

11282



"Análisis de Secuencias del Cromosoma Y en las Diferentes Estirpes Celulares de las Gónadas en Pacientes con Hermafroditismo Verdadero"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS
P R E S E N T A

M. en C. Gloria Eugenia Queipo García

Asesor de Tesis:
Dra. Susana Kofman E.



México, Distrito Federal

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

Hospital General de México

Servicio de Genética

**“Análisis de Secuencias del Cromosoma Y
en las Diferentes Estirpes Celulares de las
Gónadas en Pacientes con
Hermafroditismo Verdadero”**

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias
presenta:

M. en C. Gloria Eugenia Queipo García

Asesor: Dra. Susana Kofman-Epstein

México, Distrito Federal

2004

Comité tutorial

Dra. Susana Kofman E.

Dr. Fabio Salamanca

Dr. Juan Pablo Méndez

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gloria E. Quiroga
gancub

FECHA: 10 01 04

FIRMA: Gloria E. Quiroga

Agradecimientos

- Al Departamento de Genética del Hospital de México por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este trabajo.
- A mi tutora la Dra. Susana Kofman por su apoyo para la realización de este proyecto.
- Este trabajo de tesis se realizó bajo el financiamiento de CONACyT a través del proyecto G-28494-M.

Dedicatoria

A mis hermanos Paco y Gabo.

Contenido

1. Antecedentes	2
1.1. SRY	4
1.2. Origen y desarrollo gonadal	10
1.3. Estirpes Celulares	11
1.3.1. Células de Sertoli	11
1.3.2. Células de Leydig	16
1.3.3. Células Germinales	17
1.4. Síndromes de Reversión Sexual	18
<hr/>	
2. Justificación	21
<hr/>	
3. Objetivos	22
<hr/>	
4. Sujetos y Métodos	23
4.1. Extracción de DNA	26
4.2. Extracción de DNA en tejido embebido en parafina	27
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
4.4. Purificación de los productos de PCR	31
4.5. Análisis de secuencias del gen SRY	32
4.6. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH)	32
<hr/>	
5. Resultados	35
5.1. Estudio Citogenética	35
5.2. Análisis por PCR del gen SRY	35
5.3. Análisis por PCR de otras secuencias del cromosoma Y	36
5.4. Secuenciación del gen SRY	41
5.5. Análisis por FISH	43
<hr/>	
6. Discusión	51
<hr/>	
7. Referencias	59

Antecedentes

La diferenciación sexual es uno de los fenómenos biológicos de mayor trascendencia ya que permite la perpetuación de las especies con reproducción sexual. En el humano la diferenciación sexual se produce en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica (Kofman-Alfaro y cols, 1982).

La etapa cromosómica se inicia al momento de la fertilización, cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza un óvulo que aporta un cromosoma X. De esta forma se establece el dimorfismo sexual que caracteriza a los mamíferos, en los cuales la hembra presenta un complemento cromosómico sexual XX y el macho XY. La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma de un individuo (Muller, 1994; Ford y cols., 1959).

El desarrollo temprano de la cresta urogenital hacia la gónada indiferenciada y posteriormente la gónada funcional depende de la expresión e interacción de genes que actúan sobre las diferentes estirpes celulares que la integran. Aun cuando el esquema molecular que caracteriza a la diferenciación sexual en mamíferos no se ha dilucidado totalmente, el estudio de los genes participantes

se clasifica en tres grupos de acuerdo con su estructura y el momento en que ejercen su acción (Swain y cols., 1999).

El primer grupo de genes es el que codifica los factores de transcripción tales como: **SF1** (Morohasi y cols., 1993; Luo y cols., 1994), **WT1** (Kriedberg, 1993; Reddy y cols., 1996), **LIM1** (Shwalot y cols., 1995), **Emx2** (Miyamoto y cols., 1997), **GATA4** (Tevosian y cols., 2002), M33 (Catan-Fuki y cols., 1998), **DMTR1** (Raymond y cols., 1998). Estos genes están involucrados en algunos de los diferentes procesos de diferenciación temprana y aunque no actúan de manera consecutiva ni necesariamente entre ellos, participan desde la diferenciación de la cresta genital hasta la diferenciación de las estirpes celulares específicas de las gónadas y estructuras relacionadas.

El segundo grupo de genes está representado principalmente por genes determinantes de testículo de la familia SOX (SRY-type HMG BOX), como **SRY** (Berta y cols., 1990; Gubbay y cols., 1990), **SOX9** (Kent y cols., 1996; Da Silva y cols., 1996) y otros, que tienen la función específica de promover el desarrollo testicular.

El tercer grupo génico, específicamente **DAX1** y **WNT4**, genes sensible a dosis que participan como antagonistas del desarrollo testicular y probablemente

promoviendo el desarrollo del ovario (Figura1) (Swain y cols., 1998; Vaino y cols., 1999).

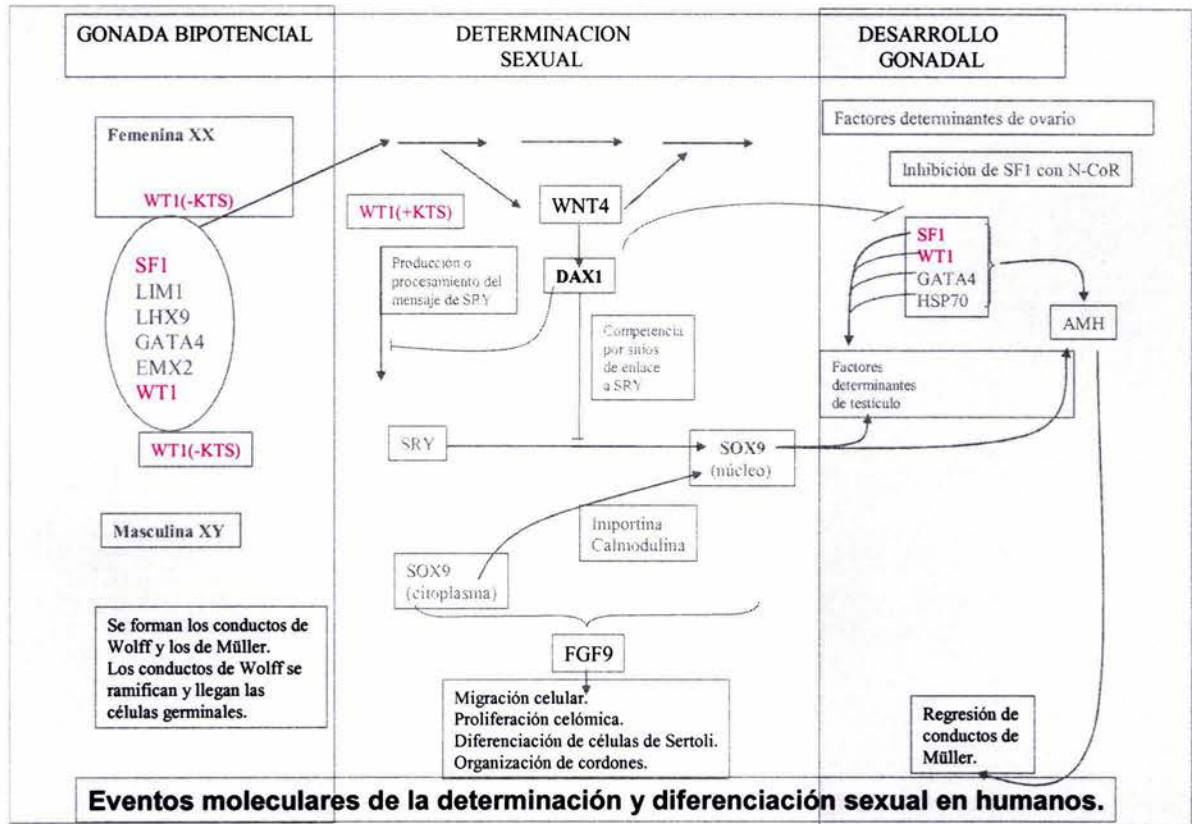


Figura 1: Genes y eventos que participan en las diferentes etapas del desarrollo gonadal

SRY

El dimorfismo gonadal se inicia en la sexta semana de la vida intrauterina. En presencia de cromosoma Y, la gónada primitiva se transformará en testículo por acción del Factor Determinante Testicular (FDT) localizado en el brazo corto del cromosoma Y; en ausencia de FDT como ocurre en los productos 46,XX, la gónada primitiva evolucionará hacia ovario (Welshons y cols., 1959; Gubbay y

cols., 1992). En 1990 se identificó en el humano el gen SRY localizado en Yp11.3. Este gen es capaz de inducir la transformación de la gónada primitiva hacia testículo y se encuentra conservado en las diferentes especies de mamíferos (Lovell-Badge y cols., 1990; Sinclair y cols., 1990; Jeske y cols., 1995; Hacker y cols., 1995). Mutaciones o deleciones de Sry en ratón (Y^{Tdyml}) ocasionan síndromes de reversión sexual (Lovell-Badge y cols., 1990; Cameron y cols., 1997) indicando su participación crítica en la determinación testicular. En el ratón, el gen Sry se expresa en la porción gonadal de la cresta urogenital entre los días 10.5 y 12 d.p.c., precediendo la divergencia histológica hacia ovario o testículo. La expresión de SRY se considera un "*switch* génico" que inicia los cambios celulares en la gónada indiferenciada hacia el desarrollo del testículo (Figura 2). Para que todos estos cambios celulares sucedan de forma ordenada, la expresión de este gen debe ocurrir en un periodo específico del desarrollo, ya que su acción fuera del momento indicado conlleva a la pérdida de su función (Hacker y cols., 1995; Lovell-Badge 1992), resultando en un desarrollo testicular anormal.

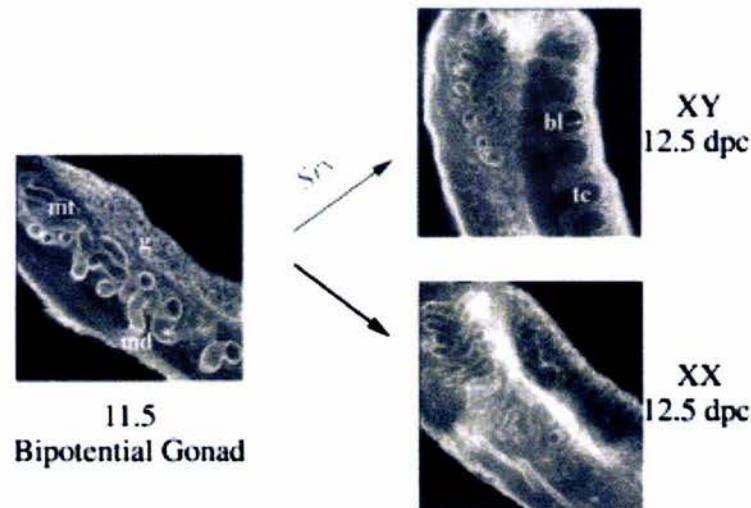


Figura 2: Efecto del gen Sry sobre la gónada bipotencial. Imágenes confocal a los 11.5 y 12.5 d.p.c, la expresión de Sry en la gónada XY induce la proliferación del epitelio gonadal, la migración y población de células de Sertoli con la formación de los cordones testiculares (tc). Estos cambios no se observan en la gónada XX (Capel y cols., 2000).

Estructuralmente el gen SRY consta de un solo exón, carece de intrones y los transcritos originados son de 1.1 kb. El marco abierto de lectura (ORF) es de 614 pares de bases (pb) y codifica para una proteína de 204 aminoácidos con un peso molecular de 23.9 kD (Capel, 1998). La proteína SRY tiene un dominio conservado de alta movilidad HMG (**H**igh **M**obility **G**roup), considerado como el elemento indispensable para su función al actuar como regulador de la transcripción en otros genes (Goodwin y cols., 1973). No se ha identificado ningún tipo de polimorfismo asociado a esta región (HMG), a diferencia de las regiones localizadas fuera de este sitio que comparten poca homología entre las diferentes especies (Capel, 1998; Sinclair y cols., 1990). Ejemplo de esto es la estructura C-terminal de la proteína Sry en el ratón *Mus musculus* que consta de una región rica en glutamina. Deleciones parciales o totales de este segmento impiden la expresión y función del gen, lo que implica que en el ratón esta región

contiene algunos de los elementos reguladores necesarios para su expresión. Por el contrario en el humano este tracto de poliglutaminas no ha sido identificado lo cual sugiere que los mecanismos reguladores son diferentes entre estas especies (Bowles y cols., 1999).

Con respecto a la función, estudios *in vitro* mostraron que la interacción con el DNA requiere la participación de toda la proteína y no únicamente del dominio HMG, esta unión depende de varios factores como son las interacciones SRY proteína-proteína, las cuales favorecen la unión con el DNA (Baud y cols., 2002). Estos mismos aspectos fueron estudiados en el DNA de un paciente con reversión sexual y mutación en SRY, donde la unión al DNA mantenía las mismas características, sin embargo se abolieron las interacciones proteína-proteína afectando la función del gen.

Las proteínas HMG abarcan un grupo heterogéneo de componentes no histónicos del nucleosoma que tienen la capacidad de unir secuencias consenso del DNA (AACAAAT). SRY posee la característica de unir sitios específicos en la curvatura menor del DNA, induciendo un plegamiento organizado de la estructura de la cromatina, facilitando de esta forma el ensamblaje de complejos nucleoprotéicos (Ferrari y cols., 1992). El plegamiento en el DNA da como resultado una yuxtaposición de otros factores de transcripción unidos a sitios distantes,

generando de esta forma activación o represión de la transcripción de genes blanco (Pontiggia y cols., 1994; Grosschedl y cols., 1994).

Los experimentos en ratones transgénicos han aportado datos interesantes sobre la regulación y participación de Sry en la diferenciación sexual de mamíferos. La presencia de Sry en algunos animales transgénicos XX induce el desarrollo testicular y reversión sexual completa (Lovell-Badge y cols., 1990; Eicher y cols., 1995). Si se controla la regulación en la expresión de Sry, la severidad de la reversión es variable, esto ocurre si se modifica la concentración del transcrito o el momento de su expresión durante el desarrollo. Estos datos muestran los siguientes hechos: el primero es que Sry es capaz de activarse en animales transgénicos XX lo cual sugiere que todos los genes necesarios para la activación de este factor se encuentran presentes en un ambiente genético XX. En segundo lugar, la expresión de Sry crea un umbral crítico para la determinación sexual el cual es altamente sensible a efectos de dosis y de tiempo.

SOX9 es el segundo gen clave en la determinación testicular, pertenece a la familia de genes SOX (SRY-type HMG BOX) se localiza en el cromosoma 17q24.1 y su estructura está conservada en los vertebrados. Al igual que SRY consta del dominio HMG clásico en esta familia, SOX9 se considera el blanco inmediato de SRY ya que co-expresa con SRY en la célula de Sertoli y la expresión de este gen depende de la presencia de SRY, eventos que suceden únicamente en la gónada

masculina (Capel y cols., 2000). El efecto de este gen es sensible a dosis, ya que se ha observado que duplicaciones en pacientes así como también en animales transgénicos para SOX9 ocasionan reversión sexual (Huang y cols., 1999).

Algunas alteraciones de la diferenciación sexual han sido asociadas con mutaciones en el gen SRY. En 10-20% de los pacientes 46,XY con fenotipo femenino se han observado mutaciones de novo en el SRY. También se han reportado algunos casos familiares, donde el padre sano posee una mutación en el gen SRY que cuando la hereda a alguno de sus hijos 46,XY este expresa la mutación y se observa una disgenesia gonadal pura con fenotipo femenino. La explicación a estos sucesos sugieren la presencia de un mosaico germinal en el padre con penetrancia variable de la mutación (Jordan B y cols., 2002).

La caracterización de algunas mutaciones de SRY en pacientes con reversión sexual 46,XY han permitido identificar los sitios críticos de interacción con el DNA (Pontigia y cols, 1994). Aunque el efecto crítico del gen SRY ocurre en la determinación gonadal, éste se expresa en otros sitios además de la gónada incluyendo algunas regiones del sistema nervioso central, sugiriendo que tiene funciones diferentes a la determinación testicular.

Origen y desarrollo gonadal

La gónada primitiva se desarrolla a partir de un derivado mesodérmico denominado cresta urogenital (CUG), esta estructura se encuentra localizada en la cavidad celómica entre los primordios de las extremidades

En el ratón el desarrollo de la CUG se inicia a los 9.5 d.p.c., con la formación de tres estructuras embrionarias características: el pronefros en la región anterior, el mesonefros en la superficie ventro-medial de donde emergerán las gónadas y las glándulas suprarrenales, por último en la parte posterior o metanéfros se desarrollarán los primordios que darán origen a riñones. Tanto en los fetos XX como en los XY, a los 10 d.p.c. estas estructuras embrionarias cuentan ya con las diferentes estirpes celulares indiferenciadas, estas líneas son bipotenciales y pueden diferenciarse tanto hacia la vía masculina o femenina (Koopman y cols., 1990; Palmer y Burgoyne., 1991^a; Albrect y cols., 2001) (Figura 3).

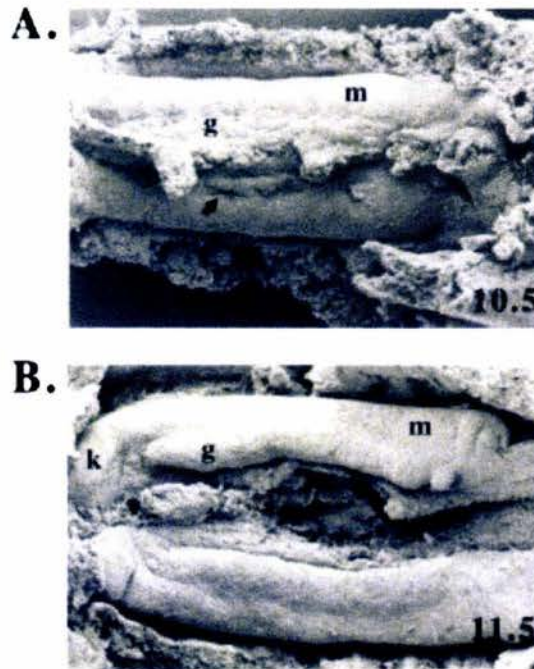


Figura 3: Micrografía electrónica de las diferentes regiones de la crestaurogenital a los 10.5 d.p.c. En la región mesonéfrica de la cresta urogenital se identifica el primordio gonadal (g), el riñón (k) se localiza en el metanefros.

Estirpes Celulares

Célula de Sertoli

En 1991 Burgoyne y cols. realizaron estudios encaminados a caracterizar las células que participan en el desarrollo gonadal, para ello analizaron el genotipo de las células en diferentes órganos de ratones quiméricos XX/XY y encontraron que la proporción de células XX y XY era similar y constante. Sin embargo, en la mayoría de estas quimeras la gónada primitiva evolucionó hacia testículo, donde 90% de las células de Sertoli presentaba un genotipo XY a diferencia del resto de las estirpes celulares que mostraban una proporción 50% XX: 50% XY. Estos datos señalaron por primera vez que la célula de Sertoli es fundamental para la

diferenciación testicular y que ésta es la única célula en la cual SRY ejerce un efecto crítico (Palmer y Burgoyne, 1991).

La expresión de Sry en el primordio gonadal masculino ocasiona que los precursores de las células somáticas de sostén se diferencien a células de Sertoli, mientras que en ausencia de Sry estas se diferencian a células foliculares.

Actualmente se sabe que la célula de Sertoli tiene un papel fundamental en el desarrollo testicular, ya que es la encargada de dirigir la migración y diferenciación de otras células. Por esta razón es importante conocer el origen de esta estirpe celular, habiéndose sugerido dos fuentes de células de Sertoli: el epitelio celómico y el mesonefros. El origen celómico ha sido apoyado por los estudios de marcaje (con colorante rojo Dil), que se basa en marcar las células indiferenciadas del epitelio celómico, los resultados mostraron que antes de los 11.5 d.p.c. el epitelio contribuye con dos estirpes celulares, el linaje que se diferenciará a Sertoli (Karl y Capel, 1998) y otro de células intersticiales aunque no bien caracterizadas. Ensayos para observar a las células epiteliales en división utilizando bromodeoxiuridina (BrdU), corroboraron la observación previa ya que de los 11.5 a los 12.5 d.p.c. el epitelio celómico es altamente proliferativo. En base a esto, durante el desarrollo de la gónada masculina se han identificado dos estadios de proliferación y migración celular; el primero ocurre en poblaciones celulares que expresan altas concentraciones de Sf1 y contribuyen a la

diferenciación de las células de Sertoli y la segunda etapa, ocurre después de los 12.5 d.p.c. donde las poblaciones celulares tienen pobre expresión de Sf1 y contribuirán únicamente con células intersticiales inespecíficas.

El siguiente aspecto que se estudió fue determinar si los patrones de proliferación epitelial dependían de la expresión de Sry y para esto se observó la proliferación en las células epiteliales de gónadas XX^{Sry} . De manera interesante la proliferación epitelial en estos animales seguía el mismo patrón que el observado en las gónadas XY. Por el contrario en el análisis de las gónadas en los ratones $B6XY^{pos}$ (Y con un alelo débil de Sry) se encontró que la proliferación del epitelio era mucho menor; además en estos animales había desarrollo tanto de ovarios como de ovotestes. De estos datos experimentales se concluyó que Sry induce sobre regulación de la proliferación celular en el epitelio celómico del testículo en desarrollo.

Datos recientes han mostrado que Sry no tiene un patrón de expresión específico en las células del epitelio celómico (Bullejos y Koopman, 2001; Albrecht y cols., 2001). En base a este hallazgo, se propone que las células precursoras de Sertoli, en donde se expresa y actúa Sry, se encuentran localizadas por debajo de epitelio celómico y estas células tienen un efecto directo induciendo la proliferación y migración del epitelio celómico reclutando células Sry negativas.

En el ratón, la célula de Sertoli diferenciada aparece a los 11.5 d.p.c. coincidiendo con la expresión de Sry, lo que inicia una serie de cambios característicos en la gónada masculina al incrementar la proliferación de las células precursoras de Sertoli y movilizar otras estirpes tales como las células peritubulares miodes y endoteliales (Martineau y cols, 1997; Kart y Capel, 1998; Tilman y cols, 1999; Capel, 2000). Inicialmente, la vasculatura gonadal es similar en ambos sexos, la expresión de Sry inicia la divergencia vascular con la formación del vaso celómico, marcador morfológico masculino temprano. Esta arteria será la encargada de diferenciar el sistema vascular masculino, los cambios vasculares que ocurren en el testículo en desarrollo involucran vías de señalización específicas del endotelio, principalmente aquellas en donde participa la epinefrina-B2, B4 y su receptor así como la vía de señalización de los receptores Notch, específicamente Notch-1 y Jagged-2. Estos marcadores endoteliales masculinos serán los encargados de desarrollar el sistema vascular y linfático del testículo. La correcta migración y organización vascular garantizan la secreción de testosterona, garantizando la diferenciación fenotípica del embrión en desarrollo (Brennan y cols, 2002).

Estos cambios morfológicos en el testículo en desarrollo ocasionan que la célula de Sertoli diferenciada rodee a las células germinales y forme los cordones testiculares, mientras que las células peritubulares mioides forman una lámina basal donde reposarán los túbulos seminíferos. Esta organización morfológica

relega a la célula de Leydig hacia el espacio intersticial y esta es la arquitectura celular que se encuentra en los testículos de los vertebrados (Tilman y Capel, 1998) (Figura 4).

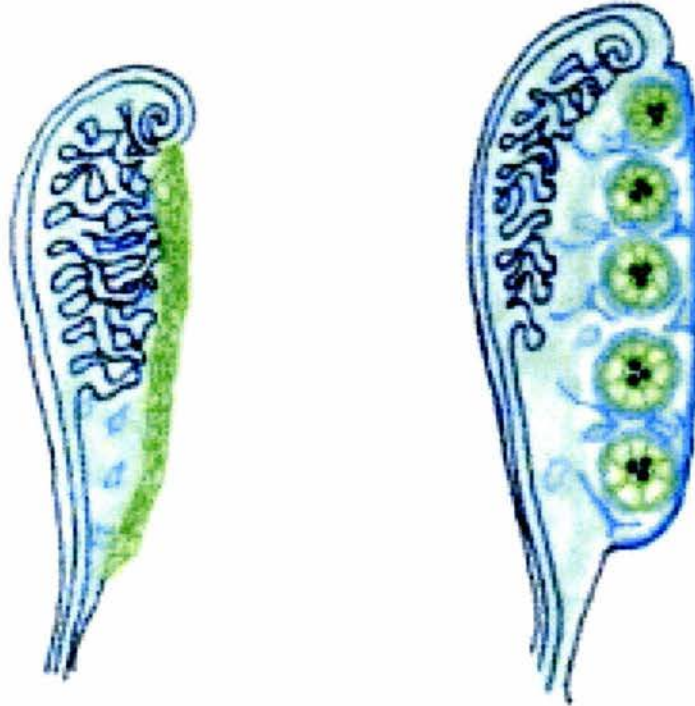


Figura 4: Esquema de los cambios morfológicos inducidos por la expresión de Sry en la gónada masculina. Los precursores de las células peritubulares miodes (azul claro) migran hacia la gónada, las células de soporte (verde) rodean a las células germinales (negro) dentro de los cordones testiculares. El tejido endotelial prolifera a partir del mesonefros únicamente en la gónada XY (Tilman y cols., 1999).

La célula de Sertoli además de organizar la formación de los cordones testiculares, será la encargada de producir la hormona inhibidora de Mullerianos (HIM) que ejercerá su acción principal en la etapa fenotípica de la diferenciación sexual masculina (Teixeira y cols., 1996).

Célula de Leydig

El mesonefros contribuye con varias de las estirpes celulares del testículo como son: células de Leydig, células peritubulares mioideas y células vasculares (Merchant-Larios y cols., 1993). Estas células migran desde el mesonefros a las gónadas XY a partir del 11.5 d.p.c. hasta los 16.5 d.p.c., este movimiento representado por estas tres estirpes (Martineau y cols., 1997) depende de la expresión de Sry (Albrecht y cols., 2000). Sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado ningún gen que regule o intervenga en la diferenciación de la célula de Leydig y aunque Wnt4 ha sido propuesto como un gen represor de la diferenciación de esta estirpe celular todavía no se han identificado otros factores involucrados. Recientemente se mostró que la vía de señalización DHH/PTCH1 interviene en la diferenciación de la célula de Leydig sobre regulando a SF1 (Yao y cols., 2002).

El producto hormonal de la célula de Leydig diferenciada es la testosterona (T) que ejercerá su acción autócrina en la gónada y parácrina en la etapa fenotípica ya que participa en el desarrollo de los conductos Wolffianos. Además, esta hormona se bioconvierte a dihidrotestosterona por acción de la 5 α -reductasa que viriliza los genitales externos (Huhtaniemi, 1994; Imperato-Mcginley y cols., 1994).

Células Germinales Primordiales (CGP)

Las CGP en machos y hembras se forman en la base del alantoides a los 7.5 d.p.c., migran a través del mesenterio intestinal primitivo y llegan a colonizar la gónada en el momento en que esta se está formando (10 d.p.c.) (Gisburg y cols., 1990; Gomperts y cols., 1994).

El desarrollo de las células CGP depende de su localización en la gónada en el momento en que ésta entra en la ruta de determinación masculina o femenina e independientemente de si la gónada es XX o XY (MacLaren, 1995). En ausencia de células de Sertoli y por lo tanto de cordones testiculares, las CGP entrarán a meiosis a los 13.5 d.p.c. En el ovario, estas se detienen en la primera profase meiotica y permanecerán así hasta que inicien los ciclos ovulatorios (McLaren y Southee, 1997; McLaren, 2000). En las gónadas XX la presencia de estas células es crítica ya que son necesarias para la diferenciación de las células foliculares, en ausencia de CGP los folículos no se diferenciarán y el tejido ovárico se degenerará resultando en una estría fibrosa (Huang y cols., 1993; Bedel y cols., 1995).

En contraste con lo que ocurre en el ovario, la diferenciación de la célula de Sertoli y la formación de los cordones testiculares no dependen de la presencia de CGP ya que en su ausencia de estas los CT se formarán normalmente. Al diferenciarse la célula de Sertoli, las CGP quedan secuestradas dentro de los CT y

se detendrán en mitosis después de los 13.5 d.p.c. (Kurohmaru y cols., 1992; McLaren y Southee, 1997).

Síndromes de Reversión Sexual

Hermafroditismo Verdadero

Anomalías en la determinación gonadal ocasionan los síndromes de reversión sexual que se definen como la discordancia entre el sexo cromosómico y el sexo gonadal. Entre estos podemos considerar la disgenesia gonadal pura XY, el varón XX y el hermafroditismo verdadero (Grumbach y cols., 1998).

El hermafroditismo verdadero (HV) se caracteriza por el desarrollo de tejido testicular y ovárico en un mismo sujeto (Berkovitz y cols, 1982). Ambos tipos de órganos pueden coexistir en una sola gónada denominada ovotestes o de manera separada. El HV se clasifica en alternante (testículo de un lado y ovario del otro), unilateral (ovotestes de un lado y testículo u ovario del otro lado) y bilateral (ovotestes en ambos lados). La gónada que se observa con mayor frecuencia es el ovotestes y puede encontrarse en forma termino-terminal (tejido ovárico y testicular bien delimitados) o imbricado. La localización de las gónadas también es variable, pueden situarse intrapélvicas, inguinales o labioescrotales, dependiendo de la cantidad de tejido ovárico y testicular presente (Van Niekerk y cols., 1981). En la gran mayoría de los casos el ovario y la porción ovárica del ovotestes son funcionales y en la vida adulta puede presentarse incluso

ovulación. Clínicamente existe ambigüedad genital y desarrollo variable de estructuras mullerianas y wolffianas. En la mayor parte de los casos el útero está presente (Berkovitz y cols., 1982).

El HV es una anomalía genéticamente heterogénea: 60% de los casos son 46,XX, 33% presentan 46,XX con una segunda línea celular con cromosoma Y normal o anormal u otros mosasicos y el 7% restante es 46,XY (Krob y cols., 1994). En los casos con cromosoma Y, éste puede explicar la presencia de tejido testicular sin embargo, aun no se ha podido determinar la etiología en la mayoría de los casos con HV 46,XX. Estudios moleculares han revelado que 10% de los pacientes HV 46,XX presentan SRY en su genoma debido a un intercambio desigual entre el cromosoma X y el Y durante la meiosis paterna y en el 90% restante (46,XX SRY negativo) se han sugerido mutaciones en genes autosómicos o ligados al X que participan en la determinación gonadal (Ramsay y cols., 1998; Mc Elreavey y cols., 1993). Recientemente se han propuesto varios mecanismos que conducen al desarrollo de tejido ovárico y testicular en un mismo individuo: 1) se identificaron mutaciones puntuales en la región codificante de SRY en tres casos esporádicos de HV con cariotipo 46,XY (Braun y cols., 1993; Hiort y cols., 1995; Maler y cols., 2003), 2) se reconoció una duplicación en 22q en un HV 46,XX-SRY negativo (Aleck, 1999), 3) se han informado mosaicos para SRY en dos casos de HV 46,XX, SRY negativo en sangre periférica y positivo en tejido gonadal (Hadjathanasiou, 1994; Inoue, 1998). Nuestro grupo describió un tercer HV

46,XX SRY negativo en DNA obtenido de sangre periférica y en células de mucosa oral, pero positivo y parcialmente deletado en DNA obtenido de la porción testicular del ovotestes (Jiménez y cols., 2000).

En este trabajo se realizó el análisis molecular del gen SRY y otras secuencias derivadas del cromosoma Y en sangre periférica y en ambos tejidos gonadales en 13 HV con diferentes cariotipos, para tratar de identificar los mecanismos genéticos que participan en esta alteración.

Justificación

Los procesos por los cuales se lleva a cabo la determinación y diferenciación gonadal en el humano no se encuentran bien identificados. En ocasiones los resultados obtenidos entre los modelos animales y las observaciones realizadas en humano han sido discordantes, sugiriendo que pueden existir diferencias en la regulación o en los mecanismos de acción de los genes que participan en estos eventos.

Por las características de las gónadas, el HV es un modelo biológico adecuado que permite analizar de forma retrospectiva algunos de los mecanismos previamente descritos en modelos animales involucrados en el desarrollo gonadal. De esta forma intentar integrar los mecanismos de acción de los genes implicados, e identificar cuales son los eventos del desarrollo gonadal en el humano.

Objetivos

- ✓ Identificar la presencia de mosaicos para secuencias específicas del cromosoma Y en DNA obtenido de linfocitos de sangre periférica y de tejido gonadal en individuos HV con diferentes cariotipos.
- ✓ Identificar anomalías en la secuencia del marco abierto de lectura para el gen SRY en los casos positivos.
- ✓ Analizar la distribución de estas secuencias en las diferentes estirpes celulares del tejido gonadal de pacientes con HV.

Sujetos y Métodos

Se estudiaron 13 pacientes con diagnóstico histológico de hermafroditismo verdadero. Los datos clínicos de los sujetos analizados se observan en la tabla 1. La evaluación clínica se realizó antes de los 2 años de edad, todos los casos fueron esporádicos, sin registró en la historia familiar de ambigüedad genital, enfermedad genética o consanguinidad. En todos los pacientes se observó ambigüedad genital de grado variable (Figura 5).

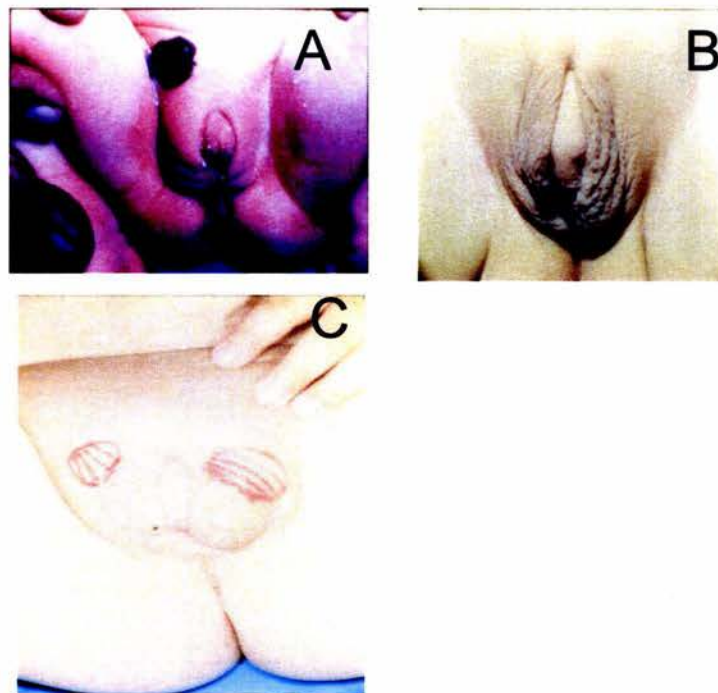


Figura 5: Imágenes de la región genital de tres pacientes incluidos en el estudio. Se muestra la ambigüedad genital variable. En la imagen C se observa señalada la localización de las gónadas.

El diagnóstico histológico de testículo fue confirmado por la presencia de túbulos seminíferos y el ovario por la presencia de folículos (Figura 6). El estudio citogenético en linfocitos se realizó mediante técnica de bandas GTG donde fueron analizadas 100 metafases en cada uno de los casos, diez pacientes presentaron cariotipo 46,XX mientras que los tres restantes fueron mosaicos con una segunda línea celular con cromosoma Y.

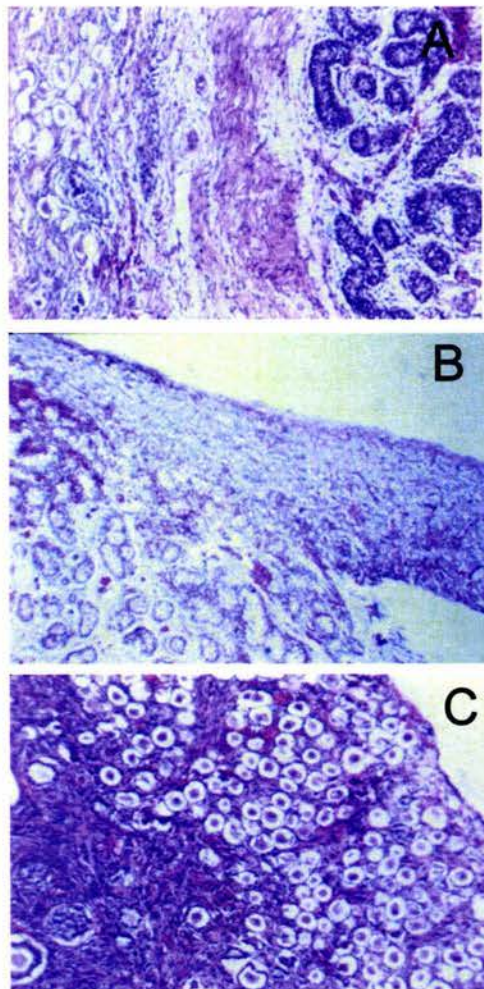


Figura 6: Tinción hematoxilina/eosina. A) Ovotestes termino terminal, del lado derecho se observan túmulos seminíferos y del izquierdo folículos primarios **B)** Parte superior se observa estroma ovárico y en la inferior túbulos seminíferos **C)** Región ovárica de ovotestes con numerosos folículos primarios.

Paciente	Sexo de asignación	Genitales externos	Cariotipo	Gónadas Derecha Izquierda
1	Femenino	Genitales ambiguos: clitoromegalia 1.8 cm.	46,XX	O OT
2	Femenino	Genitales ambiguos: falo 2 cm; Pliegues labioescrotales bifidos y fusionados.	46,XX	O OT
3	Femenino	Genitales ambiguos: falo 3 cm con cuerda tendiosa; Pliegues labioescrotales fusionados.	46,XX	OT O
4	Femenino	Genitales ambiguos: clitoromegalia 1 x 1.5 cm con hipospadias basal; pliegues labioescrotales fusionados.	46,XX**	OT O
5	Masculino	Genitales ambiguos: falo con hipospadias; gónada derecha palpable.	46,XX**	OT OT
6	Masculino	Genitales ambiguos: clitoromegalia gónadas palpables	46,XX	OT T
7	Femenino	Genitales ambiguos: falo con hipospadias; gónada derecha palpable	46,XX	OT O
8	Masculino	Genitales ambiguos: hipospadias escrotal; gónada palpable	46,XX	OT T
9	Masculino	Genitales ambiguos: clitoromegalia clitoris 1.8 cm, pliegues labioescrotales fusionados.	46,XX	OT T
10	Masculino	Genitales ambiguos: falo 2 cm	46,XX	OT T
11	Masculino	Genitales ambiguos: falo 1.9 cm; hipospadias escrotal.	45,X / 46,XY	DG OT
12	Femenino	Genitales ambiguos: falo 3 cm; pliegues labioescrotales.	46,XX / 46,XY	OT O
13	Masculino	Genitales ambiguos: falo 2 cm con pliegues labioescrotal hipospadias.	46,XX / 47,XXY	T O

O: ovario; OT: ovotestes; T: testículo; DG: gónada disgenética

**Después del análisis con FISH, el cariotipo mostró una segunda línea celular con un cromosoma Y anormal.

Tabla1: Sexo de asignación, hallazgos clínicos, citogenéticos y datos anatomopatológicos en 13 pacientes con hermafroditismo verdadero.

Extracción de DNA

El DNA genómico de los pacientes estudiados, se obtuvo siguiendo la técnica modificada y estandarizada en el laboratorio (Sambrook y cols., 1989). Se extrajeron 3ml de sangre periférica de cada sujeto, colocándose en tubos Vacutainer que contenían 0.05ml de Na₂EDTA como anticoagulante. Con el fin de lisis a los eritrocitos, la sangre se colocó en un tubo cónico y se mezcló con un volumen igual de *buffer* de lisis TTS (trisHCl/ triton X-100/ sacarosa). La mezcla se homogeneizó y transfirió a tubos de micro centrifuga de 1.5 ml, se centrifugó a temperatura ambiente durante 1.5 minutos a una velocidad de 9,221g. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 ml de TTS, centrifugándose utilizando las mismas condiciones. Este último paso se repitió hasta obtener un botón libre de eritrocitos, el paquete de leucocitos se resuspendió en 570 µl de NaCl 50mM, se agregaron 50 µl de SDS al 10% con la finalidad de lisis las membranas leucocitarias. La mezcla se agitó durante algunos minutos, para precipitar las proteínas se adicionaron 200 µl de NaCl₂ 5M, se agitó y dejó en reposo. El botón de leucocitos se centrifugó a 9,221 g durante 15 minutos a 4 °C y, el sobrenadante fue transferido a un tubo estéril. El DNA se precipitó adicionando 2.5 volúmenes de etanol absoluto (-20°), el precipitado obtenido se recolectó con una pipeta pasteur de punta curva y se lavó con etanol frío al 70%. La muestra se dejó secar a temperatura ambiente se resuspendió en un volumen entre 200 y 400 µl de agua estéril destilada y de-ionizada. Las alícuotas de DNA se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Extracción de DNA de tejido embebido en parafina

El DNA gonadal de bloques de tejido incluidos en parafina se obtuvo de acuerdo al protocolo de Banerjee y cols. (1995). Cortes de 5 μm de tejido fueron homogenados en *buffer* de digestión [50mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20], las muestras se sometieron a radiación con microondas (500W por 15 s, 2-4 ocasiones) y fueron centrifugadas a 22,000 g por 10 minutos, se retiró el anillo de parafina formado en la parte superior del tubo y la suspensión se incubó a 42 °C durante toda la noche en un *buffer* con proteinasa K (200 $\mu\text{g/ml}$). La proteinasa fue inactivada a 97 °C durante 5 minutos y el sobrenadante se utilizó como templado.

En todas las muestras obtenidas se llevó a cabo un análisis espectrofotométrico con lecturas a una longitud de onda de 260 y 280 ηm . La concentración de DNA fue calculada mediante la siguiente relación:

$$1 \text{ DO}_{260} = 50\text{mg de DNA/ml.}$$

La pureza del DNA se obtuvo mediante la relación de las densidades ópticas obtenidas con las lecturas 260/280 ηm y se consideró como óptima una relación 1.8-2.0. Para determinar la calidad de las muestras se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio al 0.0002%.

Análisis de Cromosoma Y

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó análisis de las diferentes secuencias específicas del cromosoma Y (SRY, Ycen, ZFY, PABY y Yqh), la ubicación de las diferentes regiones se observa en la figura 7. El estudio se realizó en DNA obtenido de leucocitos de sangre periférica y tejido gonadal, como control interno se amplificó la región de repetidos alfoide del centrómero del cromosoma X.

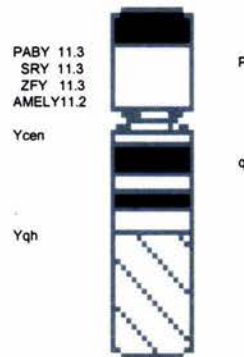


Figura 7: Ideograma del cromosoma Y indicando la ubicación de las diferentes regiones analizadas en los pacientes.

Por medio de la técnica de PCR se amplificó el marco abierto de lectura del gen SRY (615pb). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes: SRY 6F (5' GTG GTC TCG CGA TCA CA 3') XES11R (3' GTA GCC ATT GTT ACC CGA TTG TC5') que amplificó un producto de 432pb (del nucleótido 207 al nucleótido 638 con respecto al codón de inicio), XES7F (5'TGA CAA TGC AAT CAT ATG CTT CTG C 3') SRY8R (5'CTT CGG ACG AGG TCG ATA 3') amplificó un

fragmento de 380 pb (del nucleótido -140 al 240) XES10F (5'GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG C 3') SRY3R (5'TAG AGC CAT CTT GCG CCT 3') que generó un fragmento de 529pb (del nucleótido -127 al 402) XES10F (5'GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG C 3') SRY8R (5'CTT CGG ACG AGG TCG ATA 3') que amplificó un fragmento de 380 pb. La representación gráfica, el nombre utilizado, la dirección y la posición de estos oligonucleótidos con respecto al ORF del gen se muestran en la figura 8.

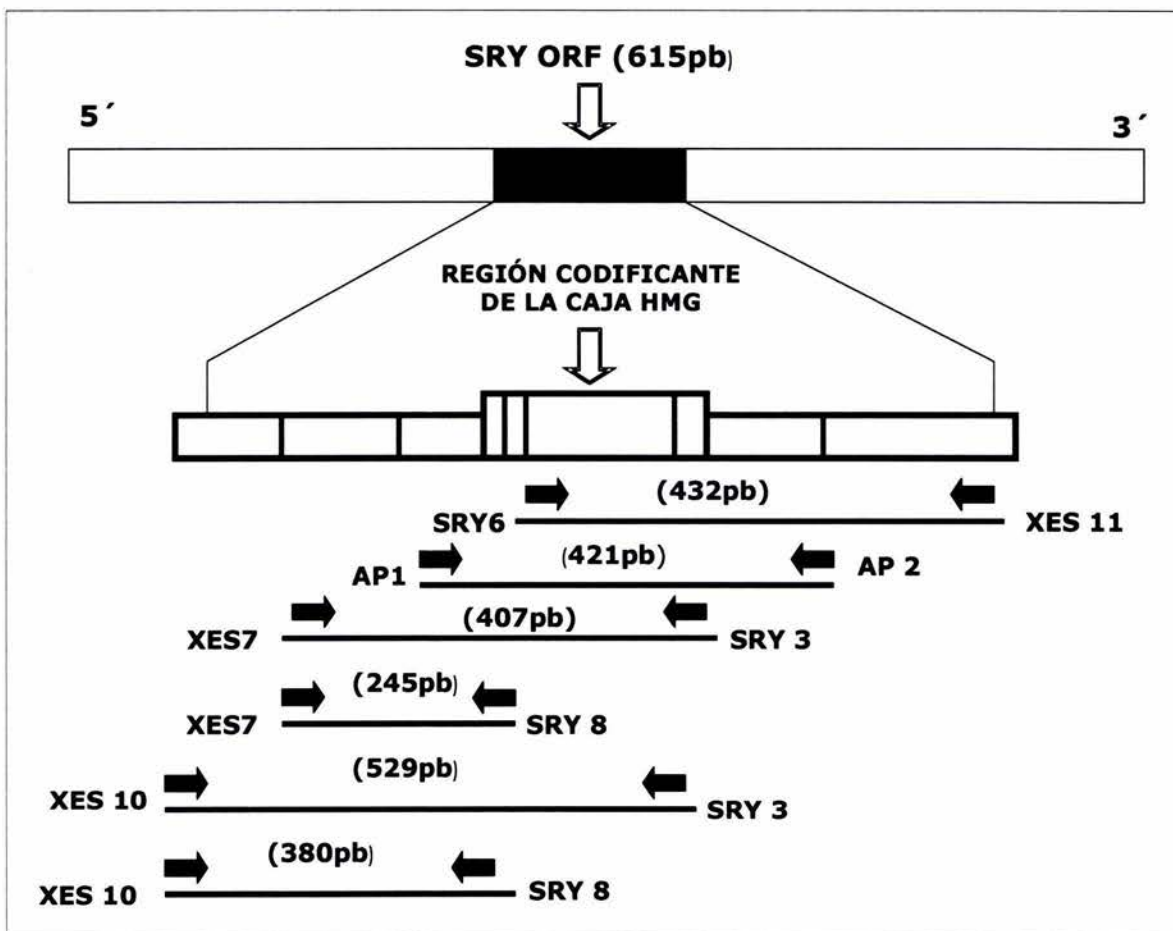


Figura 8 Representación esquemática del gen SRY indicando nombre, dirección y la posición relativa de los iniciadores utilizados en el estudio.

Las secuencias y el nombre de los pares de iniciadores utilizados para amplificar las otras secuencias específicas del cromosoma Y utilizadas se muestran en la tabla 2.

Nombre	Secuencia	Tiempo y temperatura de alineamiento	Producto amplificado
PABY Región pseudoautosómica	PABY-1: 5' - TGG GCA CTT ACA CAT AGA CGT - 3' PABY-2: 5' -CTT CTC TTT GAA GTG TAA GGA G - 3'	Tm = 62 ° C Tm = 58 ° C	250 pb
Centrómero de Y	Y1: 5' - ATG ATA GAA ACG GAA ATA TG - 3' Y2: 5' - AGT AGA ATG CAA AGG GTC CC - 3'	Tm = 52 ° C Tm = 60 ° C	170 pb
Amelogenina Y	AM1: 5' CCTACCGCATCAGTGAATTTTC-3 AM2: TCTGTATGTGGAGTACACATGG-3	Tm = 58 ° C Tm = 58 ° C	216 pb
Heterocromatina de brazo largo del Y	Y 1.1: 5' TCC ACT TTA TTC CAG GCT TGT CC-3' Y 1.2: 5' TTG AAT GGA ATG GGA ACGAAT GG-3'	Tm = 63 ° C Tm = 61 ° C	154 pb
Centrómero de X	X1: 5' -AAT CAT CAA ATG GAG ATT TG-3' X2: 5 - GTT CAG CTC TGT CAG TGA AA-3'	Tm = 52 ° C Tm = 58 ° C	130 pb

Tabla 2: Nombre, secuencia, temperatura de alineamiento y tamaño del producto amplificado de diferentes regiones del cromosoma Y y centrómero de X.

Los oligonucleotidos fueron adquiridos de una casa comercial (GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES) y llevados a una concentración final de 100 μ M. Las diferentes reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ l que incluyó: 50 η g de DNA, 100 η g de cada oligonucleótido, 80 η M de dNTPs, 1 U de taq polimerasa y 1.5 mM MgCl². La temperatura utilizada fue 94 °C (5min), 35 ciclos de 94 °C (1min), 68 °C (1min), 72 °C (2 min) y 72 °C (10 min). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador (Gene Amp PCR *System* 9700 de Perkin Elmer).

Los productos amplificados de cada reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio al 0.0002%. En todos los casos se incluyó un marcador de peso molecular, un control positivo, y un control negativo que consistió en una reacción sin DNA.

Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR a partir del gel de agarosa se realizó utilizando el *Kit* QIAEX gel *Extraction* (Qiagen,Chatsworth, CA USA). Se cortó la banda del gel con el producto amplificado, se colocó en tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se pesó y agregó *buffer* QX1 pH 7.5 y 4 μ l de la resina QX2, se agitó la mezcla, se colocó a 55 °C durante 3 minutos (en dos ocasiones consecutivas, agitando entre una y otra incubación). Una vez disuelta la agarosa esta se eliminó mediante centrifugación durante 1 minuto a 9,221 g, se decantó el

sobrenadante y el botón se resuspendió en 500 μ l de *buffer* QX 1, se agitó vigorosamente y se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas. Una vez que se decantó el sobrenadante el exceso de *buffer* se retiró con una pipeta hasta dejar únicamente el botón que contenía el DNA, el cual fue resuspendido en 500 μ l de *buffer* PE (que contiene principalmente alcohol). Se centrifugó nuevamente y se lavó con *buffer* PE; una vez que se decantó se colocó a 55 °C durante 10 minutos hasta que se seco la muestra, la cual se resuspendió en un volumen de 20 μ l con agua destilada y deionizada. Se incubó durante toda la noche a 4 °C, para centrifugarse en las mismas condiciones, el sobrenadante fue recuperado y se utilizó como templado.

Análisis de secuencia del gen SRY

Los productos de SRY obtenidos por PCR a partir de DNA genómico de leucocitos de sangre periférica y tejido gonadal fueron purificados utilizando un *kit* comercial y 3-10 ng de DNA, estos se sometieron a secuenciación directa utilizando un aparato automatizado ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

Estudio de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)

Este estudio se realizó en los pacientes 1-11, se llevó a cabo en cortes de tejido incluidos en parafina. Se utilizó una sonda locus específica de DNA para SRY (LSCI Vysis™) (Figura 9) marcada con un fluorocromo de espectro naranja, como

control interno se utilizó una sonda específica de la región centromérica del cromosoma X marcada con un fluorocromo de espectro verde (Vysis).

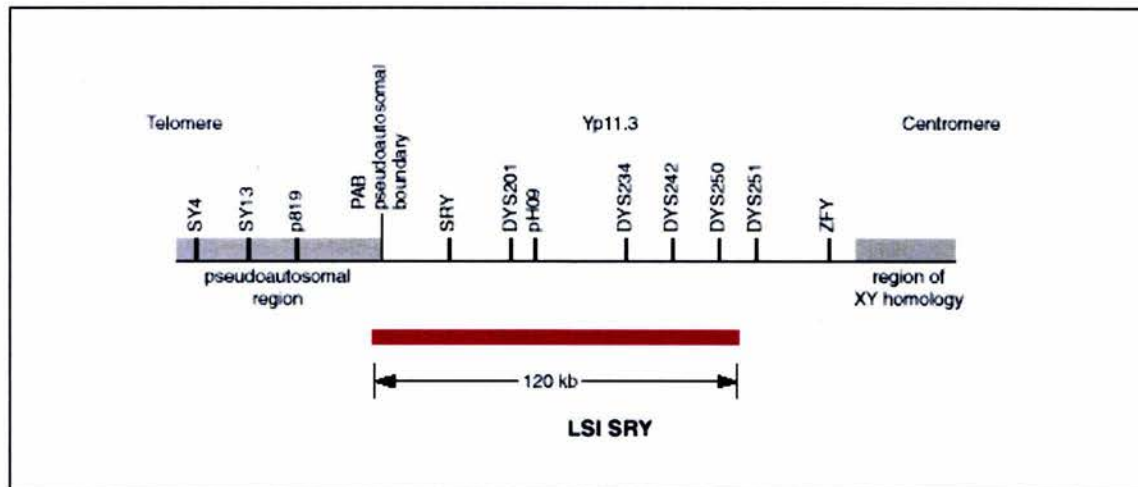


Figura 9. Esquema de la región de 120kb utilizada como sonda. La línea roja indica la localización del gen SRY y las regiones marcadoras componen la sonda.

El estudio de FISH en el tejido gonadal incluido en parafina se llevó a cabo de la siguiente manera: Cortes de 5 μ de espesor del tejido gonadal se montaron sobre laminillas cargadas positivamente (FISHER). Para la deparafinación se utilizó un Kit de casa comercial (Vysis, Inc. Downers Grove, IL), de forma inicial se realizaron tres lavados consecutivos con un detergente no iónico (Citrisolv) durante 10 minutos, posteriormente la muestra se lavó en dos ocasiones con etanol al 100% durante 5 minutos dejando secar la muestra a 50°C por 2 minutos. Se realizó un pre tratamiento con la solución de "pre tratamiento" durante 30 min a 80°C, las laminillas se incubaron con una solución de proteasa, se lavaron en 2 ocasiones y los especímenes se fijaron con formalina al 10%.

Para la hibridación, la muestra se desnaturalizó en una solución con 70% de formamida en 2X de SSC (Solución salina de citratos pH 7-8), las laminillas se sumergieron en la solución durante 5 minutos a 75°C (la temperatura es crítica en este paso). Posteriormente la muestra se deshidrató durante 3 minutos en 3 concentraciones de etanol al 70, 85 y 100% respectivamente, una vez que la muestra secó por completo se colocó a 50°C con la finalidad de evaporar el alcohol restante. Se aplicaron 10µl de la sonda previamente desnaturalizada, la laminilla se selló y se dejó hibridar a 37°C durante 16 hr.

Posterior a la hibridación la muestra se lavó a 73°C durante 2 minutos en una solución de lavado que contenía 0.4X SSC/0.3% NP-40 (nonidet P 40), se repitió el lavado en las mismas condiciones, en una solución con 2X de SSC y 1% de NP 40. Para la visualización de la sonda se aplicaron 10µl de la contra tinción de DAPI II y se analizó en un microscopio de fluorescencia.

En los pacientes 4 y 5, el estudio de FISH se realizó también en núcleos en interfase de cultivo de linfocitos, en el caso 4 se utilizó una sonda pintada del cromosoma Y marcada con un fluorocromo naranja (Vysis™) y una sonda centromérica del X marcada con un fluorocromo verde (Vysis™). En el paciente 5 se incluyó un fluorocromo aqua (Vysis) que corresponde al centrómero del cromosoma 18. Las condiciones de hibridación fueron las mismas a las previamente descritas (Pinkel y cols, 1986).

Resultados

Estudio citogenético con bandas GTG

Se realizó estudio citogenético en los 13 pacientes incluidos en el estudio, en los casos 1-10 se observó en 50 metafases analizadas un cariotipo 46,XX, mientras que los casos 11 – 13 fueron mosaicos con una segunda línea celular con cromosoma Y y con los siguientes cariotipos 45,X/46,XY, 46,XX/46,XY, 46,XX/47,XXY respectivamente (Tabla 1). El análisis estructural de los cromosomas no mostró ninguna alteración, particularmente el cromosoma 22 que en estudios anteriores había sido implicado en el HV.

Análisis por PCR del gen SRY

En los 10 casos con cariotipo 46,XX (casos 1-10), se realizó análisis por PCR del gen SRY en DNA obtenido de leucocitos de sangre periférica. No se observó producto de amplificación para SRY en ninguno de los diferentes fragmentos estudiados que amplifican el ORF, con lo cual se descartó la presencia de SRY en este tejido (Figura 8). Por otro lado fue la búsqueda por PCR del gen SRY en DNA obtenido de homogenizado de ovotestes en el grupo de pacientes 46,XX, la cual en los casos 2-10 también fue negativa. Sin embargo, el gen SRY fue positivo en homogenizado de ovotestes de la paciente 1 (Figura 10A y 10B), en esta misma paciente se realizó estudio por PCR del gen SRY en un homogenizado de la porción ovárica del ovotestes, en la que también se identificó la presencia de SRY, sin embargo en esta fase del estudio no es posible descartar que el

resultado se deba a contaminación con la porción testicular. Los resultados obtenidos por PCR en la paciente 1, 46,XX-SRY negativo en leucocitos de sangre periférica pero SRY positivo en homogenizado sugieren la presencia de un probable mosaico para SRY localizado en el tejido gonadal.

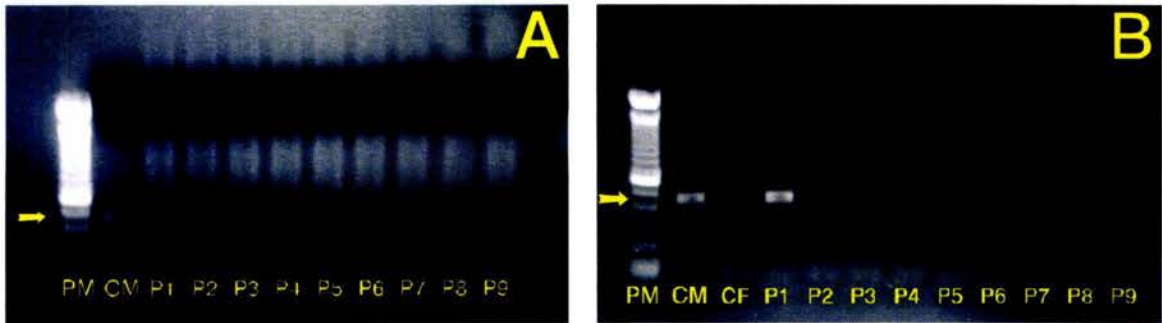


Figura 10: Análisis por PCR del gen SRY utilizando los iniciadores SRY6/XES11. Estos amplifican un producto de 432 pb. **(A)** Análisis del DNA obtenido a partir de leucocitos en sangre periférica; carril 1 PM 100 pb, CM control masculino normal, P1-P9 sangre periférica pacientes 1 al 9. **(B)** Análisis del DNA obtenido a partir de homogenizado de ovotestes; PM peso molecular 100 pb, CM control de testículo embebido en parafina normal, CF control de ovario normal, P1-P9 ovotestes de los paciente 1 al 9. En el paciente 10 no se observó amplificación en ninguno de los tejidos estudiados.

Análisis por PCR de otras secuencias del cromosoma Y

Con el fin de descartar que en el grupo de pacientes con cariotipo 46,XX en sangre periférica (casos 1-10) existieran otras secuencias del cromosoma Y, se amplificaron por PCR las regiones correspondientes a PABY, ZFY, Ycen y Yqh (Figura 7). El estudio se llevó a cabo en DNA de leucocitos de sangre periférica y de tejido gonadal, los resultados obtenidos de estas secuencias se presentan en la tabla 3. Se observó que en 7 de los 10 pacientes HV y cariotipo 46,XX en sangre periférica no se identificó ninguna de estas regiones (casos 2,3,6-10), en contraste, el estudio de estas mismas secuencias en el DNA de leucocitos así

como de tejido gonadal de los pacientes 4 y 5, inicialmente incluidos en el estudio como 46,XX, se identificó tanto la presencia de la región centromérica (cenY) y heterocromática del cromosoma Y (Yqh), así como ausencia de las regiones del brazo corto analizadas incluyendo SRY (Figura 11). Esta observación se confirmó también en fibroblastos.

En la paciente 1, solo se confirmó amplificación para el gen SRY en DNA de ovotestes mientras que el resto de las secuencias analizadas tanto en DNA obtenido de leucocitos como de gónada estuvieron ausentes (Tabla 3).

Paciente	PABY SP/G	SRY SP/G	ZFY SP/G	Ycen SP/G	Yqh SP/G	Xcen SP/G
1	Neg/Neg	Neg/Pos	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos
2	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos
3	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos
4	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
5	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos	Pos/Pos	Pos/Pos
6	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos
7	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos
8	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos
9	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos
10	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Pos/Pos

Tabla 3: Análisis por PCR de las secuencias del cromosoma Y en los pacientes con cariotipo 46,XX incluidos en el estudio.

SP = sangre periférica, G = Gónada, Neg = negativo, Pos = positivo

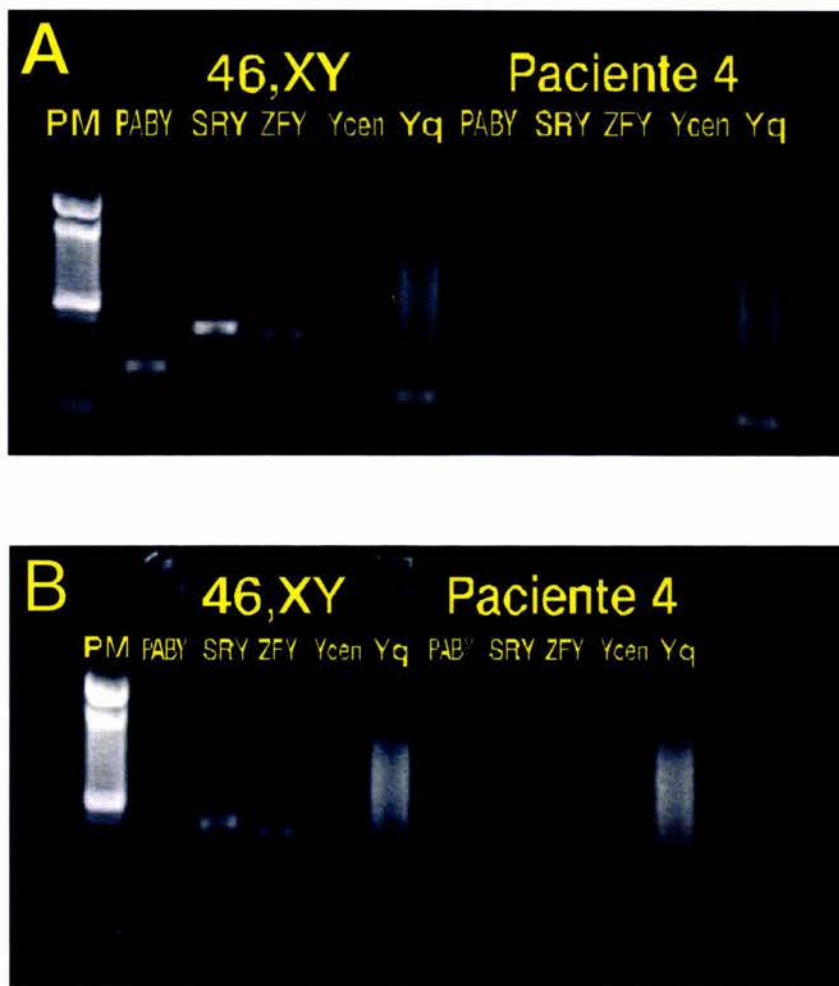


Figura 11: Análisis por PCR de las diferentes regiones del cromosoma Y del paciente 4. En este caso clasificado por citogenética como 46,XX, se observa en (A) Producto de amplificación para Ycen 170pb y Yq 154pb en DNA de linfocitos de sangre periférica, en el control masculino normal 46,XY se observa amplificación para todas las regiones estudiadas. (B) PCR en DNA de homogenizado de ovotestes del paciente 4 y un testículo normal observándose iguales resultados que en A. Las mismas secuencias se observaron en el paciente 5.

Los resultados obtenidos por PCR en los casos 4 y 5 sugerían la presencia de una segunda línea celular con una deleción del brazo corto del cromosoma Y. Para delimitar los puntos de ruptura del Y se buscó un gen de copia única localizado en otro intervalo de los brazos cortos. Se eligió una región STS del gen AMELY (Amelogenina) localizado en Yp11.2. El análisis de homología utilizando la base

de datos y el programa **Basic Local Alignment Search Tool** ^{BLAST®} (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) demostró que la región STS del gen AMELY no compartía homología con la secuencia de ningún autosoma ni con el X, lo cual demostró que la región elegida es altamente específica para el cromosoma Y. Una vez identificado el gen se diseñaron los *oligonucleotidos* específicos y se realizó estudio por PCR en DNA de sangre periférica y en el homogenizado de ovotestes en los pacientes 4 y 5, no demostrándose amplificación para este gen en ninguno de los dos pacientes estudiados comparados con el control positivo (Figura 12). Estos datos demuestran que la ruptura en los brazos cortos del cromosoma Y en ambos pacientes (4 y 5) se localizaba por debajo de Yp11.2.

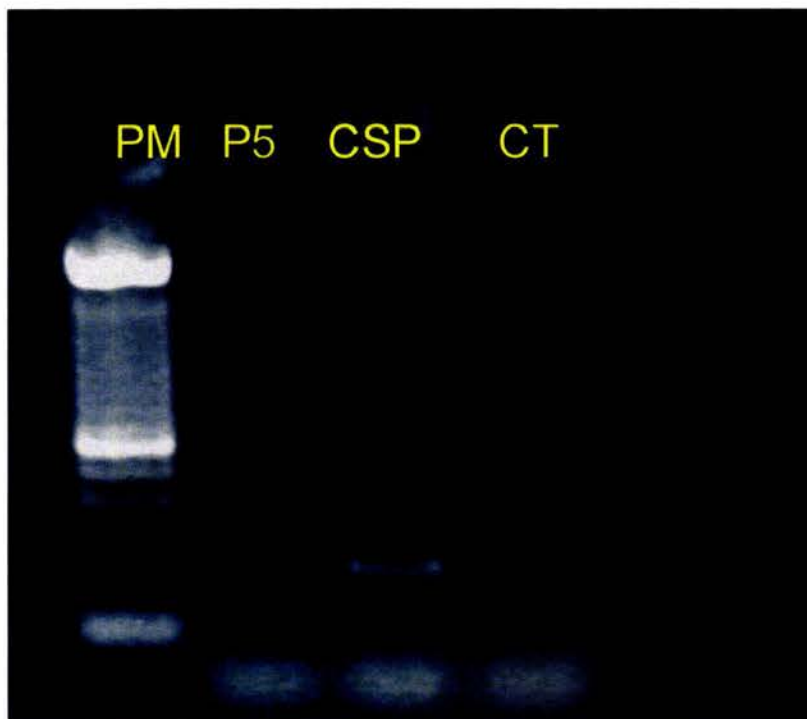


Figura 12: Estudio por PCR del gen AMELY en el paciente 5

PM Escalera de 100 pb, **P5** paciente, **CSP** control DNA de linfocitos de sangre periférica en un individuo masculino normal, **CT** control DNA de testículo masculino normal. Los resultados en el paciente 4 fueron similares

Dado que la PCR en estos dos pacientes sugería la presencia de una segunda línea celular con cromosoma Y anormal (del Yp), se realizó un segundo cariotipo con técnicas convencionales de bandas GTG y CBG. Sin embargo, no se logró visualizar el cromosoma Y en 500 metafases analizadas en cada caso.

En los pacientes 11-13 46,XX con un mosaico cromosómico y una segunda línea celular con cromosoma Y (45,X/46,XY, 46,XX/46,XY, 46,XX/47 XXY) incluidos en el estudio, se amplificaron por PCR todas las secuencias del Y (PABY, ZFY, SRY, cenY, Yqh) en DNA obtenido de leucocitos de sangre periférica y tejido gonadal. En la paciente 12 se pudo estudiar por PCR también la porción ovárica del ovostestes donde se identificaron todas las secuencias analizadas. Desafortunadamente no se pudieron analizar las regiones ováricas de los otros dos pacientes.

En todos los casos estudiados se amplificó exitosamente la región centromérica del cromosoma X que fue utilizada como control interno.

Secuenciación del gen SRY

En todos los casos positivos para este gen, se realizó secuenciación de SRY (casos 1 y 11-13). En el paciente 1, el cual fue solo positivo para SRY en DNA de tejido gonadal no se identificó ningún cambio en la secuencia del gen (Figura 13). La secuenciación del DNA en leucocitos y tejido gonadal de los pacientes

(casos 11-13) fue normal, lo que se descartó mutaciones en SRY como causa coadyuvante de las anomalías en el desarrollo gonadal de estos pacientes.

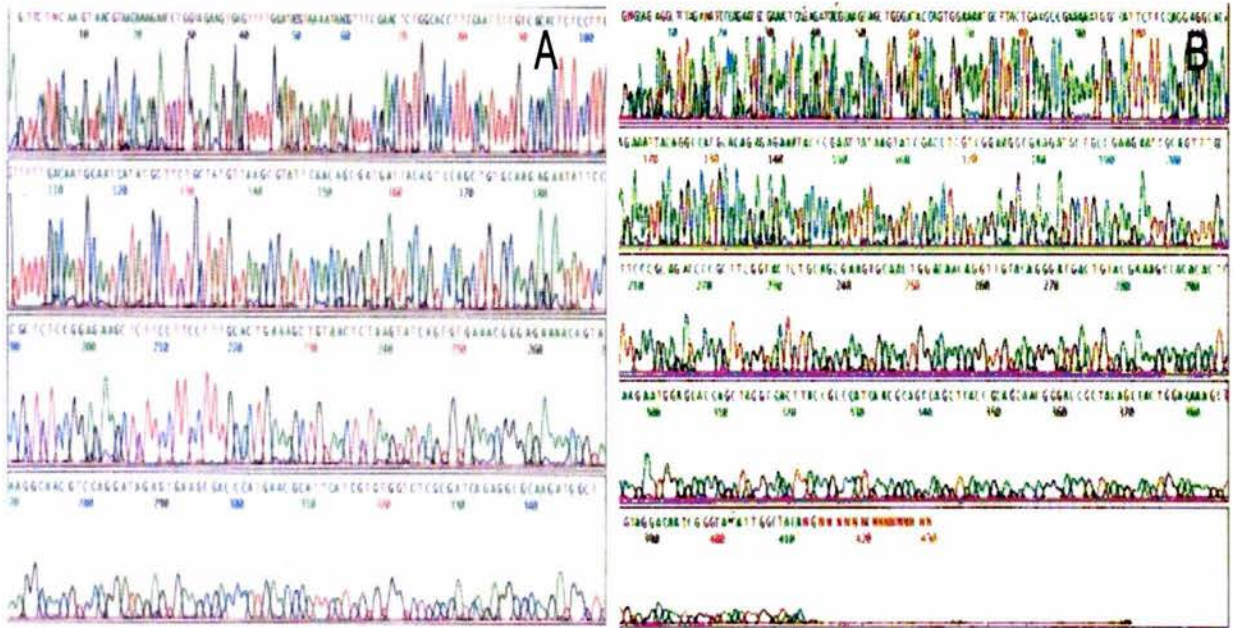


Figura 13: Electroferograma del gen SRY en la paciente 1.

Secuenciación automatizada de los productos del gen SRY obtenidos de DNA de homogenizado de ovotestes **(A)** utilizando la secuencia sentido XES10, **(B)** utilizando la secuencia antisentido XES11.

Análisis por Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

Para confirmar e identificar la presencia del gen SRY en las gónadas de los pacientes SRY positivo se realizó estudio de FISH. Con la finalidad de estandarizar las condiciones experimentales y corroborar que la prueba fuera suficientemente sensible para detectar al gen SRY en los tejidos incluidos en parafina de nuestros pacientes, se incluyó un ensayo utilizando tejido testicular normal y tejido gonadal del caso 11, donde el complemento cromosómico fue (46,XY/45,X). Los resultados obtenidos durante la estandarización del estudio mostraron que la técnica de FISH es sensible para detectar la presencia de SRY (Figura 14).

Para descartar que el estudio por PCR no fuera lo suficientemente sensible y pudiera existir la posibilidad de omitir la presencia de SRY en los pacientes 46,XX negativos para las secuencias del cromosoma Y estudiadas, se realizó FISH con la sonda de SRY en cortes de gónada incluida en parafina, se incluyeron los casos 2, 3, 6-10 todos 46,XX-SRY negativos (Tabla 3). En ninguno de estos casos se detectó señal de hibridación para el gen SRY, pero se observaron las dos señales de hibridación verdes correspondientes al los centrómeros del X corroborando el cariotipo 46,XX (Figura 15).

Estos resultados demostraron que las condiciones utilizadas en el presente estudio para la amplificación y localización de SRY por PCR y FISH son lo

suficientemente sensibles para detectar su presencia en DNA obtenido del tejido gonadal embebido en parafina.

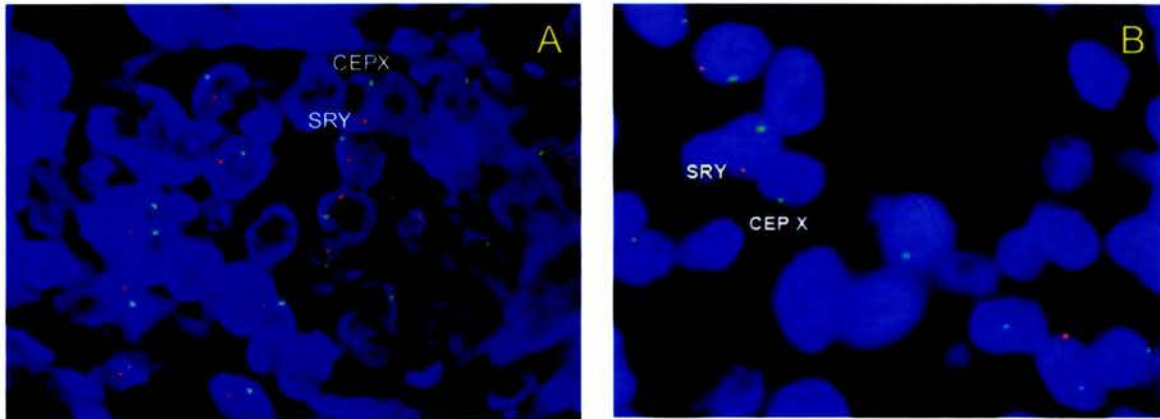


Figura 14: Estudio con FISH del gen SRY en tejido gonadal incluido en parafina. Las señales rojas indican la presencia del gen SRY, las señales de hibridación verde indican la región centromérica del X. **(A)** Tejido testicular normal, **(B)** Paciente 11 con cariotipo 46,XX/45,X. Las imágenes se observan a una magnificación 60X

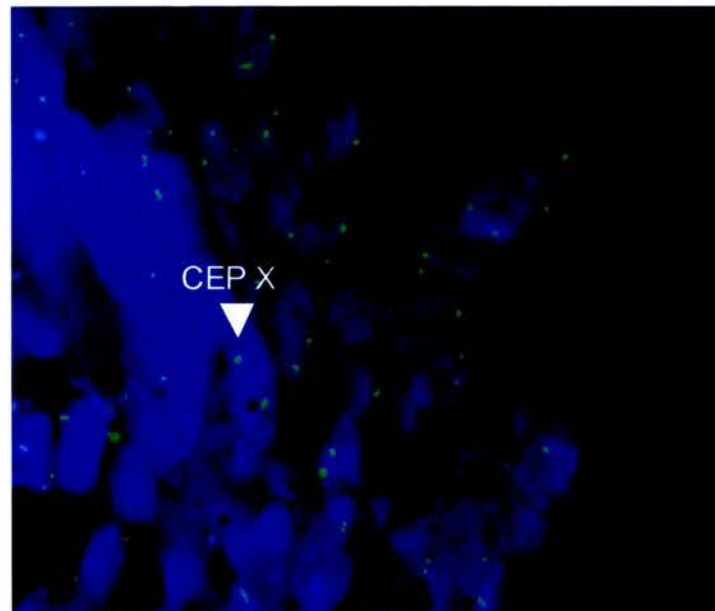


Figura 15: Análisis por FISH del gen SRY en tejido gonadal de uno de los casos 46,XX. Únicamente se observa la señal de hibridación para el cromosoma X en verde.

Paciente 1

Los resultados obtenidos por PCR en la paciente 1 sugerían la presencia de SRY solo en DNA de tejido gonadal. Para corroborar esta observación y poder determinar la localización del gen SRY en gónada, se realizó estudio por FISH en cortes de ovotestes incluidos en parafina. Se utilizó una sonda de DNA locus específico para SRY y como control positivo intra-ensayo se incluyó una sonda de DNA correspondiente a la región centromérica del cromosoma X.

Se analizaron 300 núcleos, el análisis consideró únicamente aquellas células que mostraron dos señales verdes correspondientes a los centrómeros de X (46,XX/88%) y dos señales verdes y una señal roja correspondiente a SRY en 14% (46,XX SRY positivas) (figura 16).

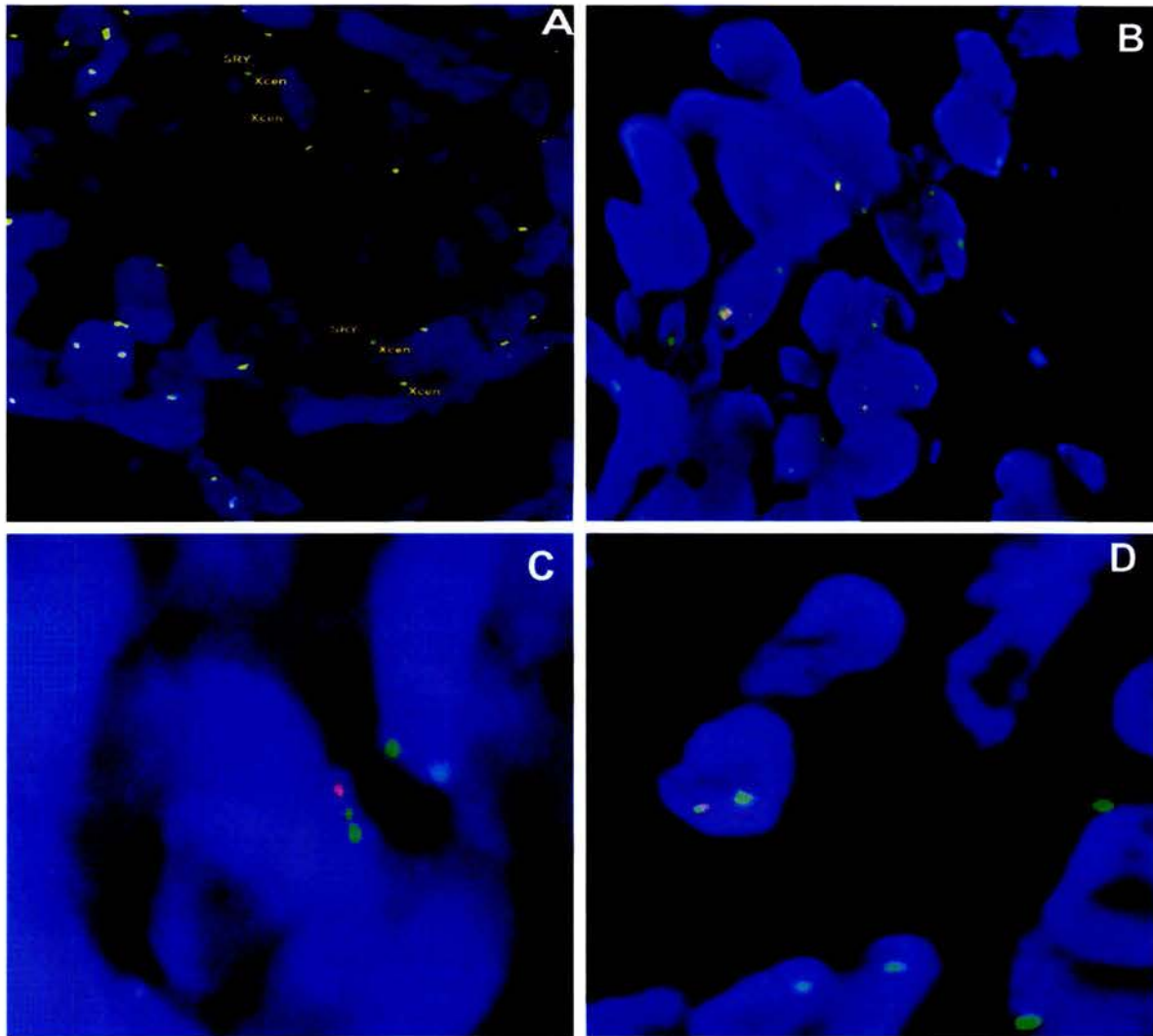


Figura 16: Análisis con FISH del gen SRY en cortes de ovotestes en el caso 1. (A)(B) Imagen de la porción interna de un túbulo seminífero donde se observan algunas células con una señal roja correspondiente al cromosoma Y en asociación a una señal verde del centrómero del X, (C) Imagen 100X de una de las células SRY positivas señalando la proximidad de la señal a uno de los cromosomas X (D) Imagen de la región ovárica del ovotestes mostrando la presencia de SRY.

El 14% de las células analizadas mostraba señal de hibridación para SRY (Figura 16A y B), encontrándose siempre próxima a uno de los centrómeros del cromosoma X (Figura 16C), lo que sugirió que el gen SRY estaba translocado a uno de los X. Las células que mostraron señal de hibridación positiva para SRY

fueron localizadas principalmente dentro del túbulo seminífero, tratándose de identificar la morfología de las células positivas en diferentes cortes. Sin embargo, aunque probablemente se trataba de células de Sertoli, la metodología no permitió descartar con certeza la presencia de SRY en células germinales, ocasionalmente se observó señal de hibridación en células intersticiales.

Es interesante señalar que también se corroboró la observación realizada por PCR en la porción ovárica del ovotestes de la paciente 1, donde el FISH identificó células SRY positivas en esta región (Figura 16 D) las señales encontradas guardaban las mismas proporciones a las identificadas en la región testicular. Sin embargo al igual que en esta región no fue posible identificar la estirpe celular. Los resultados obtenidos por FISH en el caso 1 mostraron la presencia de un mosaico en baja proporción para SRY confinado a la gónada. Para confirmar este dato se estudió con FISH algunos restos Wolffianos incluidos en parafina de la misma paciente, se usaron las mismas condiciones experimentales utilizadas para el tejido gonadal. Los resultados mostraron únicamente la señal correspondiente a los 2 centrómeros del X en 300 núcleos sin identificarse señal positiva para SRY (Figura 17), lo que apoya que el mosaico parece estar confinado a la gónada.

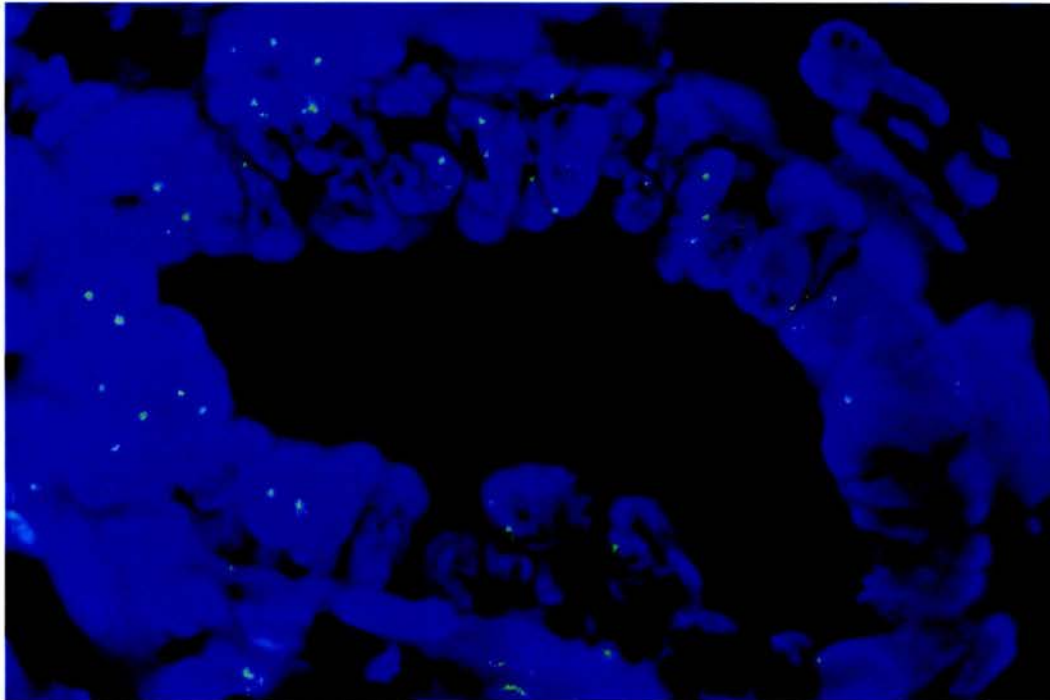


Figura 17: Estudio con FISH del gen SRY en tejido adyacente a la gónada. La señal de hibridación verde indica la presencia del centrómero del X. No se observa señal de hibridación roja correspondiente a SRY.

Pacientes 4 y 5

En los pacientes 4 y 5, los estudios por PCR revelaron la presencia de Ycen y Yqh en DNA de sangre periférica y gónada. Este dato sugirió la existencia de una segunda línea celular con un cromosoma Y anormal (Yp-), que no pudo ser detectada por citogenética convencional. Para confirmar lo anterior se realizó estudio con FISH en núcleos de linfocitos en interfase, utilizando una sonda que pinta todo el cromosoma Y de color naranja (WPC-spectrum orange), como control interno se utilizó una sonda que tiñe de verde los centrómeros del X.

En el paciente 4 se observó señal de hibridación para el Y en 4% de los núcleos y es interesante señalar que en estas células positivas para el Y se identificaron

dos señales de hibridación verde correspondientes a los centrómeros del X. Estos datos mostraron una segunda línea celular 47,XX delYp? (Figura 18). Las células restantes (96%) sólo mostraron dos centrómeros de X por lo que en este paciente, el cariotipo final fue 46,XX/47,XX del(Y)(p?).

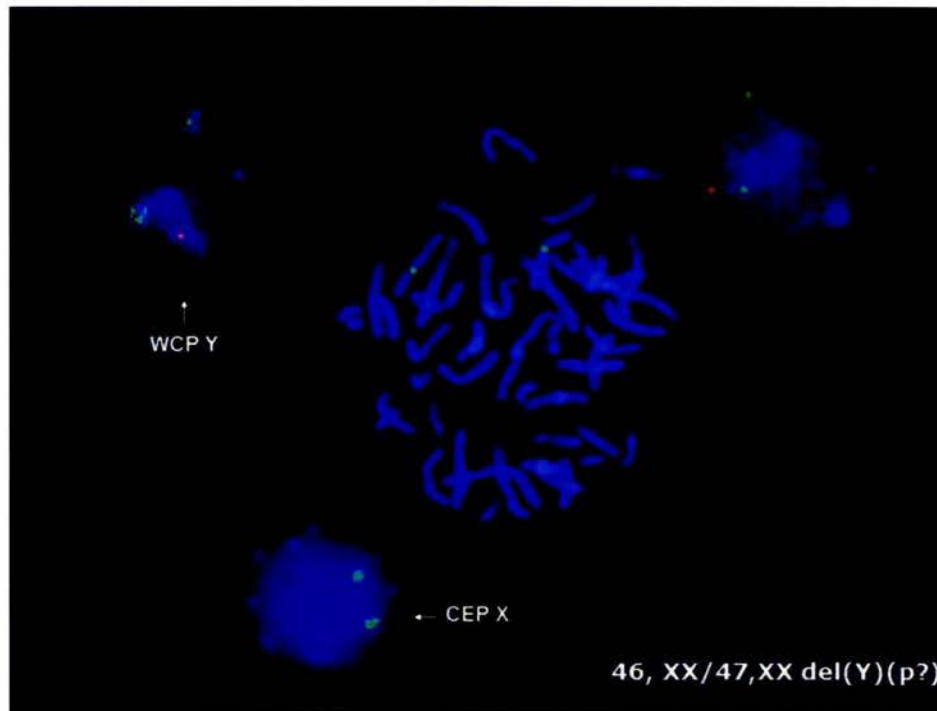


Figura 18: FISH en núcleos en interfase utilizando WCPY y centrómero de X en el paciente 4. Se muestran las diferentes líneas celulares.

En el paciente 5, donde también se identificó por PCR la presencia de secuencias positivas para Ycen y Yqh, se realizó estudio por FISH utilizando una sonda para las regiones centroméricas de los cromosomas X y Y marcadas con fluorocromos verde y rojo respectivamente. El análisis identificó varias líneas celulares que involucraban al cromosoma X tales como 46,XX, 47,XXX y 47,XX del(Y)(p?), e incluso una 45,X. Para descartar que esta última línea fuera un error en la lectura

se repitió el estudio en núcleos en interfase y en cortes de tejido gonadal embebido en parafina. En esta ocasión se incluyó como control una sonda centromérica del cromosoma 18 marcada con color azul aqua (Figura 19). Los resultados confirmaron la presencia de diferentes líneas celulares incluyendo la 45,X. Al igual que en el paciente 4, se observó que la línea celular que contenía al cromosoma Y anormal presentaba dos cromosomas X, siendo el cariotipo final en este paciente fue 47,XXX/45,X/47,XXdel (Y)(p?)/46,XX (Figura 19).

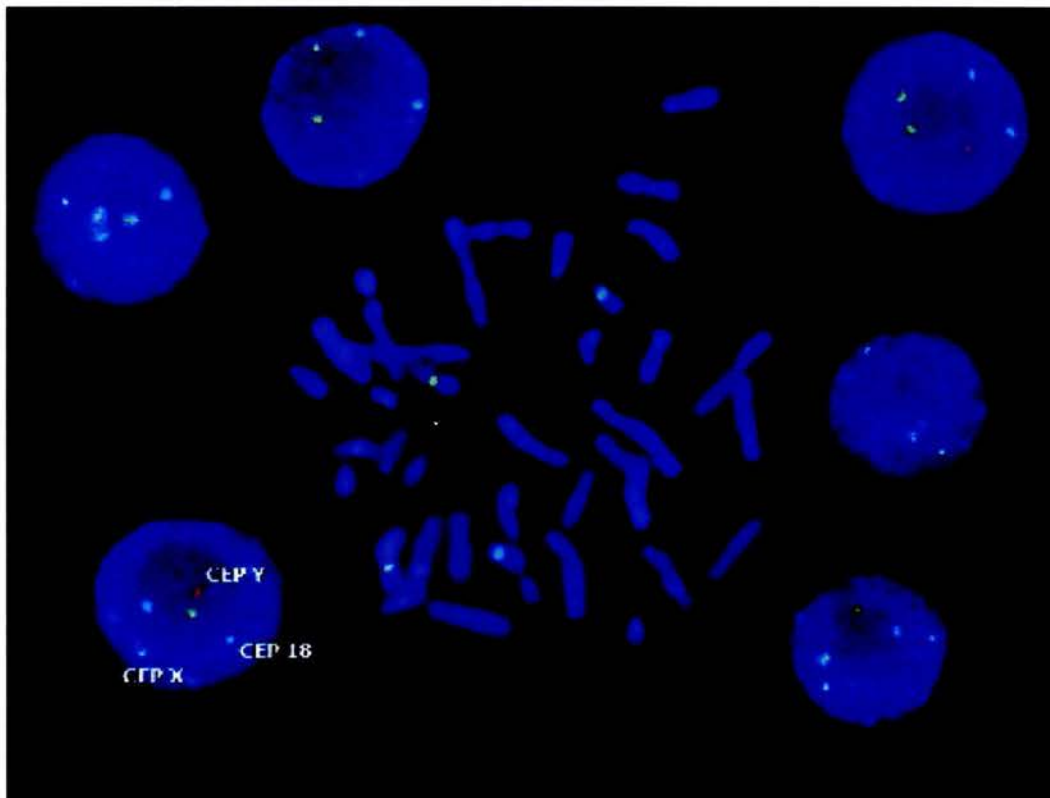


Figura 19: FISH en núcleos en interfase utilizando centrómeros del Y, X y centrómero de 18 en el paciente 5. Se muestran las diferentes líneas celulares que involucran al cromosoma X, en la metafase y en los núcleos en interfase se observa la presencia de dos señales color aqua correspondiente al centrómero del cromosoma 18.

Discusión

El proceso por el cual la gónada indiferenciada se desarrolla hacia ovario o testículo involucra diversos mecanismos moleculares finamente regulados aún no perfectamente dilucidados en muchos aspectos. Los estudios en modelos animales han aportado diversos datos acerca de los procesos de determinación y diferenciación gonadal, sin embargo el conocimiento en humanos es aún limitado. El estudio de pacientes HV permite analizar algunos de los procesos que participan en el desarrollo gonadal y responder algunas de las preguntas relacionadas con el desarrollo normal o anormal de la gónada.

El HV es una anomalía genéticamente heterogénea poco frecuente, donde el desarrollo de testículo y ovario en un mismo individuo ha sido asociado con varias anormalidades genéticas. Dentro de los defectos genéticos que han sido identificados, se encuentran: tres pacientes HV 46,XY donde se han descrito mutaciones puntuales en el gen SRY (Braun y cols., 1993; Hiort y cols., 1995; Maler E y cols., 2003); la presencia de mosaicos ocultos para el cromosoma Y o secuencias del Y han sido sugeridas como causa del desarrollo gonadal en pacientes HV 46,XX (Hadjathanasiou y cols., 1994; Inoue y cols., 1998; Jiménez y cols., 2000). Además, se reportó una duplicación de 22q en un paciente HV 46,XX SRY-negativo (Aleck y cols., 1999).

Con la finalidad de identificar los mecanismos genéticos que conllevan a la formación de tejido testicular y ovárico en el mismo individuo, en este trabajo se analizó desde el punto de vista citogenético y molecular a un grupo de 13 pacientes HV. Diez de los casos presentaron cariotipo 46,XX y tres eran mosaicos 45,X/46,XY, 46,XX/46,XY, 46,XX/47. El análisis del cromosoma 22 no reveló ninguna anomalía estructural que explicara la causa del desarrollo testicular en nuestros pacientes. El estudio molecular del gen determinante testicular (SRY) mostró que los diez pacientes 46,XX fueron SRY negativos en DNA obtenido de leucocitos de sangre periférica, resultados que coinciden con los reportes en la literatura donde 60% de los HV presentan un cariotipo 46,XX. En la literatura se informa que el estudio molecular del gen SRY en DNA de leucocitos es únicamente positivo en 10%, lo que indica que en la mayoría de los pacientes con HV 46,XX el desarrollo testicular no está asociado a SRY. Respecto al 90% de HV SRY negativos, algunos autores han propuesto la pérdida o ganancia de función en genes "aún no caracterizados" que participan en la determinación testicular, localizados en autosomas o ligados al cromosoma X, como responsables del desarrollo gonadal en estos pacientes (McElreavey y cols., 1992, 1993; Boucekkine y cols., 1994; Torres y cols., 1996; Domenice y cols., 2001).

Otro de los mecanismos propuestos para explicar la formación de tejido testicular es la existencia de mosaicos ocultos en gónada. Tres reportes en la literatura

proponen la presencia de mosaicos para SRY confinados a la gónada en casos de HV 46,XX-SRY negativos en sangre periférica (Hadjathanasiou y cols., 1994; Inoue y cols., 1998; Jiménez y cols., 2000). En los primeros dos estudios la falta de análisis de otras secuencias específicas del Y, no permitió descartar la presencia de una segunda línea celular con cromosoma Y. En el tercer trabajo nuestro grupo reportó un caso 46,XX SRY negativo en DNA obtenido de sangre periférica y en células de mucosa oral, pero positivo y parcialmente deletado en DNA obtenido de la porción testicular del ovotestes. En este caso se analizaron otras secuencias del Y, descartándose la presencia de una línea celular con cromosoma Y. Los datos obtenidos por PCR apoyaron la presencia de mosaicos ocultos y localizados en gónada en este paciente (Jiménez y cols., 2000).

Considerando la posibilidad de la existencia de mosaicos ocultos en nuestro grupo de pacientes 46,XX se llevó a cabo estudio molecular en el tejido gonadal incluido en parafina. El estudio del gen SRY por PCR en DNA de homogenizado de ovotestes fue negativo en 9 de los 10 pacientes 46,XX-SRY negativos en sangre periférica, sin embargo en el caso 1, también SRY negativo en sangre periférica, el análisis por PCR mostró la presencia del gen SRY en tejido gonadal, lo que fue posteriormente confirmado por FISH. En este paciente, el estudio por PCR del resto de las secuencias para el cromosoma Y fue negativo lo que descartó la presencia de cromosoma Y y demostró la existencia de un mosaico SRY negativo en sangre periférica y SRY positivo en gónada. El hallazgo de SRY

solo en gónada puede explicarse por la presencia de un mosaicismo evanescente (Hadjiathanasiou y cols., 1994; Inoue y cols., 1996; Jiménez y cols., 2000). El mecanismo responsable de este tipo de mosaicos para SRY limitados a la gónada, podría ser debido una recombinación ilegítima entre el cromosoma X y el Y durante la meiosis paterna donde el gen SRY se translocó al X paterno; la paciente heredó el cromosoma X paterno con el gen SRY que permitió la diferenciación testicular con la pérdida subsiguiente de SRY de la mayoría de los tejidos.

El análisis de los resultados con FISH en el tejido gonadal del paciente 1 reveló otros aspectos interesantes. La señal de hibridación para SRY se encontró siempre en asociación con una de las señales para el centrómero del X, apoyando que este gen se encontraba translocado a uno de los cromosomas X. El estudio por PCR y FISH en este paciente de un fragmento de tejido adyacente a la gónada demostró ausencia de SRY apoyando la posibilidad de que el mosaico se encontrará confinado a gónada. No fue posible reconocer la presencia de este gen en otro órgano, ni determinar si SRY se mantuvo en la gónada por ser el tejido donde ejerce su efecto crítico durante el desarrollo. Este paciente 1, 46,XX SRY negativo en DNA de sangre periférica pero positivo en DNA del tejido gonadal (ovario/testículo) es el primer caso informado en la literatura donde se demuestra mediante hibridación *in situ* con fluorescencia, la presencia de

mosaicos para SRY y apoya la posibilidad de que los mosaicos gonadales constituyan un mecanismo etiopatogénico en el HV.

Por otra parte, 86% de las células en la paciente 1 fueron negativas para SRY en la región testicular mientras que 14%, demostrándose también la existencia de un segundo mosaico dentro de la gónada. En los modelos murinos se ha propuesto, que mutaciones o deleciones de Sry (Y^{Tdyml}, Y^{Pos}) generan un alelo débil lo que ocasiona síndromes de reversión sexual (Lovell-Badge y cols., 1990; Cameron y cols., 1997). En estos pacientes podría proponerse que la presencia de SRY no fue suficiente para diferenciar adecuadamente al testículo y que su expresión debe suceder con un umbral de dosis y en una ventana específica en el tiempo (Heder y cols., 1995; Lovell-Badge y cols., 1992).

Otro aspecto importante es la localización celular de SRY. En los cortes analizados, la señal de hibridación se localizó principalmente dentro de los túbulos seminíferos. La morfología de las células SRY positivas sugiere que probablemente se trate de células de Sertoli, sin embargo la metodología no permite descartar la presencia de SRY en células germinales.

Un hallazgo interesante tanto en el paciente 1 como en el 12 fue la presencia de SRY en la porción ovárica del ovotestes, esta observación fue descrita previamente en un paciente HV 46,XX-SRY positivo en sangre periférica y gónada

(Salas Cortez y cols., 2000). Este dato fue corroborado por FISH en el paciente y se identificó señal de hibridación en 12% de los núcleos de la porción ovárica del ovotestes. Al parecer la presencia de este gen en algunas de las células de la gónada indiferenciada no garantiza el desarrollo testicular completo, ni inhibe el inicio de la vía de desarrollo ovárica (Salas-Cortez y cols., 2000). Estos datos apoyan en forma indirecta que el "*switch*" que desencadena SRY para la determinación de la gónada indiferenciada hacia testículo, tiene que suceder en el momento preciso, con la cantidad exacta de transcrito y en la célula indicada. El desarrollo del ovario en presencia de células SRY positivas, puede estar relacionado con alelos no funcionales tal como se sugiere en modelos murinos (Palmer y Burgoyne 1991^a y 1991^b; Patek y cols., 1991), y que en nuestra paciente, un alelo normal de SRY dio origen a las células testiculares, mientras que un alelo no funcional de este gen permitió que se iniciara la vía femenina y se desarrollará el tejido ovárico. Se ha propuesto que diferencias funcionales de SRY pueden ser secundarias al proceso de inactivación del cromosoma X (Fechner y cols., 1994; Capel y cols., 1999).

En los pacientes 4 y 5, inicialmente clasificados como 46,XX-SRY negativo en DNA de leucocitos y de gónada, el análisis por PCR de otras secuencias del cromosoma Y, mostró la presencia de Y cen y Yqh en DNA de varios tejidos analizados (leucocitos, gónada y fibroblasto). En el paciente 4 los resultados fueron confirmados por FISH que identificó la sonda que tiñe al cromosoma Y en

4% de núcleos en interfase confirmándose un mosaico en baja proporción y donde cada célula positiva para el Y mostró dos señales de hibridación para los centrómeros del cromosomas X cariotipo.

En el paciente 5 el estudio por FISH utilizando sondas centrómicas para el Y X y el 18 en diferentes colores, mostró la existencia de varios mosaicos cromosómicos para el X en baja proporción. Al igual que en el paciente 4 la señal de hibridación para el Y se encontró siempre acompañada por dos cromosomas X.

En estos pacientes (4 y 5), el estudio por FISH reveló que el cariotipo convencional no es suficiente para conocer el genotipo de estos pacientes ya que, debido a la baja proporción con que se presentó el mosaico no fue posible observar las diferentes líneas celulares. En el caso del paciente 4 el estudio por FISH mostró un cariotipo final 46,XX/47,XX del (Y)(p?), mientras que en el paciente 5 el complemento cromosómico fue 47,XXX/45,X/47,XX del (Y)(p?)/46,XX . En este último caso se puede proponer que el mosaicismo observado se debe a que en un cigoto originalmente XXYp- durante la embriogénesis temprana se presentó un rezago en la anafase del cromosoma Y anormal, generándose las líneas celulares 47,XX del (Y)(p?) y 46,XX. Posteriormente, la línea aneuploide predispone diferentes eventos de no

disyunción del cromosoma X, dando lugar al resto de las líneas celulares observadas por FISH.

La observación en los pacientes 4 y 5, donde el cromosoma Y se encontró siempre en asociación con dos cromosomas X apoyaría la hipótesis propuesta por Burgoyne y cols. que sugiere la existencia de un gen o genes localizados en el cromosoma X no compensado en dosis y que participa en la determinación testicular (Burgoyne y cols., 2001).

Recientemente se propuso que la polisomía del cromosoma X facilita el desarrollo ovárico (Aviv y cols., 2001).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan que la existencia de mosaicos ocultos son eventos que deben ser considerados como mecanismos alternativos en la etiopatogenia del hermafroditismo verdadero y deben investigarse dentro del estudio molecular en estos pacientes.

Referencias

Aleck KA, Argueso L, Stone J, Hackel JG, Erickson RP. 1999. True hermaphroditism with partial duplication of chromosome 22 and without SRY. *Am J Med Genet* 102:157-160.

Aviv H, Haller D, Fajardo A, Hoot A, Mavaro L. 2001. Sex Chromosome mosaicism in gonads of a fetus with a cystic hygroma and deletion of the short arm of Y chromosome including SRY. *Am J Med Genet* 102: 157-160.

Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR. 1995. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *BioTechniques*. 18:768-770, 772.

Baud S, Margaret E, Lumbrosol S, Paris F, Sultan CH, Roger C, Poujol N. 2002. Equilibrium binding assay reveal the elevated stoichiometry and salt dependence of the Interaction between full-length human sex-determining region on the Y chromosome (SRY) and DNA. *JBC*. 277: 18404

Berkovitz GD, Rock JA, Urban MD, Migeon CJ. 1982. True hermaphroditism. *Johns Hopkins Med J*. 151:290-297.

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

Braun A, Kammerer S, Cleve H, Löhns U; Schwarz H-P, Kuhnle U. 1993. True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male gonadal sex-findings in a sporadic case. *Am J Hum Genetic*. 52:578-585.

Brennan J, Kari J, Capel B. 2002. Divergent vascular mechanism downstream for Sry establish the arterial system in the XY gonad. *Dev Biol*. 244: 418-428.

Jordan B, Jain M, Natarajan S, Fraiser D, Vilain E. 2002. Familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by an XY female and her normal father. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 3428-3432.

Cameron F, Sinclair A. 1997. Mutations in SRY and SOX9: testis determining genes. *Hum. Mutat.* 9:388-95.

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

Clepet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell-Badge R, Goodfellow P. 1993. The human SRY transcript. *Hum. Mol. Genet.* 2: 2007- 12.

Da Silva SM, Hacker A, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14: 62-68.

Eicher E, Shown E. 1995. Sex reversal in C57BL/6J-Y^{POS} corrected by a SRY transgene. *Phylos Trans R.Soc. Ser. B.* 350: 263-69.

Ferrari S, Harley V, Pontiggia A, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1992. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.* 44:4497-506.

Ford C, Jones K, Polani P. 1959. Sex chromosome anomaly in a case of gonadal sex dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet.* 213:711-714.

Gomperts M, Wylie C. 1994. Primordial germ cell migration. *Ciba Found, Symp.* 182: 121-34.

Goodwin G, Sanders C, Johns E. 1973. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic aminoacids. *Eur. J. Biochem.* 38: 14-19.

Grosschedl R, Giese K. 1994. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoproteins structures. *Trends Genet.* 10: 94: 100.

Grumbach M, Conte F. Disorders of sex differentiation. In: Wilson J, Foster D. eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 8^a. ed. Philadelphia. Saunders. 1992:853-951.

Gubbay J, Collingnan J, Koopman P, Capel B, Economou A. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.

Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson DS, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1992. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 89: 7953-59.

Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1995. Expression of Sry: The mouse sex determining gene. *Development.* 121:1603-14.

Hadjiathanasiou CG, Brauner R, Lortat-Jacob S, Nivot S, Jaubert F, Fellous M, Nihoul-Féketé C, Rappaport R. 1994. True hermaphroditism: Genetic variants and clinical management. *J Pediatr.* 125:738-744.

Hiort O, Grams B, Klaubert GT. 1995. True hermaphroditism with 46,XY karyotype and a point mutation in the SRY gene. *J Pediatr* 126:1022.

Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb A, Bartley J. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplications of SOX9. *Am J Med Genet.* 87: 349-353.

Huhtaniemi I. 1994. Fetal testis-a very special endocrine organ. *Eur J. Endocrinol.* 130:25-31.

Imperato-McGinley J, Gautier T. 1994. Male pseudohermaphroditism due to primary 5 α -reductase deficiency in man. En: Martínez-Mora. Ed. *Intersexual States: Disorders of Sex Differentiation.* Barcelona Doyma. 231-240.

Inoue H, Nomura M, Yanase T, Ichino I, Goto K, Ikuyama S, Takayanagi R, Nawata H. 1998. A rare case of 46,XX true hermaphroditism with hidden mosaicism with sex-determining region Y chromosome-bearing cells in the gonads. *Int Medicine.* 37:467-471.

Jeske Y, Greenfield A, Koopman P. 1995. Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat. Genet.* 10: 480-82.

Jiménez AL, Kofman-Alfaro S, Berumen J, Hernandez E, Canto P, Mendez JP, Zenteno JC. 2000. Partially deleted SRY gene confined to testicular tissue in a 46,XX true hermaphrodite without SRY in leukocytic DNA. *Am J Med Genet.* 2:164-166.

Kathah-Fuki Y, Nakahara N, Higashinakawa T. 1998. Male to female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature.* 393: 688-692.

Kent J, Wheatley SC, Sinclair AH. 1996. A male specific role for SOX9 in vertebrates sex determination. *Development.* 122: 2813-22.

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

Kriedberg J, Sariola H, Loring J, Maeda M, Pelletier J. 1993. Wt-1 is required for early kidney development, *Cell.* 174: 679-691.

Lovell-Badge R, Robertson E. 1990. XY female mice resulting from a heritable mutation in the murine primary testis determining gene, *Tdy*. *Development* 109: 635-46.

Lovell-Badge R, Robertson E. 1990. XY female mice resulting from a heritable mutation in the murine pathway testis determining gene, *Tdy*. *Development.* 109: 635-46.

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

Maler E, Leitner C, Lohrs U, Kunhle U. 2003. True hermaphroditism in a XY individual due to a familiar point mutation of the SRY gene. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 16: 575-80.

Martineau J, Norquist K, Tilman C, Lovell-Badge R, Capel B. 1997. Male specific cell migration in to the developing gonad. *Curr. Biol.* 7: 958-68.

Mc Laren A, Southee D. 1997. Entry of mouse's embryonic germ cells in to meiosis. *Dev Biol.* 87:107-113.

Mc Laren A. 1995. Germ cells and germ cell sex. *Phil Trans R Soc Lond.B* 322:3-9.

- McElreavey K, Rappaport R, Vilain E, Abbas N, Richaud F, Lortat-Jacob S, Berger R, Le Conait M, Boucekine C, Kucheria K, Temtamy S, Nihoul-Féketé C, Brauner R, Fellous M. 1992 A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY. *Hum Genet.* 90:121-125.
- McElreavey K, Vilain E, Fencher P. 1996. Loss of sequences 3' to the testis-determining gene SRY, including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination and germ-cell development. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 8590-94.
- Merchant Larios H, Moreno Mendoza N. 1998. Mesonephric stromal cells differentiate in to Leydig cells in the mouse fetal testis. *Exp. Cell. Res.* 244: 230-38.
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S. 1997: Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development.* 124: 1653-1664.
- Molkentin J, Lin O, Olsen E. 1997. Requirement of transcription factor GATA 4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes and Dev.* 11: 1061-1072.
- Morohasi K, Honda S, Inomata Y, Zanger S. 1993. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by steroidogenic cell-specific transcription factor, AdBP4. *Mol Endocrinol.* 7: 1196-1204.
- Muller U. The human Y chromosome. 1994. *Molecular Genetics of Sex Determination*. Stephen S Wachtel (Ed). Academic Press, 205-224.
- Palmer S, Burgoyne P. 1991^a. In situ analysis of fetal prepuberal and adult XX/XY chimeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly but not exclusively XY. *Development.* 112: 265-68.
- Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H. 1986. Cytogenetic analyses by in situ hybridization with fluorescently label nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1:151-157.
- Pontiggia A, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1994. Sex reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J.* 6:115-24.

Raymond C, Shamu M. 1998. Evidence for evolutionary conservation of Sry-determining gene. *Nature*. 391: 691-695.

Reddy J, Licht J. 1996. The WT1 Wilms tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochem. Biophys. Acta*. 1287: 1-28.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2^a Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. E5.

Schmahl J, Eicher E, Capel B. 2000 SRY induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*. 127:65-73.

Shwalot W, Behringer R. 1995. Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature*. 374:425-430.

Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Dmith M J, Frischauf A, Lovell Badge R, Goodfellow P. 1990. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA- binding motif. *Nature*. 77: 240.44.

Swain A, Lovell-Badge R. 1999. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*. 13 (7): 720-755.

Swain A, Narvaez P, Burgoyne G, Lovell- Badge R. 1998. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature*. 391:761-767.

Teixeira J, Donahoe P. 1996. Molecular biology of MIS and its receptor. *J Androl*. 17: 336-341.

Tevosian S, Albrech K, Crispino J, Fujiwara Y, Eicher E, Orkin S.2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Dev* 129:4627-4634.

Tilman K, Capel B. 1999. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development*. 126:2883-2890.

Vaino S, Heikkila M, Zamboni L. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. *Nature*. 397: 405-409.

Van Niekerk WA, Retief AE. 1981 The gonads of human true hermaphrodites. Hum Genet. 58:117-122.

Welshons W, Russel L. 1959. The Y chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. Proc Natl Acad Sci. 45: 560-66.

Yao H, Whoriskey W and Capel B. 2002. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. Genes and Dev. 16: 1433-1440.

Gloria Queipo · Juan C. Zenteno · Rocío Peña
Karen Nieto · Alejandro Radillo · Luis M. Dorantes
Luis Eraña · Esther Lieberman · Daniela Söderlund
Ana L. Jiménez · Guillermo Ramón
Susana Kofman-Alfaro

Molecular analysis in true hermaphroditism: demonstration of low-level hidden mosaicism for Y-derived sequences in 46,XX cases

Received: 11 March 2002 / Accepted: 23 May 2002 / Published online: 1 August 2002

© Springer-Verlag 2002

Abstract True hermaphroditism (TH) is an unusual form of sex reversal, characterized by the development of testicular and ovarian tissue in the same subject. Approximately 60% of the patients have a 46,XX karyotype, 33% are mosaics with a second cell line containing a Y chromosome, while the remaining 7% are 46,XY. Molecular analyses have demonstrated that *SRY* is present in only 10% of TH with a 46,XX karyotype; therefore, in the remaining 90%, mutations at unknown X-linked or autosomal sex determining loci have been proposed as factors responsible for testicular development. True hermaphroditism presents considerable genetic heterogeneity with several molecular anomalies leading to the dual gonadal development as *SRY* point mutations or *SRY* hidden gonadal mosaicism. In order to identify genetic defects associated with subjects with the disease, we performed molecular analyses of the *SRY* gene in DNA from blood leukocytes and gonadal tissue in 12 true hermaphrodites with different karyotypes. Our results using PCR and FISH analyses reveal the presence of hidden mosaicism for *SRY* or other Y sequences in some patients with XX true hermaphroditism and confirms that mosaicism for *SRY* limited to the gonads is an alternative mechanism for testicular development in 46,XX true hermaphrodites.

G. Queipo (✉) · J.C. Zenteno · K. Nieto · A. Radillo
A.L. Jiménez · S. Kofman-Alfaro
Hospital General de México-Facultad de Medicina, UNAM,
Dr. Balmis 148 Col. Doctores CP 06726, Mexico City, Mexico
e-mail: skofman@servidor.unam.mx,
Tel.: +52-55-57-619371, Fax: +52-55-57-619371

R. Peña · L.M. Dorantes · L. Eraña
Department of Pathology and Endocrinology,
Hospital Infantil “Federico Gómez”, Mexico City, Mexico

D. Söderlund · G. Ramón
Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo,
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS,
Mexico City, Mexico

E. Lieberman
Department of Research in Human Genetics,
Instituto Nacional de Pediatría, México City, México

Introduction

Sex differentiation in humans depends on the presence of the Y-linked gene *SRY*, which is activated in the pre-Sertoli cells of the developing gonadal primordium to trigger testicular differentiation (Sinclair et al. 1990). *SRY* is an architectural factor that binds and bends specific DNA sequences (Ferrari et al. 1992). Although its specific function and downstream molecular targets remain unknown, it was recently demonstrated in mice that it promotes the migration of gonadal interstitial cells from the mesonephros (Capel et al. 1999) and also that it increases the rate of proliferation of the coelomic epithelial cells that give rise to Sertoli cell precursors (Schmahl et al. 2000). These cellular processes lead to testis cord formation and increased gonadal size, which are the first known morphological evidences of testicular organogenesis in vertebrates.

In rare cases, testicular formation can take place in subjects lacking a Y chromosome, resulting in a 46,XX sex reversal condition (Wachtel 1994). True hermaphroditism (TH) is a rare form of sex reversal characterized by the presence of both testicular and ovarian tissue in the same individual, either in a single gonad (ovotestis), or in opposite gonads with one testis and one ovary on each side (Van Niekerk and Retief 1981). True hermaphrodites usually have ambiguous external genitalia and variable development of Wolffian and Müllerian derivatives, depending on the amount of functional testicular tissue present (Torres et al. 1996). Approximately 60% of the patients have a 46,XX karyotype, 33% are mosaics with a second cell line containing a Y chromosome, while the remaining 7% are 46,XY (Krob et al. 1994; Hadjiathanasiou et al. 1994). Molecular analyses have demonstrated that *SRY* is present in only 10% of true hermaphrodites with a 46,XX karyotype (Berkovitz et al. 1992; McElreavey et al. 1992; Boucekkine et al. 1994; Damiani et al. 1997); therefore, in the remaining 90%, mutations at unknown X-linked or autosomal sex-determining loci have been proposed as factors responsible for testicular development

(Ramsay et al. 1988; McElreavey et al. 1993; Jiménez et al. 1996). TH presents considerable genetic heterogeneity, with several molecular anomalies leading to the dual gonadal development in a single subject: (1) in two 46,XY unrelated cases, point mutations in the *SRY* coding region were observed (Braun et al. 1993; Hiort et al. 1995); (2) duplication of 22q was recognized in a 46,XX *SRY*-negative case (Aleck et al. 1999); (3) gonadal *SRY* mosaicism was identified in two sporadic 46,XX patients who were *SRY*-negative in peripheral blood leukocytes, but positive in gonadal tissue (Hadjithanasiou et al. 1994; Inoue et al. 1998). Recently, we described a 46,XX true hermaphrodite in which *SRY* was negative in blood leukocytes and epithelial oral cells, but present and partially deleted in DNA obtained from the testicular portion of the ovotestes (Jiménez et al. 2000).

In order to identify the genetic defects that lead to TH, we performed molecular analyses of the *SRY* gene in DNA from both blood leukocytes and gonadal tissue in a group of 12 patients.

Subjects and methods

Patients

All 12 patients were of Mexican origin and none of them have been reported previously. Nine had a 46,XX karyotype and three were mosaics presenting a second cell line with a Y chromosome (Table 1). Clinical evaluation was performed between one and two years of age. All cases were sporadic and family history was negative for genital ambiguity, genetic diseases, and consanguinity. Diagnosis of TH was histologically confirmed by the presence of both testicular (defined by seminiferous tubules) and ovarian (defined by the presence of follicles) tissue. Chromosomal analysis was performed on peripheral blood leukocytes using conventional GTG technique and at least 50 metaphases were analyzed in each case (Table 1).

DNA preparation from peripheral blood leukocytes

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes according to standard protocols (Sambrook et al. 1989).

DNA preparation from paraffin embedded tissue

Gonadal DNA extraction from paraffin-embedded tissues was performed according to the method described by Banerjee et al. (1995). Tissue sections (5- μ m thick) from paraffin-embedded blocks were transferred to 1.5-ml microcentrifuge tubes and crushed with a sterile pipette in 200 μ l of digestion buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20]. The samples were exposed to microwave radiation (500 W for 15 s, 2–4 times), then centrifuged at 22,000 g for 10 min and the paraffin ring extracted. The tissue pellet was suspended in digestion buffer and 2.4 μ l of 16.5 mg/ml proteinase K was added to each tube, with a final concentration of 200 μ g/ml. Samples were digested overnight at 42 °C and then centrifuged for 5 min at 5,500 g. The supernatants were transferred into sterile tubes and boiled for 10 min to denature residual proteinase and contaminating proteins.

PCR amplification

PCR analyses of Y-specific sequences *SRY*, *Ycen*, *ZFY*, *PABY*, and *Yqh* were performed in DNA obtained from blood leukocytes and gonads. We also amplified an X-chromosome alphoid centromeric repeat as an internal positive PCR control (Zenteno et al. 1997).

We analyzed the *SRY* open reading frame (615 bp) using two sets of primers: (1) *SRY* δ -forward (5'-GTGGTCTCGCGATCAGA-3') and *XES11*-reverse (5'-GTAGCCAATGTTACCCGATTGTC-3'), that amplify a 432-bp fragment from nucleotide (nt) 207 to nt 638 with respect to the initial *SRY* ATG codon; (2) *XES10*-forward (5'-GGTGTGAGGGCGGAGAAATGC-3') and *SRY8*-reverse (5'-TAGAGCCATCTTGCGCCT-3'), which amplifies a 380-bp fragment from nt -140 to nt 240. Additionally, we used an extra set of primers *SRY6*-forward (5'-GTGGTCTCGCGATCAGA-3') and *SRY3*-reverse (5'-CTTCCGACGAGGTGCGATAC-3'), amplifying a 196-bp fragment from nt 207 to nt 402. The total PCR volume of 25 μ l for all amplifications includes 50 ng of DNA, 100 ng of each primer, 1 U of Taq polymerase, 1.5 mM MgCl₂, and 80 μ M of each dNTP. PCR temperatures for *SRY* amplifications were: 94 °C (5 min), 94 °C (1 min), 68 °C (1 min) and 72 °C (2 min) for 35 cycles and then 72 °C (10 min).

Table 1 Sex of rearing, clinical, cytogenetic, and anatomic data in 12 cases of true hermaphroditism (*O* ovary, *OT* ovotestes, *T* testis, *DG* dysgenetic gonad)

Patient	Sex Of rearing	External genitalia	Karyotype	Gonads	
				Right	Left
1	Female	Ambiguous genitalia: enlarged clitoris, 1.8 cm	46,XX	O	OT
2	Female	Ambiguous genitalia: 2-cm phallus; bifid fused labioscrotal folds	46,XX	O	OT
3	Female	Ambiguous genitalia: 3-cm phallus with chordee; fused labioscrotal folds	46,XX	OT	O
4	Female	Ambiguous genitalia: enlarged clitoris, 1×1.5 cm, with basal hypospadias; fused labioscrotal folds	46,XX ^a	OT	O
5	Male	Ambiguous genitalia: enlarged clitoris, palpable gonads	46,XX	OT	T
6	Female	Ambiguous genitalia: hypospadiac phallus; palpable right gonad	46,XX	OT	O
7	Male	Ambiguous genitalia: scrotal hypospadias; palpable gonads	46,XX	OT	T
8	Male	Ambiguous genitalia: enlarged clitoris, 1.8 cm; fused labioscrotal folds	46,XX	OT	T
9	Male	Ambiguous genitalia: 2-cm phallus	46,XX	OT	T
10	Male	Ambiguous genitalia: 1.9-cm phallus; scrotal hypospadias.	45,X/46,XY	DG	OT
11	Female	Ambiguous genitalia: 3-cm phallus; labioscrotal folds	46,XX/46,XY	OT	O
12	Male	Ambiguous genitalia: 2-cm phallus with labioscrotal hypospadias	46,XX/47,XXY	T	O

^aAfter FISH analysis, the final karyotype was 46,XX/47,XX, del(Y) (p?)

SRY sequencing

The PCR products of *SRY* amplifications in DNA from blood leukocytes and gonadal tissue were purified with the help of a QIAEX gel extraction Kit (Qiagen). Direct sequencing was performed using 3–10 ng DNA template/reaction on an ABI Prism 310 automated DNA sequencer (Applied Biosystems) using the Big Dye terminator kit (Applied Biosystems). PCR conditions and temperature program used for sequencing the amplified fragments of *SRY* were identical to those used for the initial PCR amplification.

FISH analysis

FISH analysis was performed in patients 1 and 4. In patient 1, we carried out the study in paraffin embedded gonadal tissue sections, using a LSCI (Vysis) DNA probe for *SRY* labeled with spectrum orange, and an X-chromosome centromeric region labeled with spectrum green as an internal control. In patient 4, FISH analysis on lymphocytes culture interphase nuclei was performed using a WCP painting probe for the entire Y chromosome, labeled with the spectrum orange fluorochrome (Vysis), and an X-chromosome centromeric probe as an internal control. Hybridization conditions were as previously described by Pinkel et al. (1986a, 1986b).

Results

PCR amplification

PCR amplification of the *SRY* gene in the nine 46,XX true hermaphrodites was negative in all cases in DNA ob-

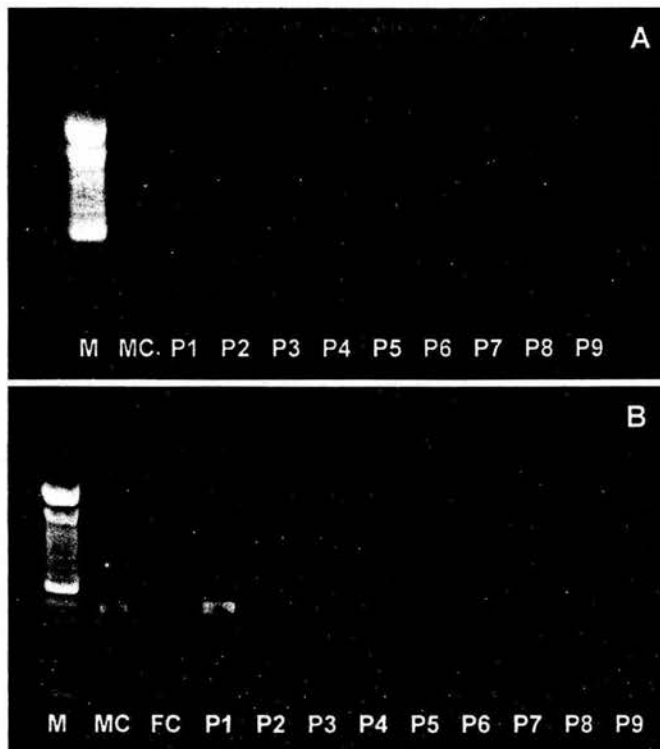


Fig. 1a, b PCR analysis of the HMG-box coding region of the *SRY* gene. **a** Leukocytic DNA. *M* molecular weight marker (100-bp ladder), *lane 2 MC* male control, *lanes 3–11* 46,XX TH (patients 1–9). No PCR products were observed in DNA from the nine patients. **b** Gonadal DNA. *Lane 3* female control (FC), *lanes 4–12* 46,XX TH (patients 1–9). An *SRY* PCR product, similar to the male control, was observed only in patient 1



Fig. 2. PCR analyses of Y-derived sequences in leukocytic DNA from a 46,XY normal male (*left panel*) and patient 4 (*right panel*). All Y sequences tested were present in the male control, while only Ycen and Yqh were observed in patient 4, suggesting a Yp deletion

tained from blood leukocytes, and also in eight of the cases in gonadal DNA (Fig. 1). Interestingly, patient 1 was positive for *SRY* in DNA from the ovarian and testicular portions of the ovotestes. PCR analyses of other Y sequences (PABY, ZFY, Ycen and Yqh) were negative in eight cases (including the *SRY*-positive case 1) in leukocytic and gonadal DNA. In contrast, Ycen and Yqh were amplified in leukocytic, gonadal, and fibroblastic DNA from patient 4 (Fig. 2). As these data suggest the presence of a second cell line with a Yp-deleted chromosome in this patient, a new karyotype was performed, but no Y chromosome was identified in 500 metaphases.

In patients 10–12, presenting mosaic karyotypes including a Y-bearing cell line, PABY, ZFY, *SRY*, Ycen, and Yqh were present. These sequences were also positive in DNA obtained from the ovarian region of the ovotestes from patient 11 (data not shown). The X-chromosome centromeric alphoid repeat used as an internal control was successfully amplified in all cases.

FISH analysis

To confirm PCR results in patient 1, we analyzed by FISH a testicular/ovarian fragment of the end-to-end ovotestes, using an *SRY*-specific DNA probe. As shown in Fig. 3, we identified the presence of an *SRY* hybridization signal in 14% of the testicular cells showing two X-chromosome centromeric signals. The *SRY* hybridization signal was also observed in cells from the ovarian portion of the ovotestes (Fig. 3b). Interestingly, *SRY* was always observed in close association with one X centromere, strongly suggesting that this gene was translocated to an X chromosome. To recognize the abnormal Y chromosome suggested by PCR analysis in patient 4, we performed FISH with a whole Y-chromosome painting probe on interphase nuclei, and an X centromeric region as an internal control. A low-level mosaicism (4%) containing a second cell line with a Y chromosome and two X-centromere signals (Fig. 4) revealed a 46,XX/47,XX, del (Y) (p?) final karyotype in this subject.

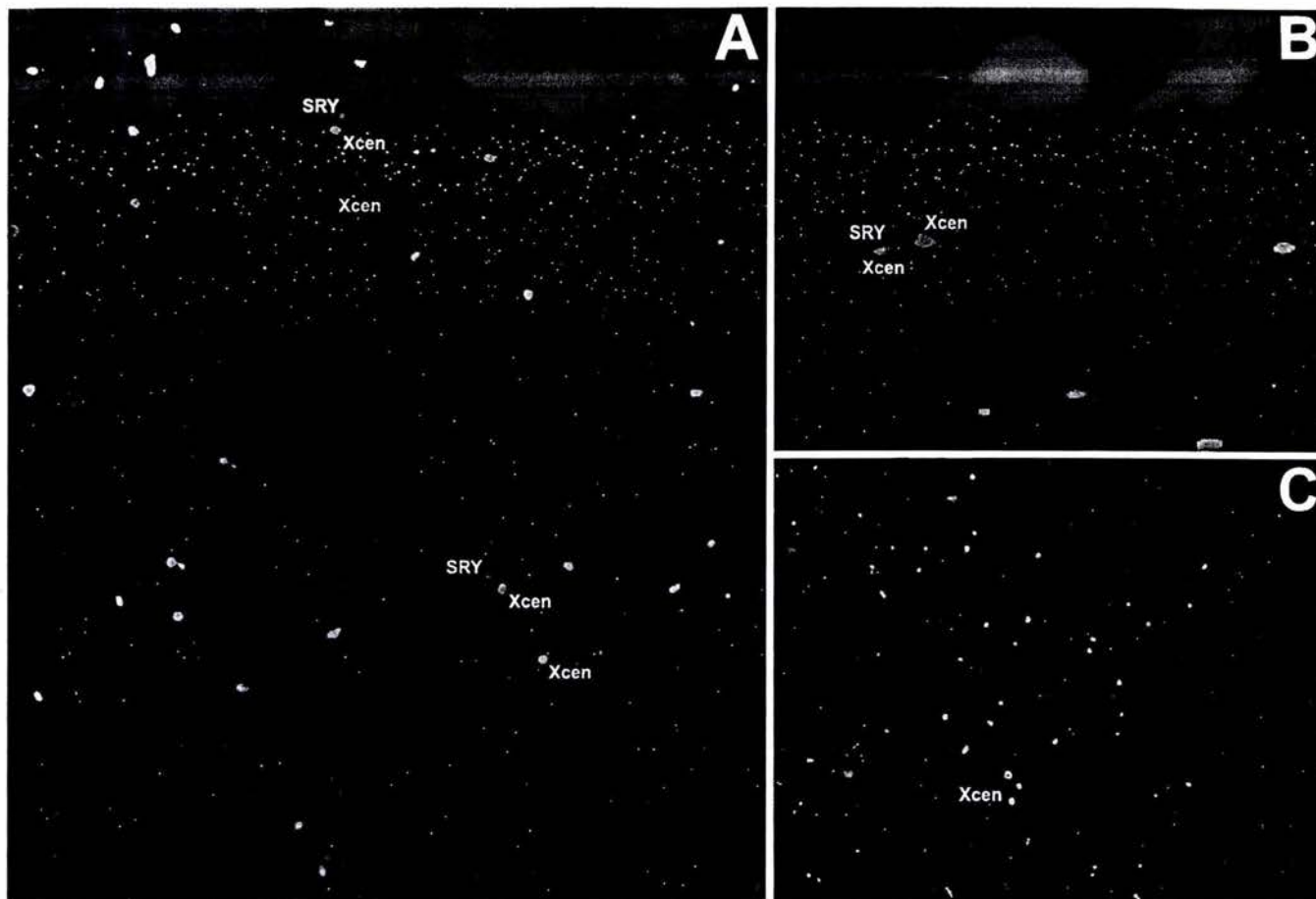


Fig. 3a–c FISH analysis in gonadal tissue cells. **a** Testicular portion of the ovotestes of patient 1, showing a cell with two green hybridization signals corresponding to both X centromeres. In addition, some cells show a red signal corresponding to *SRY*. **b** Ovarian portion of the same gonad showing cells with two green signals (X centromeres) and a red signal corresponding to *SRY*. **c** Testicular cells from an *SRY*-negative 46,XX ovotestes (patient 3) used as a control showing only the two X-centromeric signals

and hidden mosaicism for a Y chromosome or Y sequences in 46,XX patients (Hadjithanasiou et al. 1994; Inoue et al. 1998; Jiménez et al. 2000). In addition, duplication of 22q was recognized in one case of 46,XX *SRY*-negative

Sequencing of the *SRY* gene

SRY sequence was normal in DNA from the gonadal tissue of patient 1 and in leukocytic and gonadal DNA from patients 10–12.

Discussion

The process by which the indifferent gonad develops into either testis or ovary remains poorly understood. Therefore, the study of patients with true hermaphroditism might provide clues that can answer some of the questions about normal and abnormal gonadal development. Although TH is a very rare anomaly, it shows considerable genetic heterogeneity and different genetic abnormalities have been proposed as a cause of the dual gonadal development in these subjects: point mutations in the *SRY* gene in 46,XY patients (Braun et al. 1993; Hiort et al. 1995)

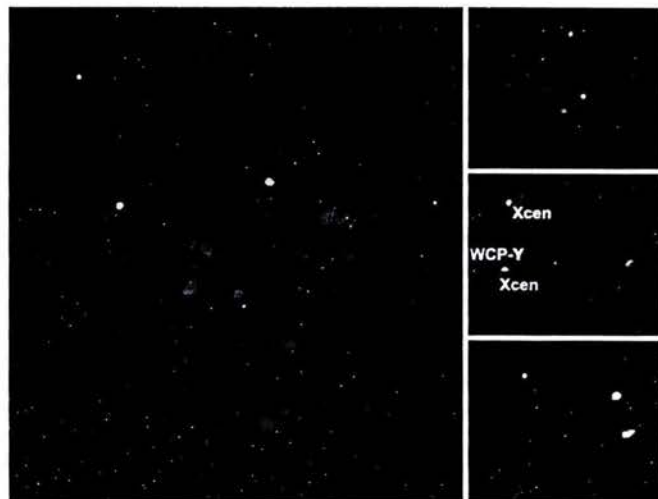


Fig. 4 FISH analysis using a whole Y-chromosome painting probe (*red*) and an X-chromosome centromeric probe (*green*). The metaphase and the lower interphase nucleus showed only two X-centromeric signals (46,XX), while the other two nuclei (from patient 4) exhibit two X centromeres plus a Y-chromosome signal (47,XXY)

true hermaphrodite (Aleck et al. 1999). However, cytogenetic analysis did not reveal abnormalities in chromosome 22 in any of our 12 patients. Molecular analyses showed that all nine 46,XX were true *SRY*-negative in leukocytic DNA, in accordance with most cases reported in the literature, (McElreavey et al. 1992, 1993; Boucekine et al. 1994; Torres et al. 1996, Domenice et al. 2001). On the other hand, eight of these patients were also *SRY*-negative in gonadal DNA, but in case 1 PCR and FISH analyses revealed the presence of *SRY*, indicating a gonadal mosaicism for this gene. The *SRY* FISH signal was always observed in close association with one X centromere, strongly suggesting that this gene was translocated to an X chromosome. The signal was observed inside and outside of the testicular cord; however, we cannot conclude which specific cell type carries the *SRY* gene. Other Y sequences tested by PCR in this patient were negative in leukocytic and gonadal DNA. These data confirm some previous reports in which *SRY* was negative in peripheral blood but positive in gonadal tissue, probably due to a "vanishing" mosaicism (Hadjiathanasiou et al. 1994; Inoue et al. 1998; Jiménez et al. 2000). The mechanism to explain an individual with *SRY* mosaicism limited to the gonad could be an illegitimate X/Y recombination during paternal meiosis; the subject received the paternal X carrying the *SRY* gene, which allows partial testicular differentiation with a subsequent *SRY* loss in most cell lines. It is unknown whether *SRY* is preferentially retained in testicular tissue where it has a critical role, or whether it may be present in other organs.

SRY was recognized by FISH in only 14% of testicular cells of patient 1, suggesting that this low percentage was not enough to induce complete testis development and leads to ovotestes formation. Another interesting finding in this patient was the identification of *SRY* by FISH in the ovarian portion of the gonad. These data indicate that the presence of this gene in undifferentiated gonadal cells does not guarantee the development of testicular tissue nor inhibit ovarian development, as recently shown by Salas-Cortes et al. (2000). Ovarian development in the presence of *SRY*-bearing cells, might be related to non-acting *SRY* alleles, as suggested by experiments in murine models (Palmer and Burgoyne 1991a, 1991b; Patek et al. 1991). According to these data, it could be proposed for our patient that normal acting *SRY* alleles gave rise to testicular cells, while non-acting *SRY* alleles originate ovarian cells. This difference in *SRY* functionality is probably due to random X-chromosome inactivation, as previously suggested (Fechner et al. 1994; Capel et al. 1999).

Patient 4 was initially classified as a 46,XX true hermaphrodite. However, PCR results revealed the presence of Ycen and Yqh sequences in leukocytic, gonadal, and fibroblastic DNA. These data were confirmed by FISH analyses using a Y probe that revealed a low-level percentage (4%) of Y-chromosome mosaicism in interphase nuclei; each Y-positive nucleus showed two X-centromeric signals, indicating that the second cell line was 47,XX, del (Y) (p?). As *SRY* was lost due to the Yp deletion, testicular differentiation in this patient could not be

attributable to this gene and probably arises from molecular defects in autosomal or X-linked genes, which also participates in the testicular developmental cascade. On the other hand, the presence of X polysomy in our patient is an interesting finding that could be related to the gonadal phenotype. Recently, Aviv et al. (2001), studying a 46,X,del (Yp) *SRY*-negative fetus, demonstrated the presence of X polysomy restricted to the ovary and suggested that this is a postzygotic event which arises to facilitate ovarian development in the absence of the necessary factors for normal gonadal development (Aviv et al. 2001). Finally, the *SRY* nucleotide sequence in our four positive true hermaphrodites (patients 1, 10–12) was normal, excluding *SRY* mutations, as in the cases described by Braun et al. (1993) and by Hiort et al. (1995).

In conclusion, in this study we demonstrated by PCR and FISH analyses the presence of hidden mosaicism for Y sequences in 46,XX TH as an alternative etiologic mechanism for the disease.

Acknowledgements We wish to thank Dr. Eric Vilain for critically reading the manuscript. This work was supported by a CONACYT grant number G28494M and by the Research Division of the General Hospital of Mexico.

References

- Aleck KA, Argueso L, Stone J, Hackel JG, Erickson RP (1999) True hermaphroditism with partial duplication of chromosome 22 and without *SRY*. *Am J Med Genet* 85:2–4
- Aviv H, Heller D, Fajardo A, Hoot A, Mavaro L (2001) Sex chromosome mosaicism in gonads of a fetus with cystic hygroma and deletion of the short arm of Y chromosome including loss of *SRY*. *Am J Med Genet* 102:157–160
- Banerjee, SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR (1995) Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *Biotechniques* 18: 768–770, 772–773
- Berkovitz GD, Fechner PY, Marcantonio SM, Bland G, Stetten G, Goodfellow PN, Smith KD, Migeon CJ (1992) The role of the sex-determining region of the Y chromosome (*SRY*) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Hum Genet* 88:411–416
- Boucekine C, Toublanc JE, Abbas N, Chaambouni S, Ouahid S, Semrouni M, Jaubert F, Toublanc M, McElreavey K, Vilain E (1994) Clinical and anatomical spectrum in XX sex reversed patients. Relationship to the presence of Y-specific DNA sequences. *Clin Endocrinol* 40:733–742
- Braun A, Kammerer S, Cleve H, Löhrs U, Schwarz H-P, Kuhnle U (1993) True hermaphroditism in a 46,XY individual, caused by a postzygotic somatic point mutation in the male gonadal sex-determining locus (*SRY*): molecular genetics and histological findings in a sporadic case. *Am J Hum Genet* 52:578–585
- Capel B, Albrecht KH, Washburn LL, Eicher EM (1999) Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on *Sry*. *Mech Dev* 84:127–31
- Damiani D, Fellous M, McElreavey K, Barbaux S, Barreto ESA, Dichtchehenian V, Setian N (1997) True hermaphroditism: clinical aspects and molecular studies in 16 cases. *Eur J Endocrinol* 136:201–204
- Domenice S, Nishi MY, Billerbeck AE, Carvalho FM, Frade EM, Latronico AC, Arnold IJ, Mendonca BB (2001) Molecular analysis of *SRY* gene in Brazilian 46,XX sex reversed patients: absence of *SRY* sequences in gonadal tissue. *Med Sci Monit* 7:238–241

- Fechner PY, Roseberg C, Stetten G, Cargile C, Pearson PL, Smith KD, Migeon CJ, Berkovitz GD (1994) Non random inactivation of the Y-bearing X chromosome in a 46,XX individual: evidence for the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Cytogenet Cell Genet* 66:22-26
- Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME (1992) SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J* 11:4497-4506
- Hadjiathanasiou CG, Brauner R, Lortat-Jacob S, Nivot S, Jaubert F, Fellous M, Nihoul-Fekete C, Rappaport R (1994) True hermaphroditism: genetic variants and clinical management. *J Pediatr* 125:738-744
- Hiort O, Gramss B, Klaubert GT (1995) True hermaphroditism with 46,XY karyotype and a point mutation in the *SRY* gene. *J Pediatr* 126:1022
- Inoue H, Nomura M, Yanase T, Ichino I, Goto K, Ikuyama S, Takayanagi R, Nawata H (1998) A rare case of 46,XX true hermaphroditism with hidden mosaicism with sex-determining region Y chromosome-bearing cells in the gonads. *Intern Med* 37:467-471
- Jimenez R, Sanchez A, Burgos M, Diaz de la Guardia R (1996) Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet* 2:164-166
- Jimenez AL, Kofman-Alfaro S, Berumen J, Hernandez E, Canto P, Mendez JP, Zenteno JC (2000) Partially deleted *SRY* gene confined to testicular tissue in a 46,XX true hermaphrodite without *SRY* in leukocytic DNA. *Am J Med Genet* 93: 417-420
- Krob G, Braun A, Kuhnle U (1994) True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes, and gonadal histology. *Eur J Pediatr* 153: 2-10
- McElreavey K, Rappaport R, Vilain E, Abbas N, Richaud F, Lortat-Jacob S, Berger R, Le Coniat M, Boucekckine C, Kucheria K, Temtamy S, Nihoul-Fékete C, Brauner R, Fellous M. (1992) A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including *SRY*. *Hum Genet* 90:121-125
- McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz Y, Fellous M (1993) A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: *SRY* represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3368-3372
- Palmer SJ, Burgoyne PS (1991a) In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* 112: 265-268
- Palmer SJ, Burgoyne PS (1991b) XY follicle cells in the ovaries of XO/XY and XO/XY/XYY mosaic mice. *Development* 111: 1017-1019
- Patek CE, Kerr JB, Gosden RG, Jones KW, Hardy K, Muggleton-Harris AL, Handyside AH, Whittingham DG, Hooper ML (1991) Sex chimaerism, fertility and sex determination in the mouse. *Development* 11:311-325
- Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H (1986a) Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1:151-157
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986b) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938
- Ramsay M, Bernstein R, Zwane E, Page DC, Jenkins T (1988) XX true hermaphroditism in southern African blacks: an enigma of primary sexual differentiation. *Am J Hum Genet* 43: 4-13
- Salas-Cortes L, Jaubert F, Nihoul-Fekete C, Brauner R, Roseblatt M, Fellous M (2000) SRY protein is expressed in ootestis and streak gonads from human sex-reversal. *Cytogenet Cell Genet* 91:212-216
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York
- Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B (2000) *Sry* induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* 127:65-73
- 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* 346:240-244
- Torres L, Lopez M, Mendez JP, Cervantes A, Alfaro G, Perez-Palacios G, Erickson RP, Kofman-Alfaro S (1996) Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Med Genet* 63:348-355
- Van Niekerk WA, Retief AE (1981) The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet* 58:117-122
- Wachtel SS (1994) XX sex reversal in the human. In: Wachtel SS (ed) *Molecular genetics of sex determination*. Academic Press, San Diego, pp 260-285
- Zenteno JC, López M, Vera C, Mendez JP, Kofman-Alfaro S (1997) Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Hum Genet* 100:606-610