001.  $\gamma$ -H2AX illuminates meiosis. *Nat Genet* 27: 236-238
- Hurst LD, Randerson JP. 1999. An eXceptional chromosome. *Trends Genet* 15: 383-5
- Hurst LD. 2001. Sex and the X. *Nature* 411: 149-50
- Jablonka E, Lamb MJ. 1988. Meiotic pairing constraints and the activity of sex chromosomes. *J Theor Biol* 133: 23-6

- Jacobs PA, Hassold TJ, Whittington E, Butler G, Collyer S, Kreston M, Lee M. 1988. Klinefelter's syndrome: an analysis of the origin of the additional sex chromosome using molecular probes. *Ann Hum Genet* 52: 93-109
- Jacobs PA, Betts PR, Cockwell AE, Crolla JA, Mackenzie MJ, Robinson DO, Youings SA. 1990. A cytogenetic and molecular reappraisal of a series of patients with Turner's syndrome. *Ann Hum Genet* 54: 209-23
- Jacobs P, Dalton P, James R, Mosse K, Power M, Robinson D, Skuse D. 1997. Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 61: 471-83
- Jäger RJ, Harley VR, Pfeiffer RA, Goodfellow PN, Scherer G. 1992. A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Hum Genet* 90: 350-5
- Jakubowski L, Jeziorowska A, Constantinou M, Kaluzewski B. 2000. Molecular analysis of Y chromosome long arm structural instability in patients with gonadal dysfunction. *Clin Genet* 57: 291-5
- James RS, Dalton P, Gustashaw K, Wolff DI, Willard HF, Mitchell C, Jacobs PA. 1997a. Molecular characterization of isochromosomes of Xq. *Ann Hum Genet* 61: 485-90
- James RS, Sharp AJ, Cockwell AE, Coppin B, Jacobs PA. 1997b. Evidence for a criptic 46,XX cell line in a 45,X/46,X,psu idic(Xq) patient with normal reproduction. *J Med Genet* 34: 1030-2
- James RS, Coppin B, Dalton P, Dennis NR, Mitchell C, Sharp AJ, Skuse DH, Thomas NS, Jacobs PA. 1998. A study of females with deletions of the short arm of the X chromosome. *Hum Genet* 102: 507-16
- Jamieson RV, Zhou SX, Wheatley SC, Koopman P, Tam PP. 1998. Sertoli cell differentiation and Y-chromosome activity: a developmental study of X-linked transgene activity in sex reversed X/Xsra mouse embryos. *Dev Biol* 199: 235-44
- Jani MM, Torchia BS, Pai GS, Migeon BR. 1995. Molecular characterization of tiny ring X chromosomes from females with functional X chromosome disomy and lack of cis X inactivation. *Genomics* 27:182-8
- Jazaeri AA, Yee CJ, Sotiriou C, Brantley KR, Boyd J, Liu ET. 2002. Gene expression profiles of BCRA1-linked and BCRA2-linked and sporadic ovarian tumours. *J Natl Cancer Inst* 94: 990-1000
- Jegalian K, Page DC. 1998. A proposed path by which genes common to mammalian X and Y chromosomes evolved to become X inactivated. *Nature* 394:776-80
- Jenderny J, Schmidt W, Held KR. 1998. Presence of AZF region on a female with a idic(Y)(q11). *Clin Genet* 54: 341-4
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-80
- Jeppesen P, Turner BM. 1993. The in-active X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74: 281-89
- Jones MH, Furlong RA, Burkin H, Chaimers J, Brown GM, Khwaja O, Affara NA. 1996. The *Drosophila* developmental gene fat facets has a human homologue in Xp11.4 which escapes X-inactivation and has related sequences on Yq11.2. *Hum Mol Genet* 5: 1695-701
- Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. 2000. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet* 9: 2563-72
- Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. 1997. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 7:157-65

- Kay GF, Ashworth A, Penny GD, Dunlop M, Swift S, Brockdorff N, Rastan S. 1991. A candidate spermatogenesis gene on the mouse Y chromosome is homologous to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* 354: 486-9
- Keitges E, Schorderet DF, Gartler SM. 1987. Linkage of the steroid sulphatase to the sex-reversed mutation in the mouse. *Genetics* 116: 465-8
- Kelly TE, Franko JB, Rogol A, Golden WL. 1998. Discordant phenotypes and 45, X/46, X, idic(Y). *J Med Genet* 35: 862-4
- Kempter B, Grossbadem K. 1992. Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *Trends Genet* 8: 2
- Keohane AM, O'neill LP, Belyaev ND, Lavender JS, Turner BM. 1996. X-inactivation and H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol* 180: 618-30
- Kermouni A, Roost EV, Arden KC, Vermeesch JR, Weiss S, Godelaine D, et al. 1995. The IL-9 receptor gene (IL9R): genomic structure, chromosomal localization in the pseudoautosomal region of the long arm of the sex chromosomes, and identification of IL9R pseudogenes at 9qter, 10pter, 16pter and 18pter. *Genomics* 29: 371-82
- Kleiman SE, Bar-Shira Maymon B, Yogev L, Paz G, Yavetz H. 2001. The prognostic role of the extent of Y microdeletions on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Hum Reprod* 16: 399-402
- Kleczkowska A, Dmoch E, Kubien E, Fryns JP, van der Berghe H. 1990. Cytogenetic findings in a consecutive series of 478 patients with Turner syndrome: the Leuven experience 1965-1989. *Genetic Couns* 1: 227-33
- Koch J, Hindkjaer J, Kolvraa S, Bolund L. 1995. Construction of a panel of chromosome-specific oligonucleotide probes (PRINS-primers) useful for the identification of individual human chromosomes in situ. *Cytogenet Cell Genet* 71: 142-7
- Kocova M, Siegel SF, Wenger SL, Lee PA, Trucco M. 1993. Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *Lancet* 342: 140-3
- Koehler K, Hawley S, Sherman S, Hassold T. 1996. Recombination and nondisjunction in humans and flies. *Hum Mol Genet* 5:1495-504
- Kofman-Alfaro S, Chandley AC. 1970. Meiosis in the male mouse. An autoradiographic investigation. *Chromosoma* 31: 404-20
- Kofman-Alfaro S, Speed RM, Boyle S, Chandley AC. 1994. Condensation behavior of the human X chromosome in male germ cells and Sertoli cells examined by fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Res* 2: 439-44
- Kogan GL, Epstein VN, Aravin AA, Gvozdev VA. 2000. Molecular evolution of two paralogous tandemly repeated heterochromatic gene clusters linked to the X and Y of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 17: 697-702
- Kogan SC, Gitschier J. 1990. Genetic prediction of hemophilia A. En: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Snisky JJ, White TJ eds. San Diego. Academic Press pp 288-99
- Kohli J, Hartsuiker E. 2001. Meiosis. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group. www.els.net
- Kramer JA, McCarrey JR, Djakiew D, Krawetz SA. 1998. Differentiation: the selective potentiation of chromatin domains. *Development* 125: 4749-55
- Kralewsky M, Novello A, Benavente R. 1997. A novel Mr 77,000 protein of the XY body of mammalian spermatocytes: its localization in normal animals and in Searle's translocation carries. *Chromosoma* 106:160-7

- Kratzer PG, Chapman VM. 1981. X chromosome reactivation in oocytes of *Mus caroli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3093-7
- Kuhl H, Rottger S, Heilbronner H, Enders H, Schemp W. 2001. Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs). *Chromosome Res* 9: 215-22
- Lahn BT, Page DC. 1997. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278: 675-80
- Lahn BT, Page DC. 1999a. Retroposition of autosomal mRNA yielded testis-specific gene family on human Y chromosome. *Nat Genet* 21: 429-33
- Lahn BT, Page DC. 1999b. Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286: 964-7
- Lahn BT, Page DC. 2000. A human sex-chromosomal gene family expressed in male germ cells and encoding variable charged proteins. *Hum Mol Genet* 9: 311-9
- Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K. 2001. The human Y chromosome in the light of evolution. *Nat Rev Genet* 2: 207-16
- Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Hallberg A, Hersey J, Karadima G, Pettay D, Saker D, Shen J, Taft L, Mikkelsen M, Petersen MB, Hassold T, Sherman SL. 1997. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosoma 21. *Hum Mol Genet* 6: 1391-9
- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
- Larsen T, Gravhott CH, Tillebeck A, Larsen H, Jensen MB, Nielsen J, Friedrich U. 1995. Parental origin of the X chromosome, X chromosome mosaicism and screening for "hidden " Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. *Clin Genet* 48: 6-11
- Lau YFC. 1999. Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers and the TSPY gene. *Am J Hum Genet* 64: 921-7.
- Lauri DA, Hultén MA. 1985. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. *Ann Hum Genet* 10: 2570-5
- Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. 1999. Tsix, a gene antisense to Xist and the X-inactivation center. *Nat Genet* 21: 400-4
- Lee J. 2000. Disruption of imprinted X inactivation by parent-of-origin-effects at Tsix. *Cell* 103: 17-27
- Lehrke R. 1972. A theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am J Mental Deficiency* 76: 611-9
- LeMarie-Adkins R, Radke K, Hunt PA. 1997. Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol* 139: 1611-9
- Leonova J, Hanson C. 1999. A study of 45,X/46,XX mosaicism in Turner syndrome females: a novel primer pair for the (CAG)<sub>n</sub> repeat within the androgen receptor gene. *Hereditas* 131:87-92
- Levilliers J, Quack B, Weissenbach J, Petit C. 1989. Exchange of terminal portions of X- and Y- chromosomal short arms in human XY females. *Proc Natl Acad Sci* 88: 2296-300
- Li L, Hamer DH. 1995. Recombination and allelic association in the Xq/Yq homology region. *Hum Mol Genet* 4: 2013-2016

- Lifschytz E, Lindsley DL. 1972. The role of X chromosome inactivation during spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 182-6
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schneir J, Slonimski PP. 1989. Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337: 121-2
- Lindgren V, Chen C, Bryke CR, Lichter P, Page DC, Yang-Feng TL. 1992. Cytogenetic and molecular characterization of marker chromosomes in patients with mosaic 45,X karyotypes. *Hum Genet* 88: 393-8
- López M, Canto C, Aguinaga M, Torres L, Cervantes A, Alfaro G, Méndez JP, Kofman-Alfaro S. 1998. Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet*: 76:120-4
- Lorda-Sánchez I, Binkert F, Maechler M, Schinzel A. 1991. A molecular study of X isochromosomes: parental origin, centromeric structure, and mechanisms of formation. *Am J Hum Genet* 49:1034-40
- Lorda-Sánchez I, Binkert F, Maechler M, Schinzel A. 1992a. Molecular study of 45,X conceptuses: correlation with clinical findings. *Am J Hum Genet* 49: 1034-40
- Lorda-Sánchez I, Binkert F, Maechler M, Robinson WP, Schinzel A. 1992b. Reduced recombination and paternal age effect in Klinefelter syndrome. *Hum Genet* 89: 524-30
- Loughlin SAR, Redha A, McIver J, Boyd E, Carothers A, Connor JM. 1991. Analysis of the origin of Turner's syndrome using polymorphic DNA probes. *J Med Genet* 28: 156-8
- Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A, Wyrobek A. 2001. Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefelter syndrome. *Am J Hum Genet* 69:1046-54
- Luetjens CM Gromold J, Engelhardt M, Von Eckardstein S, Bergmann M, Nieschlag E, Simoni M. 2002. Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation. *Hum Reprod* 17: 2258-66
- Lyon MF. 1998. X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet*. 80:133-37
- Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K, et al. 1993. A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidate for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 75: 1287-95
- Madan K. 1983. Balanced structural changes involving the human X: effect on sexual phenotype. *Hum Genet* 63: 216-21
- Mahadevaiah SK, Odorisio T, Elliot DJ, Rattigan A, Szot M, Laval SH, Washburn LL, McCarrey JR, Cattanaich BM, Lovell-Badge R, Burgoyne PS. 1998. Mouse homologues of the human AZF candidate gene RBM are expressed in spermatogonia and spermatids and map to a Y chromosome deletion interval associated with high incidence of sperm abnormalities. *Hum Mol Genet* 7: 715-727.
- Mahadevaiah SK, Turner JMA, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27: 271-6
- Marahrens Y, Panning B, Dausman J, Strauss W, Jaenisch R. 1997. Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not in spermatogenesis. *Genes Dev* 11: 156-66
- Mardon G and Page DC. 1989. The sex-determining region of the mouse Y chromosome encodes a protein with a highly acidic domain and 13 zinc fingers. *Cell* 56: 765-70

- Mardon G, Luoh SW, Simpson EM, Gill G, Brown LG, Page DC. 1990. Mouse Zfx protein is similar to Zfy-2: each contains an acidic activating domain and 13 zinc fingers. *Mol Cell Biol* 10: 681-8
- Martin RH, Ko E, Rademaker A. 1991. Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 39: 321
- Martin RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW. 1995. The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor FISH. *Am J Hum Genet* 57:1395-9
- Martin RH, Shi Q, Field LL. 2001. Recombination in the pseudoautosomal region in a 47, XYY male. *Hum Genet* 109: 143-5
- Martínez Passarell O, Templado C, Egozcue J, Vicens-Calvet E, Nogués C. 1999a. PCR protocol to detect parental origin and hidden mosaicism in sex chromosome aneuploidies. *Horm Res* 51: 248-52.
- Martínez-Passarell O, Nogués C, Bosch M, Egozcue J, Templado C. 1999b. Analysis of sex chromosome aneuploidy in sperm from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 104: 345-9.
- Martínez-Passarell O, Templado C, Vicens-Calvet E, Egozcue J, Nogués C. 1999c. Paternal sex chromosome aneuploidy as a possible origin of Turner syndrome in monozygotic twins: case report. *Hum Reprod* 14:2735-8.
- Matarazzo MR, De Bonis ML, Gregory RI, Vacca M, Hansen RS, Mercadante G, D'Urso M, Feil R, D'Esposito M. 2002. Allelic inactivation of the pseudoautosomal gene SYBL1 is controlled by epigenetic mechanisms common to the X and the Y chromosomes. *Hum Mol Genet* 11: 3191-8
- Mathur A, Stekol L, Schatz D, MacLaren NK, Scott ML, Lippe B. 1991. The parental origin of the single X chromosome in Turner syndrome: lack of correlation with parental age or clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 48:682-6.
- Matsuda Y, Hirobe T, Chapman VM. 1991. Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4850-4
- Matsuda Y, Monees PB, Chapman VM. 1992. Deficiency of X and Y chromosome pairing at meiotic prophase in spermatocytes of sterile interspecific hybrids between laboratory mice (*Mus musculus*) and *Mus spretus*. *Chromosoma* 101: 483-92
- Matsuo M, Muroya K, Nanao K, Hasegawa Y, Terasaki H, Kosaki K, Ogata T. 2000a. Mother and daughter with 45,X/46,X,r(X)(p22.3q28) and mental retardation: Analysis of the X inactivation patterns. *Am J Med Genet* 91: 267-72
- Matsuo M, Muroya K, Adachi M, Tachibana K, Asakura Y, Nakagomi Y, Hanaki K, Yokoya S, Yoshizawa A, Igarashi Y, Hanew K, Matsuo N, Ogata T. 2000b. Clinical and molecular studies in 15 females with ring X chromosomes: implications for r(X) formation and mental development. *Hum Genet* 107: 433-9
- Mazeyrat S, Saut N, Mattei MG, Mitchell MJ 1999. RBMY evolved on the Y chromosome from a ubiquitously transcribed X-Y identical gene. *Nat Genet* 22: 224-6
- McCarrey JR, Dilworth DD. 1992. Expression of Xist in mouse germ cells correlates with X-chromosome inactivation. *Nat Genet* 2: 200-3.
- McCarrey JR, Watson C, Atencio J, Ostermeier GC, Marahens Y, Jaenish R, Krawetz SA. 2002. X-chromosome inactivation during spermatogenesis is regulated by a *Xist-Tsix*-independent mechanism in the mouse. *Genesis* 34: 257-66

- McGinniss MJ, Brown DH, Burke LW, Mascarello JT, Jones MC. 1997. Ring chromosome X in a child with manifestations of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 70: 37-42
- Mckee, BD, Handel MA. 1993. Sex chromosomes, recombination, and chromatin conformation. *Chromosoma* 102:71-80.
- McKim KS, Hayashi-Hagihara A. 1998. *mei-W68* in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog; evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes Dev* 12: 2932-42
- Medlej R, Lobaccaro JM, Berta P, Belon C, Leheup B, Toyblanc JE, Weill J, Chevalier C, Dumas R, Sultan C. 1992. Screening for Y-derived sex determining gene SRY in 40 patients with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1289-92
- Méndez JP, Canto P, López M, de la Chesnaye E, Torres L, Chávez B, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S. 1999. Scant XYqh- testicular cells with normal SRY was enough to differentiate bilateral testes in a 45,X/46,XYqh- patient. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 87: 159-62
- Mermoud JE, Popova B, Peters AHFM, Jenewein T, Brockdorff N. 2002. Histone H3 lysine methylation occurs rapidly at the onset of random X chromosome inactivation. *Curr Biol* 12: 247-51
- Meroni G, Franco B, Archidiacono N, Messali S, Andolfi G, Rocchi M, Ballabio A. 1996. Characterization of a cluster of sulfatase genes on Xp22.3 suggest gene duplication in an ancestral pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet* 5: 423-31
- Migeon BR. 1994. X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. *Trends Genet* 10: 230-5
- Migeon BR, Luo S, Jani M, Jeppesen P. 1994. The severe phenotype of females with tiny ring X chromosomes is associated with inability of these chromosomes to undergo X inactivation. *Am J Hum Genet* 55: 497-504
- Migeon BR, Ausems M, Giltay J, Hasley-Royster C, Kazi E, Lydon TJ, Engelen JJM, Raymond GV. 2000. Severe phenotypes associated with inactive ring X chromosomes. *Am J Med Genet* 93: 52-7
- Migeon BR, Winter H, Kazi E, Chowdhury AK, Hughes A, Haisley-Royster C, Morrison H, Jeppesen P. 2001. Low-copy number human transgene is recognized as an X inactivation center in mouse ES cells, but fails to induce cis-inactivation in chimeric mice. *Genomics* 71:156-62
- Migeon BR, Lee CH, Chowdhury AK, Carpenter H. 2002. Species differences in *TSIX/Tsix* reveal the roles of these genes in X-chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 71: 286-93
- Milatovich A, Kitamura T, Miyajima A, Francke U. 1993. Gene for the  $\alpha$ -subunit of the human interleukin-3 receptor (IL3RA) localized to the X-Y pseudoautosomal region. *Am J Hum Genet* 53: 1146-53
- Miller OJ, Therman E. 2001. Human Chromosomes. 4<sup>th</sup> ed. Springer-Verlag. New York. 125-74
- Mitchell MJ, Woods DR, Tucker PK, Opp JS, Bishop CE. 1991. Homology of a candidate spermatogenic gene from the mouse Y chromosome to the ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* 354: 483-6
- Mitchell MJ, Wilcox SA, Watson JM, Lerner JL, Woods DR, Scheffler J, Hearn JP, Bishop CE, Graves JA. 1998. The origin and loss of the ubiquitin activating enzyme gene on the mammalian Y chromosome. *Hum Mol Genet* 7: 429-34

- Modi DN Sane S, Bhartiya D. 2003. Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. *Mol Hum Reprod* 9: 219-25
- Mohandas TK, Speed RM, Passage MB, Yen PH, Chandley AC, Shapiro LJ. 1992. Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: Meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. *Am J Hum Genet* 51: 526-33
- Monesi V. 1965a. Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. *Exp Cell Res* 39: 197-224
- Monesi V. 1965b. Differential rate of ribonucleic acid synthesis in the autosomes and sex chromosomes during male meiosis in the mouse. *Chromosoma* 17:11-21
- Monroy-Jaramillo N. 2002. Identificación de una región del cromosoma X asociada a reversión sexual masculina utilizando microsatélites. Tesis. Maestra Ciencias Biológicas (Biología Experimental). Facultad de Ciencias, UNAM
- Moore M, Best RG. 2001. Chromosome mechanics. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group/ www.els.net
- Moses MJ, Counce SJ, Paulson DF. 1975. Synaptonemal complex complement in man in spreads of spermatocytes, with details of the sex chromosome pair. *Science* 187: 363-5
- Motzkus D, Singh PB, Hoyer-Fender S. 1999. M31, a murine homolog of Drosophila HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet* 86: 83-6
- Nakahori Y, Takenaka O, Nakagome Y. 1991. A human X-Y homologous region encodes 'amelogenin'. *Genomics* 9: 264-9
- Nazarenko SA, Timoshevsky VA, Sukhanova NN. 1999. High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients. *Clin Genet* 56: 59-65
- Nietzel A, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T. 2001. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). *Hum Genet*: 108: 199-204
- Nishi MY, Domenice S, Medeiros MA, Mendoca BB, Billerbeck AE. 2002. Detection of Y-specific sequences in 122 patients with Turner syndrome: nested PCR is not a reliable method. *Am J Med Genet* 107: 299-305
- Norma K, Allis CD, Grewal SI. 2001. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* 293:1150-55
- Norris DP, Patel D, Kay G, Penny GD, Brockdorff N, Sheardown SA, Rastan S. 1994. Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by pre-emptive methylation. *Cell* 77: 41-51
- O'Carroll D, Schertan H, Peters AH, Opravil S, Haynes AR, Laible G, Rea S, Schmid M, Lebersorger A, Jerratsch M, et al. 2000. Isolation and characterization of suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* 20: 9423-33
- Odorisio T, Rodriguez TA, Evans EP, Clarke AR, Burgoyne PS. 1998. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat Genet* 18: 257-61
- Ogata T, Wakui K, Kosho T, Muroya K, Yamanouchi Y, Takano T, Fukushima Y, Rappold G, Suzuki Y. 2000. Structural analysis of a rare rearranged Y chromosome and its bearing on genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 92: 256-9

- Ogata T, Muroya K, Matsuo N, Shinobara O, Yorifuji T, Nishi Y, Hasegawa Y, Horikawa R, Tachibana K. 2001. Turner syndrome and Xp deletions: clinical and molecular studies in 47 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5498-508
- Ohno S. 1967. Sex chromosomes and sex linked genes. Springer Verlag. New York.
- Page DC, Chapelle A de la, Weissenbach J. 1985. Chromosome Y-specific DNA in related human XX males. *Nature* 315:224-6
- Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Polack J, McGillivray B, Capelle A de la, Brown LG. 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091-104
- Page DC. 1994. Y chromosome sequences in Turner's syndrome and risk of gonadoblastoma or virilization. *Lancet* 343: 240.
- Page SL, Hawley RS. 2001. c(3)G encodes a *Drosophila* synaptonemal complex protein. *Genes Dev* 15: 3130-43
- Painter TS. 1924. Studies in mammalian spermatogenesis. III. The fate of the chromatin-nucleolus in the opossum. *J Exp Zool* 39: 197
- Palka G, Stuppia L, Guancialli Franchi P, Chiarelli F, Fischetto R, Borelli P, Giannotti A, Fioretti G, Rinaldi MM, rappold GA, Calabrese G. 2000. Short arm rearrangements of sex chromosomes with haploinsufficiency of the SHOX gene are associated with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Clin Genet* 57: 449-53
- Panel 28 X Chromosome (Perking Elmer) ABI PRISM™ Linkage Mapping Set Version 2. User's Manual. 1997
- Panning B, Jaenisch R. 1996. DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* 10: 1991-2002
- Pellestor F, Girardet A, Lefort G, Andreo B, Charliou JP. 1995. Use of the primed in situ labeling (PRINS) technique for a rapid detection of chromosomes 13, 16, 18, 21, X and Y. *Hum Genet* 95: 12-7
- Pellestor F, Girardet A, Coignet L, Andreo B, Lefort G, Charliou JP. 1996. Assessment of aneuploidy for chromosomes 8, 9, 13, and 21 in human sperm by using primed in situ labeling technique. *Am J Hum Genet* 58: 797-802
- Petit C, Chapelle A de la, Levilliers J, Castillo S, Noel B, Weissenbach J. 1987. An abnormal terminal X-Y interchange accounts for most but not all cases of human XX maleness. *Cell* 49:595-602.
- Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. 2003. Un menaje a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423-40
- Petrusevska R, Beudt U, Shafer D, Schneider M, Brude E, Leitner C, Heller K, Arnemann J. 1996. Distribution of marker-Y chromosome containing cells in different tissues of a Turner mosaic patient with mixed gonadal dysgenesis. *Clin Genet* 49: 261-266
- Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nisimov DA, Panning B. 2002. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu Rev Genet* 36: 233-78
- Plattner R, Heerema NA, Howard-Peebles PN, Miles JH, Soukup S, Palmer CG. 1993. Clinical findings in patients with marker chromosomes identified by fluorescent in situ hybridization. *Hum Genet* 91: 589-98.
- Polani PE. 1982. Pairing of X and Y chromosomes, non-inactivation of X-linked genes, and the maleness factor. *Hum Genet* 60: 207-11
- Quack B, Speed RM, Luciani JM, Noel B, Guichaoua M, Chandley AC. 1988. Meiotic analysis of two human reciprocal X-autosome translocation. *Cytogenet Cell Genet* 48: 43-7

- Quilter CR, Taylor K, Conway GS, Nathwani N, Delhanty JDA. 1998. Cytogenetic and molecular investigations of Y chromosome sequences and their role in Turner syndrome. *Ann Hum Genet* 62: 99-106
- Raman R, Das P. 1991. Mammalian sex chromosomes. III. Activity of pseudoautosomal steroid sulphatase enzyme during spermatogenesis in *Mus musculus*. *Somat Cell Mol Genet* 17: 429-33
- Rao E, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA. 1997. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 16: 54-62
- Rappold GA. 1993. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 92: 315-324
- Ravassipour DB, Hart PS, Hart TC, Ritter AV, Yamauchi M, Gibson C, Wright JT. 2000. Unique enamel phenotype associated with amelogenin gene (AMELX) codon 41 point mutation. *J Dent Res* 79:1476-81
- Reddy KS, Sulcova V, Ho CK, Conner ED, Khurana A. 1996. An infant with a mosaic 45,X/46,X,psu dic(Y)(pter→q11.2::q11.2→pter) karyotype and mixed gonadal dysgenesis studied for extent of mosaicism in the gonads. *Am J Med Genet* 66: 441-4
- Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page DC. 1995. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 10: 383-93
- Richler C, Soreq H, Wahrman J. 1992. X inactivation in mammalian testis is correlated with inactive X-specific transcription. *Nat Genet* 2: 192-195
- Righetti PG and Gelfi C. 1997. Capillary Electrophoresis of DNA for molecular diagnostics. *Electrophoresis* 18: 1709-14
- Ried K, Rao E, Schleibel K, Rappold GA. 1998. Gene duplication as a recurrent theme in the evolution of the human pseudoautosomal region 1: isolation of the gene *ASMTL*. *Hum Mol Genet* 7: 1771-8
- Robins WA, Baulch JE, Moore DN, Weier HU, Blakey D, Wyrobeck AJ. 1995. Three-probe fluorescence in situ hybridization to assess chromosome X, Y and 8 aneuploidy in sperm of 14 men from two healthy groups: evidence for a paternal age effect on sperm aneuploidy. *Reprod Fertil Dev* 7: 799-809
- Robinson DO, Dalton P, Jacobs PA, Power MM, Skuse DH, Crolla JA. 1999. A molecular and FISH analysis of structural abnormal Y chromosomes in patients with Turner syndrome. *J Med Genet* 36: 279-284
- Rockmill B, Roeder GS. 1990. Meiosis in asynaptic yeast. *Genetics* 126: 563-74
- Rocques PJ, Clark J, Ball S, Crew J, Gill S, Cristodoulou Z, Borts RH, Louis EJ, Davies KE, Cooper CS. 1995. The human SB1.8 gene (DXS423E) encodes a putative chromosome segregation protein conserved in lower eukaryotes and prokaryotes. *Hum Mol Genet* 4: 243-9
- Roeder GS, Bailis JM. 2000. The pachytene checkpoint. *Trends Genet* 16: 395-403
- Rouyer F, Simmler MC, Johnson C, Vergnaud G, Cooke HJ, Weissenbach J. 1986. A gradient of sex linkage in the pseudoautosomal region of sex chromosomes. *Nature* 319: 291-5
- Rouyer F, Simmler MC, Page DC, Weissenbach J. 1987. A sex chromosome rearrangement in a human XX male caused by Alu-Alu recombination. *Cell* 51: 417-25

- Saifi GM, Chandra HS. 1999. An apparent excess of sex- and reproduction- related genes on the human X chromosome. *Proc Royal Soc Lond B* 266: 203-9
- Salido EC, Yen PH, Koprinvnikar K, Yu L, Shapiro LJ. 1992a. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 50: 303-16
- Salido S, Yen PH, Mohandas TK, Shapiro LJ. 1992b. Expresión of X-inactivation-associated gene XIST during spermatogenesis. *Nat Genet* 2:196-199.
- Salo P, Käräinen H, Petrovic V, Peltomaki P, Page DC, de la Chapelle A. 1995. Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome. *Genes Chromosomes Cancer* 14: 210-4
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samonte RV, Conte RA, Verma RS. 1998. Molecular phylogenetics of the hominoid Y chromosome. *J Hum Genet* 43: 185-6
- Sartorelli EM, Mazzucato LF, de Pina-Neto JM. 2001. Effect of paternal age on human sperm chromosomes. *Fertil Steril* 76: 1119-23
- Savage A, Feingold E, Broman KW, Sherman SL. 2000. Genome-wide variation in recombination in female meiosis: a risk factor for non-disjunction of chromosome 21. *Hum Mol Genet* 9:515-523
- Savary JB, Vasseur F, Flactif M, Willatt L, Lefevre J, Ferguson-Smith MA, Deminatti MM. 1992. Cytogenetic and molecular investigations of an abnormal Y chromosome: evidence for a pseudo-dicentric (Yq) isochromosome. *Ann Génét* 35: 134-9
- Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, Rozen S, Dinulus MB, Disteche CM, Page DC. 1996. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 14: 292-299
- Schempp W, Toder R. 1993. Evolution of the mammalian XY pairing segment. En *Chromosomes Today* Vol 11. Summer AT and Chandley AC eds. Chapman and Hall. London. 277-83
- Schiebel K, Winkelmann M, Mertz A, Xu X, Page DC, Weil D, Petit C, Rappold GA. 1997. Abnormal XY exchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKY, and its homologue PRKX, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females. *Hum Mol Genet* 6: 1985-9
- Schmid W, Naef E, Murset G, Prader A. 1974 Cytogenetic findings in 89 cases of Turner's syndrome with abnormal karyotypes. *Humangenetik* 24: 93-104.
- Schmitt K, Lazzeroni LC, Foote S, Vollrath D, Fisher EMC, Goradia TM, Lange K, Page DC, Arnheim N. 1994. Multipoint linkage map of the pseudoautosomal region, based on single-sperm typing: do double crossovers occur during male meiosis? *Am J Hum Genet* 55: 423-30
- Schneider-Gädicke A, Beer\_Romero P, Brown LG, Nussbaum R, Page DC. 1989. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57: 1247-58
- Schnieders F, Dork T, Arnemann A, Vogel T, Werner M, Schmidtke J. 1996. Testis Specific Protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum Mol Genet* 5: 1801-7
- Schwartz A, Chan DC, Brown L, Alagappan R, Pettay D, Disteche C, McGillivray B, de la Chapelle A, Page DC. 1998. Reconstructing hominid Y evolution: X-homologous

block, created by X-Y transposition, was disrupted by Yp inversion through LINE-LINE recombination. *Hum Mol Genet* 7: 1-11

- Schwartz S, Depinet TW, Leana-Cox J, Isada NB, Karson EM, Park VM, Pasztor LM, Sheppard LC, Stallard R, Wolff DJ, Zinn AB, Zurcher VL, Zackowski JL. 1997. Sex chromosome markers: Characterization using fluorescence in situ hybridization and review of the literature. *Am J Med Genet* 71: 1-7
- Shaffer LG, Lupski JR. 2000. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 34: 297-329
- Shankman S, Sperdle AB, Morris D, Rosendorff J, Marques I, Bernstein R, Ramsay M. 1995. Presence of Y chromosome sequences and their effect on the phenotype of six patients with Y chromosome anomalies. *Am J Hum Genet* 55: 269-75
- Sharp AJ, Spotswood HT, Robinson DO, Turner BM, Jacobs PA. 2002. Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations. *Hum Mol Genet* 11: 3145-56
- Shi Q, Spriggs E, Field LL, Rademaker A, Ko E, Barclay L, Martin RH. 2001. Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. *Am J Med Genet* 99: 34-8
- Shi Q, Spriggs E, Field LL, Rademaker A, Ko E, Barclay L, Martin RH. 2002. Absence of age effect on meiotic recombination between human X and Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 71: 254-61
- Shibata S, Lee JT. 2003. Characterization and quantitation of differential Tsix transcripts: implications for Tsix function. *Hum Mol Genet* 12: 125-36
- Shinohara T, Orwing KE, Avarbock MR, Brinster RL. 2003. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by sertoli cell transplantation. *Biol Reprod* 68: 1064-71
- Simoni M, Gromoll J, Dwomiczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A, Carani C, Meschede D, Behre HM, Horst J, Nieschlag E. 1997. Screening for deletions of Y chromosome involving the *DAZ* (Deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril* 67: 542-7
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-4
- Skuse D, Elgar K, Morris E. 1999. Quality of life in Turner syndrome is related to chromosomal constitution: implications for genetic counseling and management. *Acta Paediatr Suppl* 88: 110-3
- Slim R, Leviliers J, Ludecke HJ, Claussen U, Nguyen VC, Gough Nm, et al. 1993. A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escapes X-inactivation. *Genomics* 16: 26-33
- Smith A, Benavente R. 1992. Meiosis specific protein selectively associated with sex chromosomes of rat pachytene spermatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6938-42.
- Smith A, Benavente R. 1995. An Mr 51,000 protein of mammalian spermatogenic cells that is common to the whole XY body and centromeric heterochromatin of autosomas. *Chromosoma* 103:591-6
- Soares SR, Templado C, Blanco J, Vidal F, Bosch M, Martínez-Pasarell O, Nogués C, Egozcue J. 2001a. Numerical chromosome abnormalities in the spermatozoa of the fathers of children with trisomy 21 of paternal origin: generalized tendency to meiotic nondisjunction. *Hum Genet* 108: 134-9

- Soares SR, Vidal F, Bosch M, Martínez-Pasarell O, Nogués C, Egozcue J, Templado C. 2001b. Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 108: 499-503
- Solari AJ. 1974. The behaviour of the XY pair in mammals. *Int Rev Cytol* 38: 273-317
- Solari AJ. 1980. Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma* 81: 315-337
- Speed RM, Chandley AC. 1990. Prophase of meiosis in human spermatocytes analysed by EM microspreading in infertile men and their controls and comparisons with human oocytes. *Hum Genet* 84: 547-54
- Speed RM, Vogt P, Köler MR, Hargreave TB, Chandley AC. 1993. Chromatin condensation behaviour of the Y chromosome in the human testis. I. Evidence for decondensation of distal Yq in germ cells prior to puberty with a switch to Sertolli cells in adults. *Chromosoma* 102: 421-27
- Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. 1996. Aneuploidy in human sperm: The use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction. *Am J Hum Genet* 58:356-62
- Stalvey JRD, Durbin EJ, Erickson RP. 1989. Sex vesicle "entrapment": translocation or nonhomologous recombination of misaligned Yp and Xp as alternative mechanism for abnormal inheritance of the sex-determining region. *Am J Med Genet* 32: 564-72
- Stankiewicz P, Lupski JR. 2002. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 18: 74-82
- Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow PN. 1993. SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum Mol Genet* 2: 2013-8
- Stone C, McCabe N, Ashworth A. 2003. X-chromosome inactivation: X marks the spot for BRCA1. *Curr Biol* 13: R63-4
- Strachan T, Read AP. 1999. Human Molecular Genetics 2. Bios Wiley-Liss. New York. 322-9
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histones modifications. *Nature* 403: 41-45
- Stuppia L, Gatta V, Calabrese G, Guanciali Franchi P, Morizio E, Bombieri C, Mingarelli R, Sforza V, Frajese G, Tenaglia R, Palka G. 1998. A quarter of men with idiopathic oligo-azoospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11. *Hum Genet* 102: 566-70
- Sullivan BA and Willard HF. 1998. Stable dicentric X chromosomes with two functional centromeres. *Nat Genet* 20: 227-8
- Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, Oates R, Page DC. 1999. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene *USP9Y*. *Nat Genet* 23: 429-32
- Tagaki N, Abe K. 1990. Detrimental effects of two active X chromosomes on early mouse development. *Development* 109: 189-201
- Tanaka K, Tamura H, Tanaka H, Katoh M, Futamata Y, Seki N, Nishimune Y, Hara T. 2002. Spermatogonia-dependent expression of testicular genes in mice. *Dev Biol* 246: 466-79
- Tease C, Hartshorne GM, Hultén MA. 2002. Patterns of meiotic recombination in human fetal oocytes. *Am J Hum Genet* 70: 1469-79
- Tharapel AT, Anderson KP, Simpson JL, et al. 1993. Deletion (X)(q26.1rarrq28) in a proband and her mother – molecular characterization and phenotypic-karyotypic deductions. *Am J Hum Genet* 52: 463-71

- Therman E, Trunca C, Kuhn EM, et al. 1986. Dicentric chromosomes and the inactivation of the centromere. *Hum Genet* 72: 191-5
- Therman E, Susman M. 1990. The similarity of phenotypic effects caused by Xp and Xq deletions in the human female: a hypothesis. *Hum Genet* 85: 175-83
- Therman E, Susman M. 1993. Human Chromosomes. 3<sup>th</sup> ed. Springer-Verlag New York. 165-202
- Thomas NS, Collins AR, Hassold TJ, Jacobs PA. 2000. A reinvestigation of non-disjunction resulting in 47,XXY males of paternal origin. *Eur J Hum Genet* 8: 805-8
- Thomas NS, Ennis S, Sharp AJ, Durkie M, Hassold TJ, Collins AR, Jacobs PA. 2001. Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factors. *Hum Mol Genet* 10: 243-50
- Tilford CA, Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Rozen S, Brown LG, Rosenberg M, McPherson JD, Wylie K, Sekhon M, Kucaba TA, Waterson RH, Page DC. 2001. A physical map of the human Y chromosome. *Nature* 409: 943-5
- Toder R, Glaser B, Schiebel K, Wilcox SA, Rappold G, Graves JAM, Schempp W. 1997. Genes located in and near human pseudoautosomal region are located in the X-Y pairing region in dog and sheep. *Chromosome Res* 5: 1-6
- Toder R, Graves JAM. 1998. CSF2RA, ANT3 and STS are autosomal in marsupials: implications for the origin of the pseudoautosomal region of mammalian sex chromosomes. *Mamm Genome* 9: 373-6
- Torchia BS, Call LM, Migeon BR. 1994. DNA replication analysis of *FMR1*, *XIST*, and factor 8C loci by FISH shows nontranscribed X-linked genes replicate late. *Am J Hum Genet* 55:96-104
- Tsezou A, Hadjiathanasiou C, Gourgiotis D, Galla A, Kavazarakis E, Pasparaki A, Kapsetaki M, Sismani C, Theodoridis C, Patsalis PC, Moschonas N, Kitsiou S. 1999. Molecular genetics of Turner syndrome: correlation with clinical phenotype and response to growth hormone therapy. *Clin Genet* 56: 441-6
- Tsuchiya K, Reijo R, Page DC, Disteche CM. 1995. Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 57: 1400-7
- Tsuchiya KD, Willard HF. 2000. Chromosomal domains and escape from X inactivation: comparative X inactivation analysis in mouse and human. *Mamm Genome* 11: 849-54
- Turner C, Dennis NR, Skuser DH, Jacobs PA. 2000a. Seven ring (X) chromosomes lacking the *XIST* locus, six with an unexpectedly mild phenotype. *Hum Genet* 106: 93-100
- Turner G. 1996. Intelligence and the X chromosome. *Lancet* 347: 1814-15
- Turner JMA, Mahadevaiah SK, Benavente R, Offenbergh HH, Heyting C, Burgoyne PS. 2000b. Analysis of male meiotic “sex body” proteins during XY female meiosis provides new insights into their functions. *Chromosoma* 109: 426-32
- Turner JMA, Burgoyne PS, Singh PB. 2001. M31 and macroH2A1.2 colocalize at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *J Cell Sci* 114: 3367-75
- Turner JMA, Mahadevaiah SK, Elliot DJ, Garchon HJ, Pehrson JR, Jaenish R, Burgoyne PS. 2002. Meiotic sex chromosome inactivation in male mice with targeted disruptions of *Xist*. *J Cell Sci* 115: 4097-4115
- Tzancheva M, Kaneva R, Kumanov P, Williams G, Tyler-Smith C. 1999. Two male patients with ring Y: definition of an interval in Yq contributing to Turner syndrome. *J Med Genet* 36: 549-53

- Uehara S, Nata M, Obara Y, Niinuma T, Funato T, Yajima A. 1997. A Turner syndrome woman with a ring X chromosome [45,X/46,X,r(X)(p22.3q27)] whose child also had a ring X chromosome. *Fertil Steril* 67: 576-9
- Uehara S, Sato K, Hashiyada M, Obara Y, Matsuzaki S, Nata M, Okamura K. 2001. X chromosome inactivation patterns in 45,X/46,XX mosaics. *J Hum Genet* 46: 126-31
- Udler Y, Kauschansky A, Yeshaya J, Freedman J, Barkai U, Tobar A, Okon E, Halpern GJ, Shohat M, Legum C. 2001. Phenotypic expression of tissue mosaicism in a 45,X/46,X,dicY(q11.2) female. *Am J Med Genet* 102: 318-23
- Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Mamada M, Kaji M, Yamada C, Momio T, Nakahata T. 2002. Parental origin of normal X chromosomes in Turner syndrome patients with various karyotypes: implications for the mechanism leading to generation of a 45,X karyotype. *Am J Hum Genet* 111: 134-139
- Van Dyke DL, Wiktor A, Palmer CG, Miller DA, Witt M, Babu VR, Worsham MJ, Roberson JR, Weiss L. 1992. Ullrich-Turner syndrome with a small ring X chromosome and presence of mental retardation. *Am J Med Genet* 43: 996-1005
- Vázquez Mena O. 2002. Identificación y análisis de marcadores microsatélite en una población mexicana. Tesis. Centro de Investigación y Tecnología Avanzada IPN. México.
- Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei K, Wang L, Wang XS, Brownell AG, Jengh SM, Healy KE. 2000. Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants *in vivo*. *J Biol Chem* 275: 41263-72
- Velagaleti GVN, Tharapel SA, Martens PR, Tharapel AT. 1997. Rapid identification of marker chromosomes using primed in situ labeling (PRINS). *Am J Med Genet* 71: 130-133.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-51.
- Vermeesch JR, Petit P, Kermouni A, Renaud JC, Van Den Berghe H, Marynen P. 1997. The IL-9 receptor gene, located in Xq/Yq pseudoautosomal region, has an autosomal origin, escapes X inactivation and is expressed from the Y. *Hum Mol Genet* 6: 1-8
- Villamar M, Fernández E, Ayuso C, Ramos C, Benítez J. 1990. Study of the parental origin of sexual aneuploidy in ten families using RFLPs. *Ann Genet* 33: 29 - 31
- Villeneuve AM, Hilliers KJ. 2001. Whence meiosis? *Cell* 106:647-50
- Vogt P, Edelmann A, Kirch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, et al. 1996. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 5: 933-43
- Vogt P. 1998. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidates and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 4: 739-44
- Wang W, Meadows LR, den Haan JMM, Sherman NE, Chen Y, Blokland E, Shabanowitz J, Agulnik AI, Hendrickson RC, Bishop CE, et al. 1995. Human H-Y: a male-specific histocompatibility antigen derived from the SMCY protein. *Science* 269: 1588-90
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. 2000. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* 27: 422-6
- Warren EM, Gavin E, Simpson E, Chandler P, Page C, Disteché C, Stankey K, Greenberg P, Riddell S. 2000. The human UTY gene encodes a novel HLA-B8-restricted H-Y antigen. *J Immunol* 164: 2807-14
- Waters PD, Duffy B, Frost CJ, Delbridge ML, Graves JAM. 2001. The human Y chromosome derives largely from a single autosomal region added to the sex chromosomes 80-130 million years ago. *Cytogenet Cell Genet* 92: 74-9

- Weller PA, Critcher R, Goodfellow PN, German J, Ellis NA. 1995. The human Y chromosome homologue of XG: transcription of a naturally truncated gene. *Hum Mol Genet* 4: 859-68
- Wiltshire T, Park C, Handel MA. 1998. Chromatin configuration during meiosis I prophase of spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 49: 70-80
- Witt M, Erickson RP. 1989. A rapid method for detection of Y-chromosomal material from dried blood specimens by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 82: 271-4
- Witt M, Erickson RP. 1991. A rapid method for detection of Y-chromosomal material from dried blood specimens by polymerase chain reaction [erratum]. *Hum Genet* 86: 540
- Wyckoff GJ, Li J, Wu CI. 2002. Molecular evolution of functional genes on the mammalian Y chromosome. *Mol Biol Evol* 19: 1633-6
- Wolff DJ, Brown CJ, Schwartz S, Duncan AM, Surti U, Willard HF. 1994. Small marker X chromosomes lack the inactivation center: implications for karyotype/phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 55: 87-95
- Wolff DJ, Miller AP, Van Dyke DL, Schwartz S, Willard HF. 1996. Molecular definition of breakpoints with human Xq isochromosomes: implications for mechanisms of formation. *Am J Hum Genet* 58: 154-60
- Wolff DJ, Schwartz S, Carrel L. 2000. Molecular determination of X inactivation pattern correlates with phenotype in women with a structurally abnormal X chromosome. *Genet Med* 2: 136-41
- Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E. 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferases gene. *Nature* 402: 187-91
- Yen PH. 1999. Advances in Y chromosome mapping. *Curr Op Obste Gynecol* 11: 275-81
- Yi H, Donohue SJ, Klein DC, McBride OW. 1993. Localization of the hydroxyindole-O-methyltransferase gene to the pseudoautosomal region: implications for mapping of psychiatric disorders. *Hum Mol Genet* 2: 127-31
- Yin H, Cukurkan S, Betzendahl I, Adler ID, Eirchenlaub-Ritter U. 1998. Trichlorfon exposure, spindle aberrations and nondisjunction in mammalian oocytes. *Chromosoma* 107: 514-22
- Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Sasaki H, Momoi T, Furusho K. 1997. PCR-based detection of mosaicism in Turner syndrome patients. *Hum Genet* 99: 62-5.
- Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Uematsu A, Sasaki H, Momoi T, Kaji M, Yamanaka C, Furusho K. 1998. Uniparental and functional X disomy in Turner syndrome patients with unexplained mental retardation and X derived marker chromosomes. *J Med Genet* 35: 539-44
- Yoshida K, Sugano S. 1999. Identification of a novel protocadherin gene (PCDH11) on the human XY homology region in Xq21.3. *Genomics* 62: 540-3
- Zinn AR, Page DC, Fisher EMC. 1993. Turner syndrome: the case of the missing sex chromosome. *Trends Genet* 9: 90-3
- Zinn AR, Tonk VS, Chen Z, Flejter WL, Gardner HA, Guerra R, Kushner H, Schwartz S, Sybert VP, Van Dyke DL, Ross JL. 1998. Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-22.1. *Am J Hum Genet* 63: 1757-1766