

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DEL GEN WNT-4 EN PACIENTES CON
DIAGNOSTICO COMPROBADO DE HERMAFRODITISMO
VERDADERO 46,XX O SINDROME DE VARON XX

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLOGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

PRESENTA
ROCIO SELENE RAZO SANCHEZ

DIRECTOR(A) DE TESIS: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

MEXICO, D.F.



FEBRERO DEL 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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

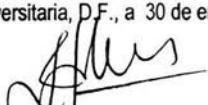
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 01-diciembre-2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Razo Sánchez Rocío Selene**, con número de cuenta 90197666, con la tesis titulada: **"Análisis del gen WNT-4 en pacientes con diagnóstico comprobado de hermafroditismo verdadero 46,XX o Síndrome de varón XX"**, bajo la dirección del(a) **Dra. Ileana Patricia Canto Cetina**.

Presidente:	Dra. Leticia Morales Ledesma
Vocal:	Dra. Leda Carolina Torres Maldonado
Secretario:	Dra. Ileana Patricia Canto Cetina
Suplente:	Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez
Suplente:	Dra. Cristina Aleida Olivares Segura

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de enero de 2004


Dr. Juan J. Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca 167212.

A la División de Formación de personal para la Investigación del IMSS por el complemento de beca, otorgados durante la realización de esta tesis.

Al Fondo para el Fomento de la Investigación Médica (IMSS-2002/014) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra Leticia Morales Ledesma

Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Dra. Cristina Aleida Olivares segura

Dr. Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Por el tiempo invertidos en la revisión de esta tesis y por sus valiosas sugerencias.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental para el desarrollo de esta tesis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

A el Dr. Juan Pablo Mendez Blanco, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Biología del Desarrollo, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Por permitirme realizar este trabajo en dicha unidad.

A la Dra. Ileana Patricia Canto Cetina por el apoyo y asesoría brindada.

A la Dra. Daniela Nora Soderlünd Seoane, de la Unidad de Investigación Médica en Biología del desarrollo, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Por las muestras proporcionadas para la realización de este trabajo.

A la Dra. María de la Luz Ruiz Reyes y al Dr. Raúl Calzada León, del Servicio de Endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud. Por las muestras proporcionadas para la realización de este trabajo.

A mi familia: Con infinito amor

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1
• Diferenciación sexual normal	1
• Alteraciones de la diferenciación sexual	9
• Hermafroditismo verdadero	9
• Síndrome de varón XX	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
OBJETIVO	14
HIPÓTESIS	14
SUJETOS	15
MÉTODOS	20
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48

ABREVIATURAS

FDT : Factor Determinante Testicular

SRY : Gen determinante del sexo del cromosoma Y

HV 46,XX : Hermafrodita Verdadero 46,XX

Fz : Receptor frizzled

Dsh : Proteína Dishevelled

GSK-3 β : Cinasa de la glucógeno sintetasa

TCF : Factor de transcripción específico de linfocitos T

Pb : pares de bases

DSS : Gen de la reversión sexual sensible a dosis

HIM . Hormona inhibidora de los Müllarianos

T : Testosterona

DHT : Dihidrotestosterona

EDTA : Etilen diamino tetra acetato disódico

ddH₂O : Agua bidestilada

SDS : Sulfato dodecílico sódico

RESUMEN

La diferenciación sexual en el humano es un proceso aún no totalmente dilucidado que involucra una cascada de eventos, iniciada por la presencia y acción del factor determinante testicular (FDT). Sin embargo, existen algunas alteraciones de la diferenciación sexual en las cuales se ha observado desarrollo testicular en ausencia del gen determinante del sexo del cromosoma Y (*SRY*), como en hermafroditas verdaderos 46,XX (HV 46,XX) y en varones XX. Con base en lo anterior, se ha propuesto la existencia de genes localizados en autosomas o ligados al cromosoma X que intervienen en el desarrollo gonadal. Estudios llevados a cabo en ratones XX muestran que la delección homocigota de *Wnt-4* conduce a una masculinización caracterizada por presentar un fenotipo gonadal masculino; ausencia de derivados Mülllerianos y diferenciación de los conductos Wolffianos, con lo que concluyen que el gen *Wnt-4* es esencial para el desarrollo del sistema reproductivo femenino. Otros estudios en ratones han demostrado que WNT-4 puede reprimir la migración de células endoteliales y esteroideogénicas en la gónada XX en desarrollo, evitando tanto la formación de una vasculatura específica del macho como la producción ectópica de esteroides.

En este trabajo se llevó a cabo el estudio molecular en sangre periférica del gen *WNT-4* en 12 pacientes HV 46,XX y 7 pacientes con síndrome de varón XX. Sin embargo, no se encontraron mutaciones en el marco de lectura de los cinco exones que constituyen al gen *WNT-4* en ninguno de los pacientes analizados. Estos hallazgos indican que la alteración molecular pudiese ser secundaria a la presencia de mutaciones en la región promotora o las regiones intrónicas del gen, o bien que la alteración molecular se encuentre confinada en el tejido gonadal. Otra explicación

plausible es que estas entidades patológicas sean secundarias a la presencia de mutaciones en otros genes localizados en autosomas o ligados al cromosoma X que intervienen en la cascada de la diferenciación sexual.

INTRODUCCIÓN

DIFERENCIACIÓN SEXUAL NORMAL

La diferenciación sexual constituye uno de los fenómenos biológicos de mayor trascendencia y complejidad, el cual permite la perpetuación de las especies con reproducción sexual. El dimorfismo sexual es resultado de una serie de eventos que se presentan en las etapas más tempranas de la vida, requiriéndose un alto grado de precisión en sus mecanismos de regulación. Este se presenta en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica (1). La diferenciación cromosómica se inicia con la fertilización, al momento en que un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza a un óvulo que aporta un cromosoma X. De esta forma, se establece el dimorfismo sexual que caracteriza a los mamíferos, en los cuales la hembra presenta un complemento cromosómico sexual XX y el macho XY; los eventos posteriores en la diferenciación sexual, dependerán de la presencia de factores determinantes de masculinización (1). La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma (2,3). En la Figura 1 se puede observar la cascada de la diferenciación sexual (4).

En el humano, el dimorfismo sexual gonadal se inicia en la sexta semana de la vida intrauterina (5,6). Desde el punto de vista embriológico, la gónada primitiva se forma por dos tipos de células: las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales (7). La gónada primitiva se transformará en testículo si está presente y actúa el factor determinante testicular (FDT) localizado en el cromosoma Y; de no existir éste, la gónada primitiva se diferenciará hacia ovario (8,9).

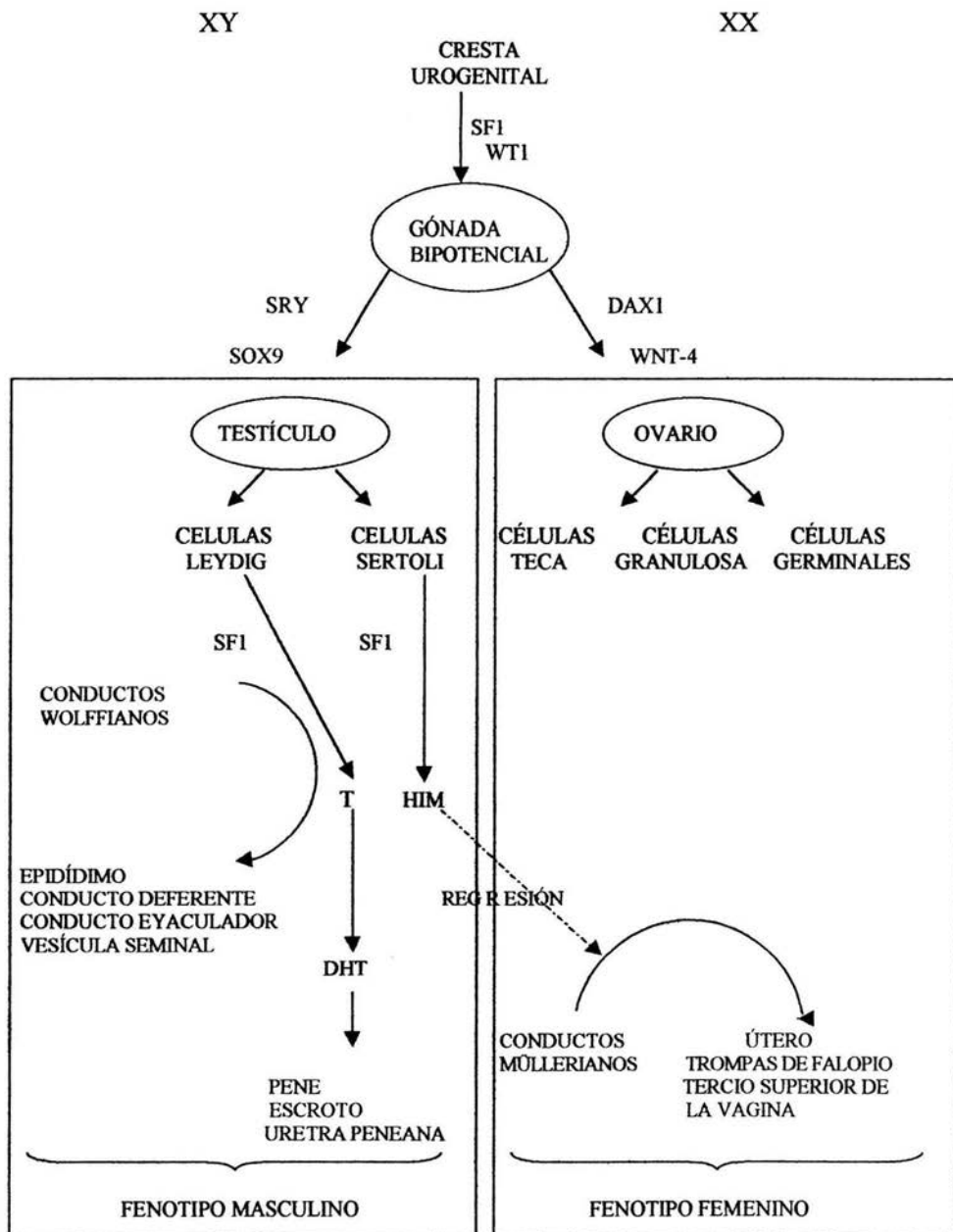


Figura 1.- Cascada de la diferenciación sexual masculina y femenina. T (testosterona), DHT (dihidrotetosterona), HIM (hormona inhibidora de los Müllnerianos), (Modificado de la referencia 4).

A lo largo del tiempo se ha tratado de caracterizar al FDT por lo que se han postulado diversas secuencias y genes que supuestamente correspondían al FDT (10-13), no fue hasta 1990, en que Sinclair y cols. (8) identificaron al gen que induce la diferenciación de la gónada primitiva hacia testículo, denominándosele gen determinante del sexo del cromosoma Y (*SRY*). Diversas evidencias en la literatura apoyan que el gen *SRY* es el FDT (8,9,14-21). Sin embargo; existen algunas alteraciones de la diferenciación sexual en las cuales se ha observado desarrollo testicular en ausencia del *SRY*, como en los hermafroditas verdaderos 46,XX y en varones XX. Con base en lo anterior, se ha propuesto la existencia de genes localizados en autosomas o ligados al cromosoma X que intervienen en el desarrollo gonadal constituyéndose como componentes de una cascada génica responsable de los programas de morfogénesis y diferenciación gonadal (4,22-34) (Figura 1).

Vainio y cols. (33), demostraron en ratones que el gen *Wnt-4* es esencial para el desarrollo del sistema reproductivo femenino y suprime el desarrollo del masculino. En ratones macho la delección de este gen no altera la diferenciación de los conductos Wolffianos ni de los testículos; por el contrario en las ratones hembra, la delección homocigota conduce a una masculinización caracterizada por fenotipo gonadal masculino, ausencia de derivados Mülllerianos y diferenciación de los conductos Wolffianos. Con base en estas observaciones los autores sugieren que el gen *Wnt-4* es esencial para la diferenciación sexual femenina. Recientemente en un trabajo realizado por Jeays-Ward y cols. (35) en ratones XX nulos para *Wnt-4*, observan la presencia de vasos sanguíneos celómicos en el ovario los cuales son específicos de la gónada del macho, así ellos demuestran y concluyen que *Wnt-4* es capaz de reprimir la migración de células endoteliales desde el mesonefros a la gónada XX evitando la formación de

vasculatura específica del macho. Asimismo, este gen también evita la migración de células esteroidogénicas a la gónada XX en desarrollo, impidiendo así la producción ectópica de esteroides por lo que se inhibe el desarrollo del fenotipo masculino.

Las proteínas Wnt pertenecen a la gran familia de ligandos ricos en cisteínas, secretados en forma glicosilada que controlan el desarrollo de diversos organismos, que van desde los nemátodos hasta los mamíferos. Estas proteínas actúan a nivel celular local al regular la proliferación, morfología, motilidad y el destino celular (36-38). Las proteínas Wnt se unen a los receptores Frizzled, denominados de esa forma debido al gen de la polaridad del tejido *frizzled* (*fz*) de la *Drosophila*. Estos receptores, están formados por un dominio extracelular al cual se une Wnt, siete dominios transmembranales y un dominio intracelular, por lo que forman parte de la superfamilia de receptores con 7 dominios transmembranales (37,39). En los mamíferos existen alrededor de 16 ligandos Wnt y 8 receptores Frizzled que regulan las diferentes respuestas celulares (40). En los vertebrados se han identificado dos mecanismos por los cuales actúan las proteínas Wnt: 1) por una activación transcripcional que se presenta como resultado de la mediación de las proteínas G que modulan la concentración interna del calcio (39) y 2) la activación se realiza a través de la interacción entre la β -catenina y TCF (factor de transcripción específico de linfocitos-T) (37) (Figura 2).

La proteína Wnt-4 es un miembro de la familia de proteínas Wnt que se encuentra involucrada en la determinación del sexo. Esta proteína actúa en forma local vía unión al receptor Frizzled e interviene en la cascada de señales intracelulares que conducen a la activación transcripcional de genes huéspedes (37).

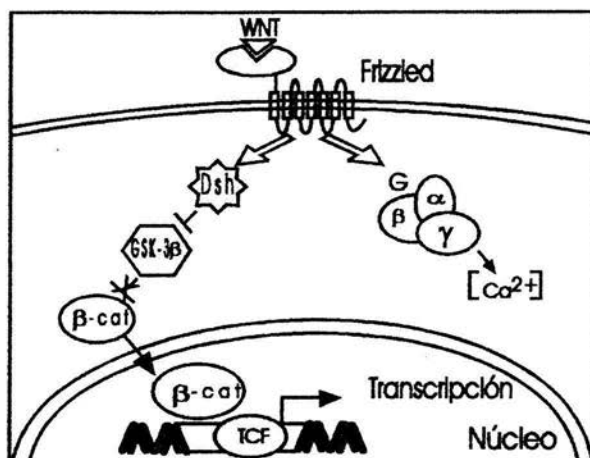


Figura 2.-Mecanismos de transcripción de las proteínas Wnt. La unión del ligando Wnt a su receptor Frizzled puede tener dos mecanismos de acción: a la izquierda ésta unión activa a la proteína Dishevelled (Dsh) la cual a su vez inhibe la actividad de la cinasa GSK-3β (cinasa de la glucógeno sintetasa). Debido a que GSK-3β promueve la inestabilidad de β -catenina, la señal Wnt incrementa los niveles de β -catenina, la cual se trasloca al núcleo formando un complejo con el factor de transcripción específico de linfocitos T (TCF); este complejo puede activar la transcripción de genes blanco. A la derecha la ruta puede ser regulada mediante un mecanismo que involucra a proteínas G modulando la concentración de calcio (Ca²⁺), (Modificado de la referencia 37).

El gen *WNT-4* en el humano se localiza en el cromosoma 1, específicamente en la banda p35 y está formado por 5 exones; el exón 1 está constituido por 88 pares de bases (pb), el exón 2 por 233 pb, el exón 3 por 132 pb, el exón 4 por 143 pb y el exón 5 por 469 pb. Este gen codifica para una proteína de secreción de 351 aminoácidos con un peso molecular de 25 kDa (Figura 3). La proteína WNT-4 del humano y del ratón presentan una homología en su secuencia del 99.7% (34).

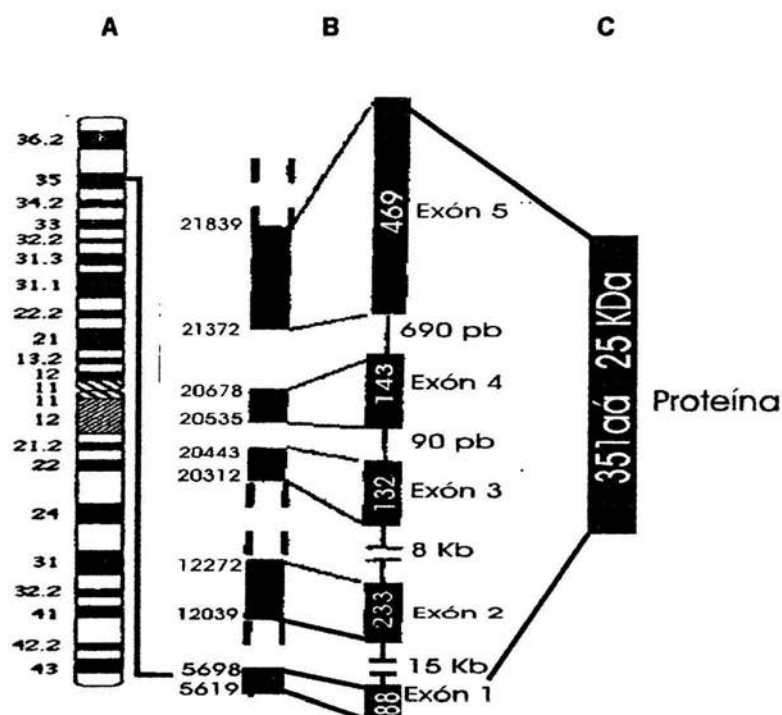


Figura 3.- Localización cromosómica (A), estructura intrón-exón (B) y proteína *WNT-4* (C), (Modificado de la referencia 41).

La gónada del ratón se diferencia a partir del día 11 poscoito, por lo que *Wnt-4* se expresa en ese momento en el mesénquima de la gónada indiferenciada de ambos sexos y en el mesonefros, pero esta expresión se encuentra ausente en los túbulos mesonéfricos y en los conductos Wolffianos. Al iniciarse la diferenciación sexo específica de la gónada (alrededor del día 11.5 poscoito), la expresión de *Wnt-4* se encuentra regulada en forma negativa en la gónada masculina, pero se mantiene en el ovario en desarrollo. Esto indica que *Wnt-4* pudiese regular en forma negativa el camino de la diferenciación masculina y sugiere que desempeña un rol importante en el desarrollo del ovario (33) (Figura 1).

En un estudio llevado a cabo por Jordan y cols. (34), en un sujeto con reversión sexual XY (caracterizado por ambigüedad genital, presencia de derivados Müllermanos y Wolffianos y desarrollo de estrías gonadales) con una duplicación por citogenética de 1p31-1p35, demostraron que el gen *WNT-4* se encontraba duplicado. Dicha duplicación alteraba la expresión de *WNT-4*, el cual se expresaba en fibroblastos del sujeto con reversión sexual XY y no se expresaba en los fibroblastos de controles masculinos. Dicha observación demuestra que existe una pérdida en la regulación de la expresión de *WNT-4* en al menos un tipo de tejido y posiblemente dicha pérdida de la regulación de la expresión de *WNT-4* se presentó también en la gónada en desarrollo, alterándose el fenotipo gonadal. Asimismo, los investigadores postulan que *Wnt-4* regula en forma positiva la expresión de *Dax1* (otro gen que interviene en la cascada de la diferenciación sexual) (24,42,43) y con base en ello, probablemente la sobreexpresión de *WNT-4* en sujetos con disgenesia gonadal XY resulte de una regulación positiva de *DAX1* en el tejido gonadal. Por otro lado, la regulación positiva de *WNT-4* semeja al fenotipo observado en los sujetos con reversión sexual XY que presentan duplicación del gen *DSS* (gen de la reversión sexual sensible a dosis) (34).

En ausencia del gen determinante del testículo, el primordio gonadal posee una tendencia inherente a desarrollarse como ovario siempre y cuando existan células germinales, continuándose con la proliferación del epitelio celómico y el desarrollo de las células germinales que se transforman en ovogonias. En el caso de que no existan células germinales se formarán estrías fibrosas incapaces de producir hormonas sexuales femeninas durante la pubertad (44-46).

La formación de los fenotipos masculino o femenino está determinada por la acción de las hormonas sintetizadas por cada gónada específica. El mecanismo que induce este

dimorfismo en los mamíferos fue descrito originalmente por Jost (47,48) quien demostró, que al diferenciarse la gónada primitiva a testículo su producción hormonal induce el desarrollo del fenotipo masculino; en cambio, si la diferenciación gonadal se da hacia ovario, el fenotipo, aparentemente de manera pasiva, será femenino (Figura 1). La ausencia temprana de gónadas fetales también induce un fenotipo femenino, lo cual apoya el concepto de inactividad endócrina del ovario fetal (46). Los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital, pliegues genitales y engrosamientos labioescrotales) (49).

Las estructuras primordiales del tracto genital que dan origen a los genitales internos, incluyen dos sistemas de conductos que se encuentran presentes en todos los embriones: los conductos Wolffianos y los conductos Müllerianos (49) (Figura 1).

El desarrollo del fenotipo masculino está determinado por el efecto de tres hormonas fetales sobre los primordios genitales. La primera de ellas, secretada por las células de Sertoli del testículo, es la hormona inhibidora de los Müllerianos (HIM) que se encarga de inducir la involución de los conductos Müllerianos, proceso que se observa en la séptima semana de la gestación y concluye en la décima con la desaparición de estas estructuras. Inmediatamente después de iniciada la síntesis de la HIM las células intersticiales del testículo fetal se citodiferencian en células de Leydig. Estas servirán como sustrato anatómico para la síntesis y secreción de testosterona (T), que es la segunda hormona fetal. El efecto virilizante de la T se ejerce sobre los conductos Wolffianos que se diferencian a epidídimo, conducto deferente, vesículas seminales y conducto eyaculador. La síntesis de T a partir de colesterol requiere de la presencia de diversos sistemas enzimáticos diferentes, que poseen regulación génica autosómica independiente (46).

La T es el precursor de la tercera hormona fetal virilizante, la dihidrotestosterona (DHT). Esta, se forma en la célula blanco por la acción de la 5 α -reductasa extragonadal y es la mediadora intracelular de la gran mayoría de las acciones de los andrógenos. Dicha hormona, es la única responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata durante la embriogénesis (50-52) (Figura 1).

Durante la embriogénesis, el ovario no secreta HIM ni T. La ausencia de estas dos hormonas ocasiona la persistencia de los conductos Mülllerianos y la regresión de los conductos Wolffianos (46) (Figura 1).

ALTERACIONES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Las alteraciones en cualquier estadio de la diferenciación sexual, durante la embriogénesis, conducen a la presencia de malformaciones en el desarrollo sexual. Estas pueden ser clasificadas de acuerdo con la etapa de desarrollo en la que se presenten; ésto es, en errores cromosómicos, errores del sexo gonadal o errores en el sexo fenotípico. (46,53-55). El hermafroditismo verdadero y el síndrome de varón XX se encuentran clasificadas dentro de las alteraciones en la traducción del sexo cromosómico al sexo gonadal. En estas alteraciones no se ha podido dilucidar con precisión, en un gran porcentaje de ellas, las causas que las determinan (46,56-58).

HERMAFRODITISMO VERDADERO

El hermafroditismo verdadero (HV) es una de las variantes más raras de los estados intersexuales en el humano (59-62). Los individuos afectados poseen tanto tejido ovárico como testicular, ya sea en gónadas separadas o formando un ovotestes. El tejido

ovárico debe contener folículos mientras que en el tejido testicular debe haber presencia de túbulos seminíferos (59-62).

La gónada que con mayor frecuencia se observa en esta entidad patológica es el ovotestes, siendo su localización variable (intrapélvica, inguinal o labioescrotal). La función endocrina y gametogénica está conservada en el ovario y en la porción ovárica del ovotestes; en cambio el tejido testicular, ya sea aislado o como parte del ovotestes, es habitualmente anormal en términos tanto de producción hormonal como de gametogénesis (59-64). La ambigüedad tanto de los genitales internos y externos dependerá de la producción hormonal de las gónadas existentes. En la mayoría de los casos los individuos presentan un fenotipo genital tendiente hacia la masculinización y debido al tamaño del falo al nacimiento, el sexo de asignación generalmente es masculino (59,60,63). La presencia de ginecomastia es común durante la pubertad y alrededor del 50% de los HV presentan menstruación (46). En dos tercios de los casos de HV se observa un cariotipo 46,XX, siguiéndole en frecuencia el 46,XX/46,XY, el 46,XY y otros mosaicos cromosómicos (31,46,60,63).

El HV es una condición genéticamente heterogénea; se han postulado tres mecanismos posibles en el desarrollo de tejido testicular en el HV 46,XX: 1) un mosaicismo oculto con una línea celular con cromosoma Y, 2) translocación de material del cromosoma Y (incluyendo al gen *SRY*) al cromosoma X o a los autosomas y 3) mutaciones en genes autosómicos o ligados al cromosoma X que permiten el desarrollo de tejido testicular en ausencia del gen *SRY* (46,65). Sin embargo, la gran mayoría de HV 46,XX (75%) son *SRY* negativos (31,66,67), por lo que el desarrollo del tejido testicular podría deberse a mutación (es) en algún (os) gen (es) que actúa (n) "corriente arriba" o "corriente abajo" en la cascada de la diferenciación sexual (46,68).

SÍNDROME DE VARON XX

El síndrome de varón XX se caracteriza por la presencia de testículos bilaterales en individuos con cariotipo 46,XX (69,70). Esta es una entidad patológica poco frecuente (46) y la mayoría de los casos son esporádicos, aunque se han reportado en la literatura familias con varios miembros afectados (46,71,72).

En el 85% de los varones XX, los genitales externos se encuentran virilizados y la mayoría de los sujetos afectados consultan en la adolescencia o en la vida adulta por presentar microgenitalia, ginecomastia con o sin infertilidad. En el 15% restante, los genitales externos son ambiguos, por lo que pueden ser diagnosticados al nacimiento o en la infancia (46,73). Los genitales internos son masculinos. El estudio histológico de los testículos demuestra disminución en número y tamaño de los túbulos seminíferos, hiperplasia de células de Leydig y ausencia de espermatogénesis (46). El perfil hormonal es normal durante la infancia, a partir de la cual se presenta un deterioro en la función gonadal progresiva lo cual conduce a un hipogonadismo hipergonadotrópico (74).

Al igual que en los HV 46,XX se han propuesto los mismos mecanismos para explicar la diferenciación testicular en sujetos con cariotipo 46,XX (46). Los estudios que involucran a genes marcadores ligados al cromosoma X, así como ligados al cromosoma Y (75), las observaciones citogenéticas (76) y los análisis genéticos moleculares (9,77), han demostrado la presencia del gen *SRY* en el 80% de los varones XX, datos que apoyan la hipótesis de un intercambio desigual entre los cromosomas Y-X durante la meiosis paterna. Sin embargo, alrededor del 20% de los varones XX son *SRY* negativos (46,71,78,79) e incluso se han reportado diversos casos en los cuales en un mismo árbol

genealógico coexisten HV 46,XX y varones XX, SRY negativos (46,65,78,80,81). Estos datos fortalecen la posibilidad de que ambas entidades patológicas, constituyen parte del espectro de la misma alteración pudiéndose expresar en fenotipos diferentes, dependiendo del genoma predisponente (31,46,80).

Al igual que en los hermafroditas verdaderos, se ha propuesto la existencia de mutación (es) en algún (os) gen (es) que actúa (n) "corriente arriba" o "corriente abajo" en la cascada de la diferenciación sexual, que pudiese (n) dar lugar a dicha entidad patológica (46).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diferenciación sexual en el humano es un proceso aún no totalmente dilucidado que involucra una cascada de eventos, los cuales inician en la cresta genital indiferenciada en donde genes autosómicos o ligados al sexo dirigen el desarrollo ovárico o testicular. Esta diferenciación es iniciada por la presencia y acción del factor determinante testicular (FDT), y a pesar de que diversas evidencias en la literatura apoyan que el gen *SRY* es el FDT (8,9,14-21), existen algunas alteraciones de la diferenciación sexual en las cuales se ha observado desarrollo testicular en ausencia del *SRY*, como en hermafroditas verdaderos 46,XX y en varones XX. Por lo que se ha propuesto la existencia de otros genes autosómicos o ligados al cromosoma X que intervienen en el desarrollo gonadal constituyéndose como componentes de una cascada génica responsable de los programas de morfogénesis y diferenciación gonadal (22-34).

Se ha postulado que el gen *WNT-4* posiblemente regula en forma negativa el camino de la diferenciación sexual masculina, por lo que la ausencia de este gen conduce a la masculinización de los ratones XX (33-35,82).

Sin embargo hasta el momento actual, no se ha podido dilucidar con precisión las causas que determinan a la mayoría de los individuos con diagnóstico de HV 46,XX y de síndrome de varón XX; así como, tampoco se ha analizado la secuencia del gen *WNT-4* en estos padecimientos, por lo que es importante ampliar los conocimientos sobre el papel que juega el gen *WNT-4* en estas entidades patológicas.

OBJETIVO

Estudiar la secuencia de los cinco exones que conforman al gen *WNT-4*, a partir del ADN genómico extraído de sangre periférica de pacientes con diagnóstico comprobado de hermafroditismo verdadero 46,XX o con diagnóstico de síndrome de varón XX.

HIPÓTESIS

En los pacientes con diagnóstico comprobado de hermafroditismo verdadero 46,XX o con diagnóstico de síndrome de varón XX, existe(n) alguna(s) mutación(es) en la secuencia de alguno(s) de los 5 exones que constituyen al gen *WNT-4*.

SUJETOS

Los pacientes que se incluyeron en este estudio (12 con diagnóstico comprobado de hermafroditismo verdadero 46,XX y 7 con síndrome de varón XX) fueron de origen étnico mestizo mexicano y pertenecían a familias diferentes. Las características clínicas individuales de cada uno de los pacientes se observan descritas en las tablas 1 y 2. En todos los pacientes con síndrome de varón XX al igual que en 6 de los sujetos HV, 46,XX, el sexo de asignación fue masculino, mientras que en los otros 6 pacientes con HV 46,XX el sexo de asignación fue femenino. El rango de edad de los pacientes HV 46,XX fue de 1/12 a 27 años; en los pacientes con síndrome de varón XX las edades variaron desde 6/12 a 35 años. En 5 pacientes HV 46,XX se documentó la presencia de ovario con ovotestes contralateral, otros 5 pacientes presentaron testículo con ovotestes contralateral, 1 paciente presentó ovotestes bilateral y otro paciente presentó ovario y testículo contralateral. Todos los pacientes HV 46,XX presentaron diferentes grados de ambigüedad tanto de genitales externos como internos. En todos los pacientes con síndrome de varón XX, se documentó la presencia de testículos bilaterales, en 2 pacientes prepuberales se observó ambigüedad de los genitales externos y en los 4 pacientes restantes se documentó la presencia de genitales externos masculinos bien diferenciados (en el paciente número 7 no se pudo recopilar el cuadro clínico).

TABLA 1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 12 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HERMAFRODITISMO VERDADERO 46,XX

PACIENTE	EDAD (AÑOS)	SEXO DE ASIGNACIÓN AL NACIMIENTO	GENITALES EXTERNOS	GENITALES INTERNOS	GÓNADA DERECHA	GÓNADA IZQUIERDA
1	2	Masculino	Falo de 2.8 cm, Hipospadia perineoescrotal, escroto bifido	Útero, Trompas de Falopio bilaterales	Ovotestes	Testículo
2	27	Femenino	Falo de 3.0 cm, Hipospadia perineoescrotal	Útero, trompas de Falopio y derivados Wolffianos bilaterales	Ovario	Ovotestes
3	1	Masculino	Hipospadia perineoescrotal	Uretra peneana Útero	Ovotestes	Ovotestes
4	5	Femenino	Labios escrotalizados	Útero, trompas de Falopio bilaterales, epidídimo izquierdo	Ovario	Ovotestes
5	1/12	Masculino	Falo de 1.8 cm, Hipospadia peneana	Ausencia de Müllerianas	Ovotestes	Testículo

Continua.....

TABLA 1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 12 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HERMAFRODITISMO VERDADERO 46,XX

PACIENTE	EDAD (AÑOS)	SEXO DE ASIGNACIÓN AL NACIMIENTO	GENITALES EXTERNOS	GENITALES INTERNOS	GÓNADA DERECHA	GÓNADA IZQUIERDA
6	6	Masculino	Falo de 3 cm, Hipospadia coronal, escroto bifido	Epidídimo derecho	Testículo	Ovotestes
7	1/12	Femenino	Hipospadia Peneana	Útero, trompas de Falopio bilaterales	Ovotestes	Ovario
8	1/12	Femenino	Hipospadia peneana	Útero, trompas de Falopio bilaterales	Ovotestes	Ovario
9	1/12	Femenino	Falo de 1.8 cm	ND	Testículo	Ovario
10	6	Masculino	ND	Útero	Testículo	Ovotestes

ND= No documentado

Continua.....

TABLA 1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 12 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HERMAFRODITISMO VERDADERO 46,XX

PACIENTE	EDAD (AÑOS)	SEXO DE ASIGNACIÓN AL NACIMIENTO	GENITALES EXTERNOS	GENITALES INTERNOS	GÓNADA DERECHA	GÓNADA IZQUIERDA
11	1	Masculino	Falo de 4.5 cm, Hipospadia perineal	Uretra, US=Útero	Ovotestes	Testículo
12	1/12	Femenino	Falo de 3.2 cm, Hipospadia peneana, labios escrotalizados	US=Útero Uretra de carac. Masculinas	Ovario	Ovotestes

US= Ultrasonido

TABLA 2.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 7 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DE VARÓN XX

PACIENTE	EDAD (AÑOS)	SEXO DE ASIGNACIÓN	GENITALES EXTERNOS	GÓNADA DERECHA	GÓNADA IZQUIERDA
1	9/12	Masculino	Pene de 3.2cm, Hipospadia penoescrotal	Testículo 2.8cc	Testículo 2.8cc
2	35	Masculino	Pene de 9cm	Testículo 3.3cc	Testículo 2.7cc
3	16	Masculino	Pene de 7cm	Testículo 4.1cc	Testículo 3.2cc
4	6/12	Masculino	Pene de 1.5cm, Hipospadia penoescrotal	Testículo 1.1cc	Testículo 1.1cc
5	25	Masculino	Pene de 6.5cm	Testículo 1.2cc	Testículo 1.5cc
6	28	Masculino	Pene de 9.5cm	Testículo 2.1cc	Testículo 6.3cc
7	2	Masculino	ND	Testículo 1.4 cc	Testículo 1.7 cc

ND= No documentado

MÉTODOS

Extracción de ADN de sangre periférica

Se extrajo una muestra de 5 ml de sangre periférica con el fin de obtener el ADN genómico siguiéndose la metodología estándar (83). La sangre se depositó en tubos de 5 ml que contenían 200 μ l de etilen diamino tetra acetato disódico (EDTA) 0.5M, pH 8, como anticoagulante. Las muestras fueron colocadas en hielo agregándose 12.5 ml de sacarosa-tritón 2X (Sacarosa 0.64M, Trizma-base 0.02M, $MgCl_2$ 0.01M y Tritón 100X al 2%) y 7.5 ml de agua bidestilada (ddH_2O). Los leucocitos se separaron por centrifugación (2180 g/15 minutos) y se decantó el sobrenadante hasta que se obtuvo un botón nuclear. Para lisar los leucocitos se añadieron 1.5 ml de amortiguador de lisis nuclear, pH 8.2, (Trizma-base 10 mM, NaCl 400 mM y Na_2EDTA 2 mM), 108 μ l de sulfato dodecílico sódico (SDS) al 20% y 50 μ l Proteinasa K. Se dejó incubar por 14 horas a 37°C, adicionándose después de dicho lapso 200 μ l de NaCl saturado y centrifugándose a 2180 g/15 minutos. El sobrenadante fue transferido a tubos de 15 ml y el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y se agitó por inversión. Posteriormente, el ADN se lavó en etanol frío al 70%, se secó a temperatura ambiente, fue resuspendido en 200 μ l de ddH_2O y almacenado a -20° C para su análisis posterior.

En todos los sujetos, se determinó la concentración de ADN por espectrofotometría, y se leyó a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Por medio de la lectura en la longitud de onda a 260 nm se determinó la concentración de ADN, mientras que la relación 260/280 nos indicó la pureza del mismo. La concentración total de ADN

se obtuvo al multiplicar la cantidad obtenida a la longitud de onda de 260 por una constante preestablecida, de acuerdo con la dilución que se utilizó:

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

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

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

Síntesis de Oligonucleótidos

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos en base a la secuencia de cada uno de los 5 exones del gen *WNT-4* (GeneBank, accesos AF335591 y AL031281 y OMIM: MIM 603490) fueron adquiridos de una casa comercial (Invitrogen, Life Technologies) y cada uno de ellos fue llevado a una concentración de $100 \mu\text{M}$. Asimismo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con el fin de determinar que no existiesen oligonucleótidos adicionales.

Los oligonucleótidos sintetizados para el desarrollo del estudio fueron los siguientes: para el exón 1 los pares de oligonucleótidos WNT1b/WNT1y, para el exón 2 los pares WNT2a/WNT2b, para el exón 3 los pares WNT3a/WNT3b, para el exón 4 los pares WNT4c/WNT4d y para el exón 5 los pares WNT5a/WNT5b.

Secuencia de los oligonucleótidos en dirección 5' \longrightarrow 3':

WNT1b 5' CTCGGCCCCGGCCAGACTTAC 3'

WNT1y 5' CACCATGAGTCCCCGCTCGT 3'

WNT2a	5' ATCCAGAGAGAAGTCGGCAGCC 3'
WNT2b	5' CCCGTTGCTCACGACCGTCTC 3'
WNT3a	5' ATGATTTCTGCCTGTCTTGCTCCC 3'
WNT3b	5' ACATCCACAAACGACTGTGAGAAG 3'
WNT4c	5' TAGGTGCAGGAGGTGGTCAGAG 3'
WNT4d	5' TTTTCTGAGTGGCCGTGTGGGT 3'
WNT5a	5' GTACCGCGTAATTCCTAAGAGGAG 3'
WNT5b	5' GTGCTGGTGAGAGCCTGCACAAAT 3'

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En todos los casos se preparó una reacción estándar de 50 μ l, siguiéndose la técnica descrita por Sambrook y cols. (83) que contenía: 0.3 μ g de ADN genómico, oligonucleótidos (5' y 3') a una concentración final de 0.4 μ M, desoxirribonucleótidos trifosfatados a una concentración final de 80 μ M, amortiguador 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM y $MgCl_2$) a una concentración final de 1X, Taq. polimerasa 2 U (Applied Biosystems, Foster City, CA) y ddH₂O para un volumen final de 50 μ l, para las reacciones de la PCR de los exones 1 y 3 se utilizó dimetil sulfóxido al 3%. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones adecuadas para la amplificación de cada uno de los

exones fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 94 °C/5 min, 30 ciclos de 94 °C/1 min, temperatura de alineamiento (TA) /1 min y 72 °C/1 min y un ciclo de extensión a 72 °C/5 min. En la TA para el exón 1 se utilizó el método de Touch-down, en el cual después de la temperatura de desnaturalización, los dos primeros ciclos fueron a 68 °C/1 min, ésta temperatura disminuyó gradualmente en dos grados centígrados en cada par de ciclos subsecuentes, hasta una temperatura de 50 °C, ésta última con 20 ciclos y finalizar con el ciclo de extensión (83). Para los exones 2, 3 y 5 la TA fue de 66 °C y para el exón 4 de 64 °C.

El análisis de los productos de la PCR se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1% para los exones 2 al 5 y del 2% para el exón 1, tiñéndose con bromuro de etidio al 0.0002%. Una escalera de 100 pb fue utilizada como marcador de peso molecular, asimismo, se incluyeron un control positivo (individuo sano) y un control negativo (la reacción de la PCR sin ADN), el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografió utilizando una película Polaroid 667, finalmente la imagen se escaneo y se modificó solo en cuanto al brillo.

Secuenciación

Las reacciones de secuencia se llevaron a cabo mediante el uso de un estuche comercial (Dye Terminator Cycle Sequencing), el cual se basa en el método descrito por Sanger y cols. (84) con algunas modificaciones. Previo a la secuenciación, las muestras de ADN amplificadas se purificaron con un estuche de QIAGEN (QIAGEN GMBH, Germany). Posteriormente, en tubos de microcentrífuga se llevó a cabo la mezcla de reacción con: amortiguador de secuencia 5X, mezcla de dNTP's, terminador fluorescente

A, terminador fluorescente C, terminador fluorescente G, terminador fluorescente T y AmpliTaq DNA Polimerasa, FS. A esta mezcla de reacción se le añadió el templado, oligonucleótidos (5' o 3') y ddH₂O para un volumen final de 20µl. Se llevó a cabo la PCR de cada una de las reacciones de secuenciación, siguiendo las instrucciones del proveedor. Al finalizar la PCR, se procedió a la purificación de los productos mediante columnas de Centri-Sep (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las muestras fueron resuspendidas en amortiguador de carga formamida, se desnaturalizaron a 94 °C y se colocaron en hielo. Posteriormente las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 4.75%, utilizando un kit de Long Ranger y buffer TBE, se corrieron en un secuenciador automático ABI Prism 377 (Perkin Elmer, New Jersey, USA) y los resultados fueron analizados mediante el programa Sequencing Analysis (versión 3.41).

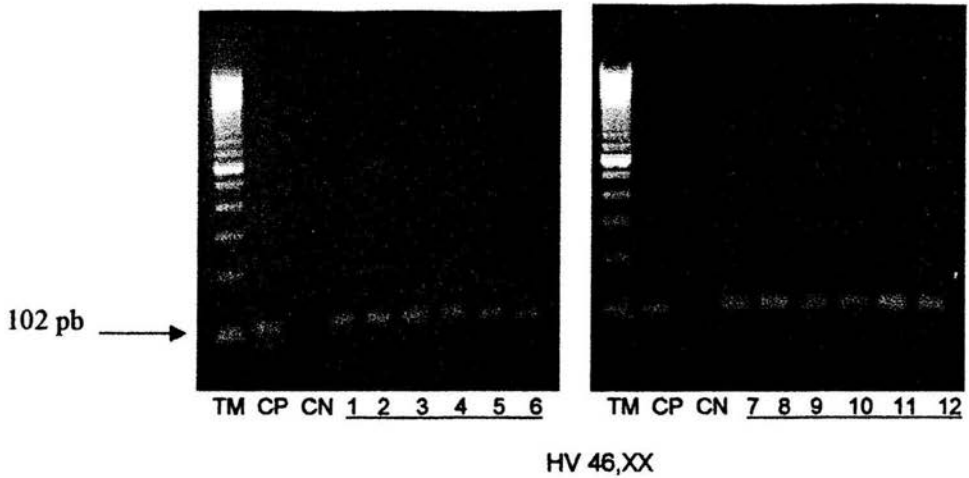
RESULTADOS

Con el fin de valorar la presencia de mutaciones en el gen *WNT-4*, se analizó por la PCR el ADN genómico extraído de sangre periférica de los sujetos incluidos en este estudio. Por medio de este análisis no se encontraron mutaciones en ninguno de los 5 exones que componen al gen *WNT-4*. En todos los casos, la amplificación de cada uno de los exones fue el esperado de acuerdo al tamaño molecular.

Debido a que la región 5' flanqueadora y el intrón1 presentan secuencias ricas en GC, la amplificación del exón 1 fue exitosa, después de diseñar y probar 9 oligonucleótidos distintos y utilizar el método de Touch-down. Finalmente se logró amplificar un fragmento de 102pb que abarcan el exón 1, en las figuras 4 y 5 se observa la PCR de este exón para los pacientes HV 46,XX y los pacientes con síndrome de varón XX, el exón 2 amplificó un fragmento de 481pb lo que se puede observar en las figuras 6 y 7, el exón 3 amplificó un fragmento de 430pb el que se observa en las figuras 8 y 9, el exón 4 amplificó un fragmento de 415pb, figuras 10 y 11 y el exón 5 amplificó un fragmento de 762pb el que se puede observar en las figuras 12 y 13.

En todos los sujetos analizados la secuenciación automatizada de los 5 exones que componen al gen *WNT-4*, concuerda con la reportada en el GenBank, accesos AF335591 y AL031281 y OMIM: MIM 603490, tampoco se encontraron polimorfismos no reportados (Figuras 14-18).

FIGURA 4



TM= Tamaño Molecular (100 pb)

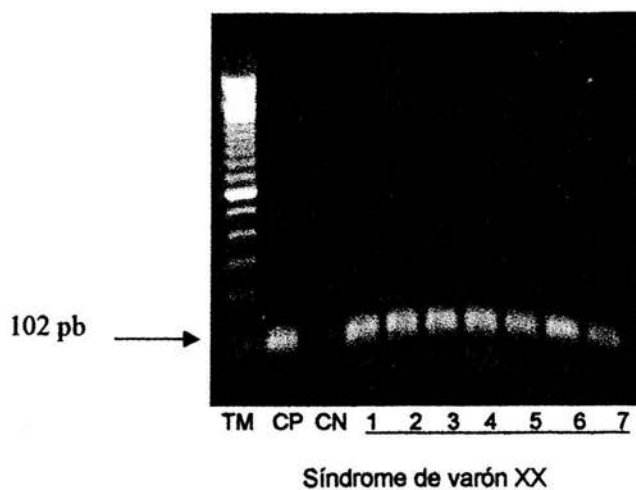
CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

HV 46,XX= Hermafroditismo Verdadero 46,XX

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 1 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con HV 46,XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 102 pb.

FIGURA 5



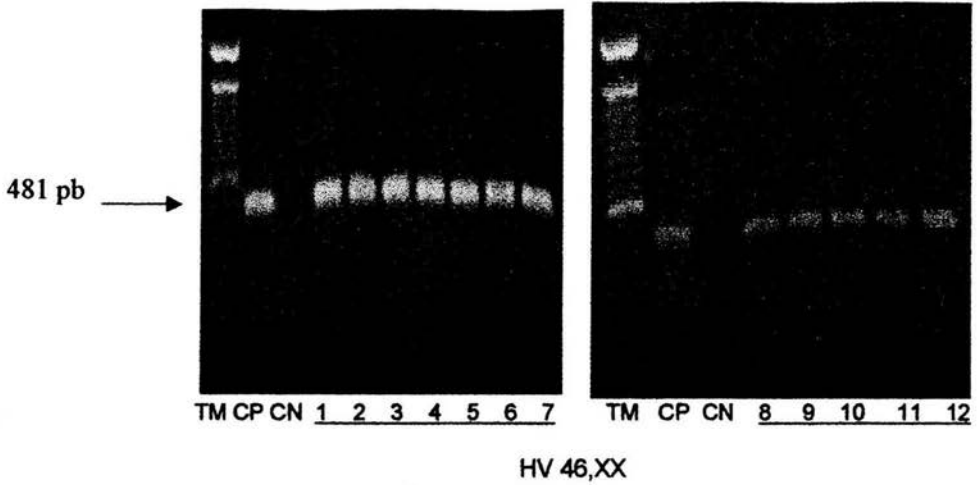
TM= Tamaño Molecular (100 pb)

CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 1 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con síndrome de varón XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 102 pb.

FIGURA 6



TM= Tamaño Molecular (100 pb)

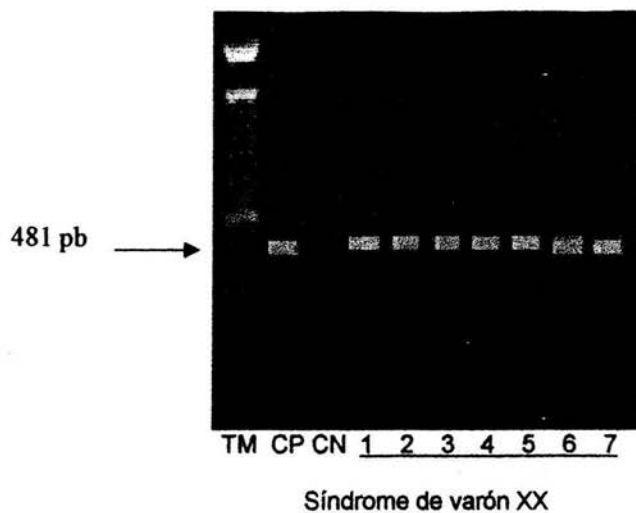
CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

HV 46,XX= Hermafroditismo Verdadero 46,XX

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 2 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con HV 46,XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 481 pb.

FIGURA 7



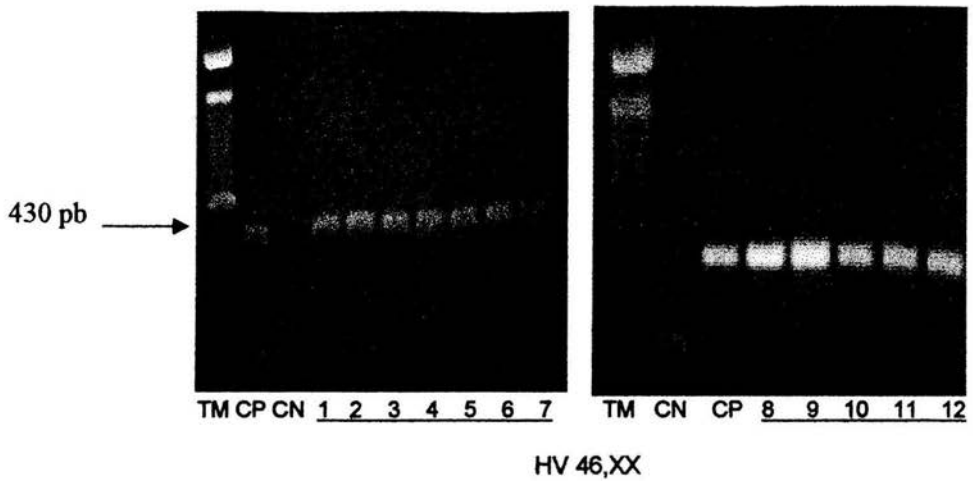
TM= Tamaño Molecular (100 pb)

CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 2 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con síndrome de varón XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 481 pb.

FIGURA 8



TM= Tamaño Molecular (100 pb)

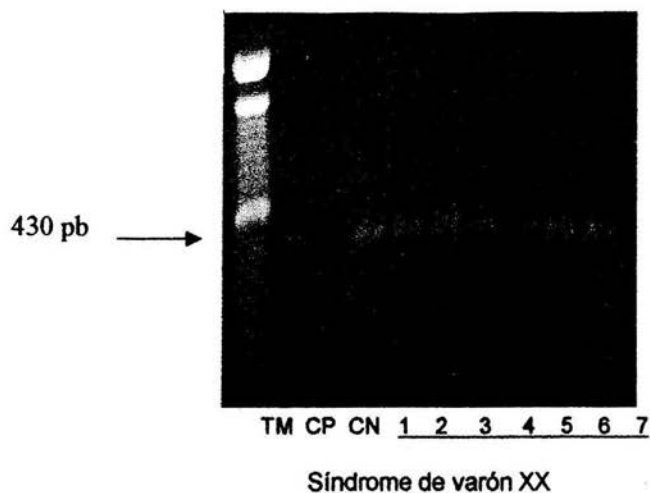
CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

HV 46,XX= Hermafroditismo Verdadero 46,XX

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 3 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con HV 46,XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 430 pb.

FIGURA 9



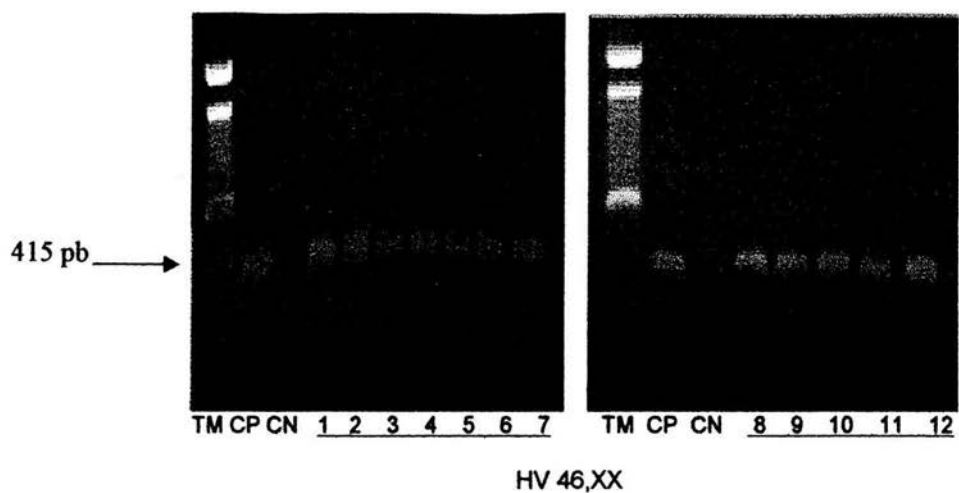
TM= Tamaño Molecular (100 pb)

CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 3 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con síndrome de varón XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 430 pb.

FIGURA 10



TM= Tamaño Molecular (100 pb)

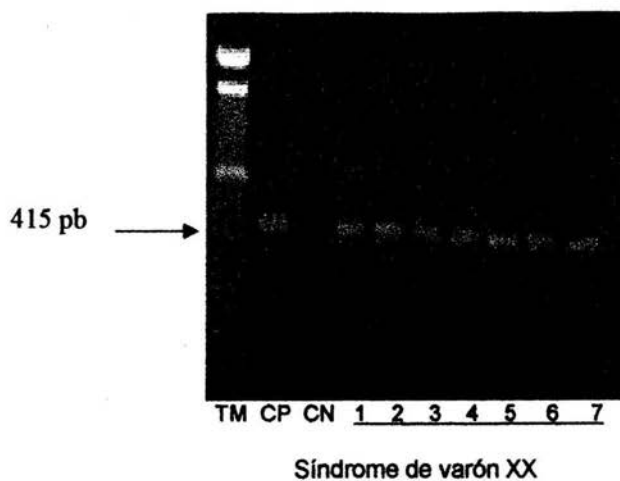
CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

HV 46,XX= Hermafroditismo Verdadero 46,XX

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 4 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con HV 46,XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 415 pb.

FIGURA 11



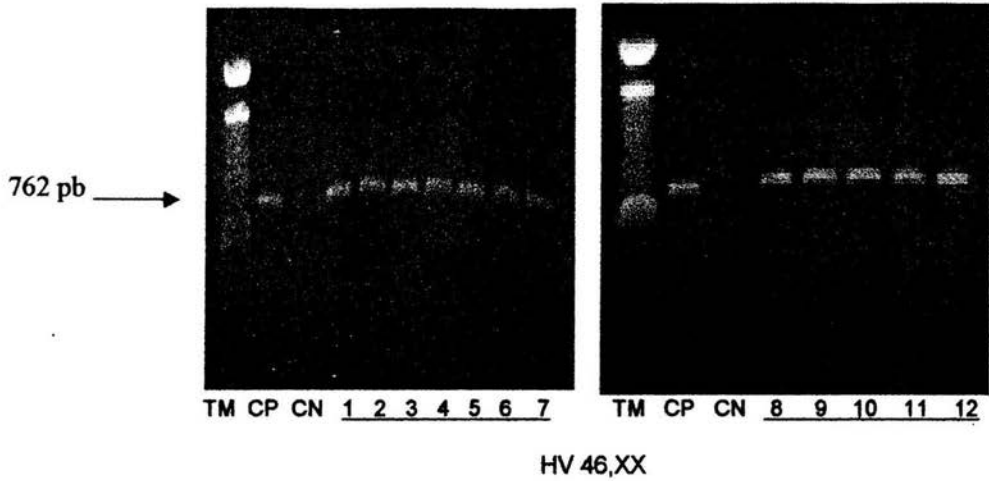
TM= Tamaño Molecular (100 pb)

CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 4 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con síndrome de varón XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 415 pb.

FIGURA 12



TM= Tamaño Molecular (100 pb)

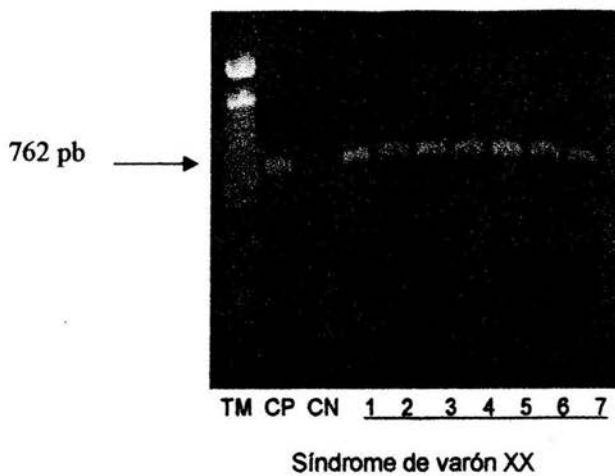
CP= Control Positivo

CN= Control Negativo

HV 46,XX= Hermafroditismo Verdadero 46,XX

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 5 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con HV 46,XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 762 pb.

FIGURA 13



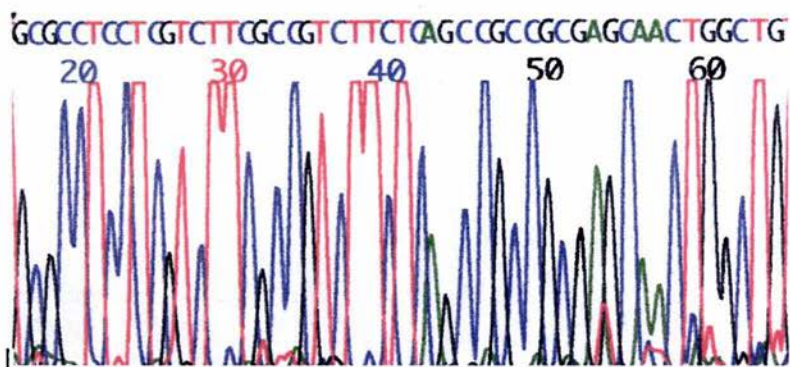
TM= Tamaño Molecular (100 pb)

CP= Control Positivo

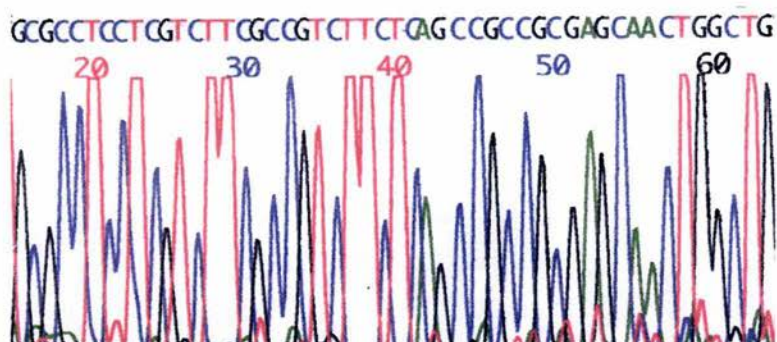
CN= Control Negativo

Reacción en cadena de la polimerasa del exón 5 del gen *WNT-4*. En todos los pacientes con síndrome de varón XX así como en el CP se observa la amplificación del exón, el cual corresponde a 762 pb.

FIGURA 14



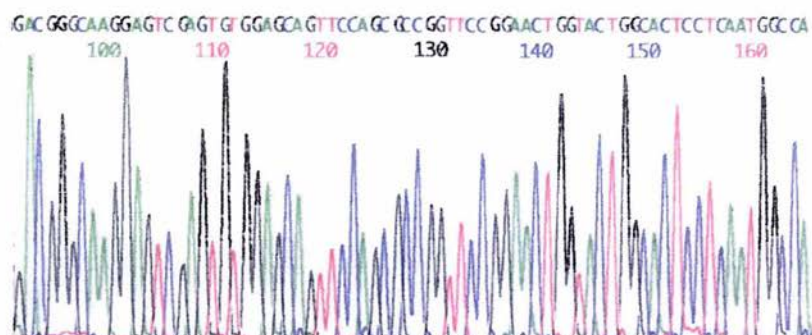
Control



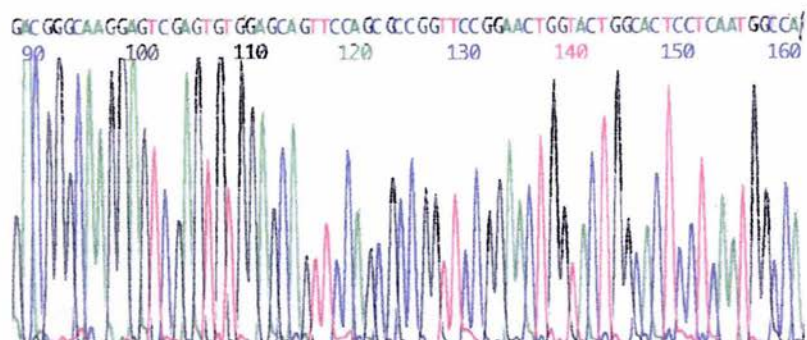
Paciente

Secuenciación automatizada parcial en dirección 5' del exón 1 del gen *WNT-4*, del aminoácido 2 al 19. El paciente con hermafroditismo verdadero 46,XX presenta la misma secuencia que el control.

FIGURA 15



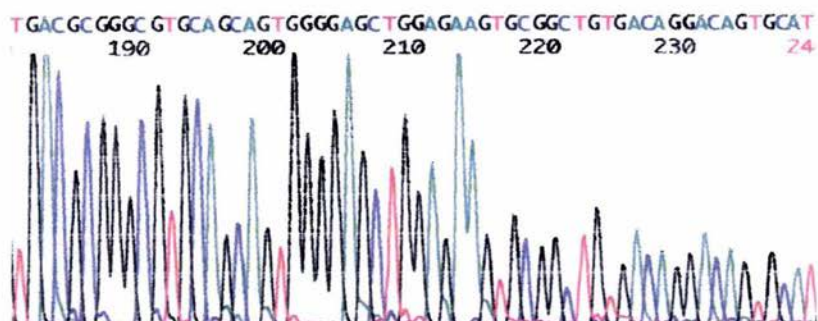
Control



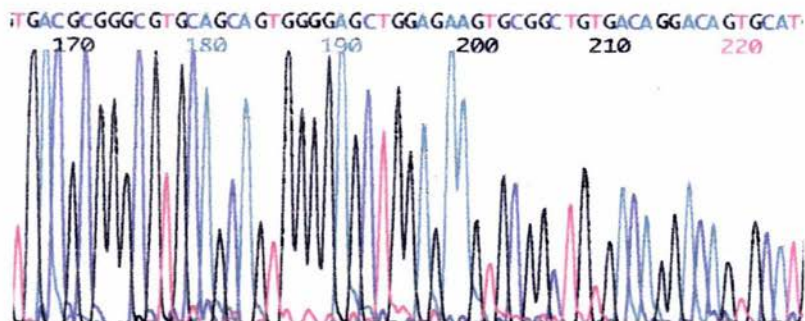
Paciente

Secuenciación automatizada parcial en dirección 3' del exón 2 del gen *WNT-4*, del aminoácido 73 al 97. El paciente con hermafroditismo verdadero 46,XX presenta la misma secuencia que el control.

FIGURA 16



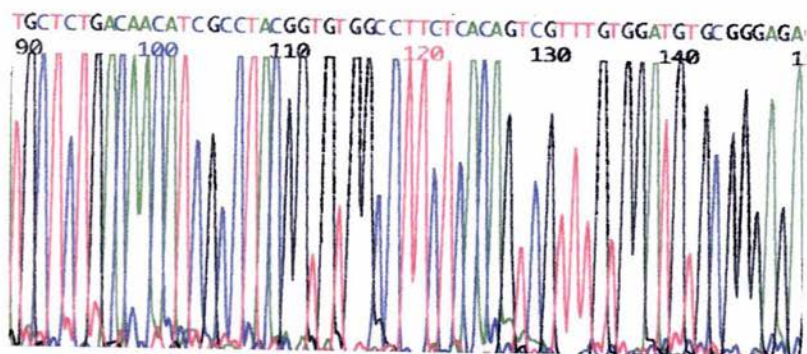
Control



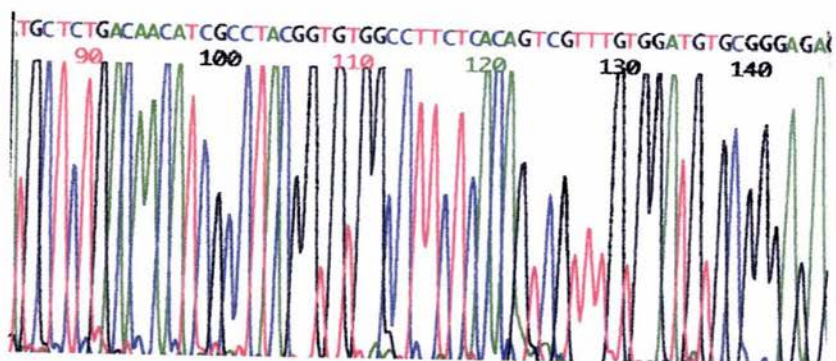
Paciente

Secuenciación automatizada parcial en dirección 5' del exón 3 del gen *WNT-4*, del aminoácido 124 al 143. El paciente con hermafroditismo verdadero 46,XX presenta la misma secuencia que el control.

FIGURA 17



Control

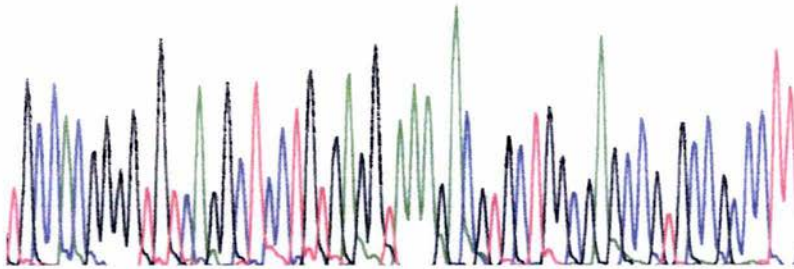


Paciente

Secuenciación automatizada parcial en dirección 5' del exón 4 del gen *WNT-4*, del aminoácido 155 al 175. El paciente con hermafroditismo verdadero 46,XX presenta la misma secuencia que el control.

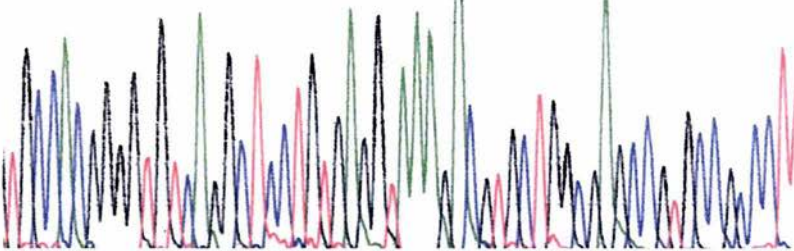
FIGURA 18

TGCCACGGGGTGTCA GGCTCCTGTGAGGTAAAGACGTGCTGGCGAGCCGTGCCGCCCTT
170 180 190 200 210 220



Control

TGCCACGGGGTGTCAAGGCTCCTGTGAGGTAAAGACGTGCTGGCGAGCCGTGCCGCCCTT
190 200 210 220 230 240



Paciente

Secuenciación automatizada parcial en dirección 5' del exón 5 del gen *WNT-4*, del aminoácido 207 al 227. El paciente con hermafroditismo verdadero 46,XX presenta la misma secuencia que el control.

DISCUSIÓN

En este trabajo se llevó a cabo el estudio molecular de 12 pacientes con diagnóstico comprobado de hermafroditismo verdadero 46,XX y de 7 pacientes con diagnóstico de síndrome de varón XX.

La diferenciación sexual en el humano es un proceso aún no totalmente dilucidado que involucra una cascada de eventos, iniciada por la presencia y acción del factor determinante testicular (gen *SRY*). Sin embargo, existen algunas alteraciones de la diferenciación sexual en las cuales se ha observado desarrollo testicular en ausencia del *SRY*, como son los HV 46,XX y el síndrome de varón XX. Por ello se ha propuesto la existencia de genes autosómicos o ligados al cromosoma X que intervienen en el desarrollo gonadal de una forma dimórfica, expresándose en diferentes tiempos y dosis, constituyéndose como componentes de una cascada génica responsable de los programas de morfogénesis y diferenciación de la gónada bipotencial (8,9,14-34).

Entre estos genes se encuentra el gen *WNT-4*. Estudios llevados a cabo por Vainio y cols. (33) en ratones hembra, demostraron que la delección homocigota de *Wnt-4* conduce a una masculinización caracterizada por fenotipo gonadal masculino, ausencia de derivados Mülllerianos y diferenciación de los conductos Wolffianos. Asimismo, Jordan y cols. (34) demostraron en un paciente con reversión sexual XY, una duplicación del gen *WNT-4*, por lo que proponen que este gen juega un papel importante en la cascada de la diferenciación sexual.

Recientemente, se ha propuesto que *WNT-4* impide la migración de células endoteliales y esteroidogénicas en la gónada XX en desarrollo, impidiendo la formación de vasos sanguíneos específicos del macho, los cuales son necesarios para el transporte de testosterona y dar lugar al fenotipo masculino (35, 82). Asimismo, se ha demostrado en ratones nulos para *Wnt-4* expresión de células esteroidogénicas en el ovario; por lo que la interrupción de la señal de *Wnt-4* esta asociada con el inicio de la biosíntesis de esteroides, dando lugar a la masculinización de la gónada XX (33, 35). Con base en lo anterior, se postula que *WNT-4* es esencial para el desarrollo del sistema reproductivo femenino y suprime el desarrollo del masculino.

Las alteraciones en la diferenciación sexual conducen a la presencia de malformaciones en el desarrollo sexual. El hemafroditismo verdadero y el síndrome de varón XX son padecimientos en donde se encuentra afectada la traducción del sexo cromosómico al sexo gonadal. En el HV 46,XX los individuos afectados poseen tanto tejido ovárico como testicular, ya sea separados o formando una sola gónada (ovotestes), por el contrario en el síndrome de varón XX los individuos afectados presentan solo testículos, como se puede observar en los pacientes analizados en este trabajo (tanto para los pacientes con HV 46,XX y con síndrome de varón XX) tablas 1 y 2. La mayoría de los sujetos HV 46,XX y de los sujetos con síndrome de varón XX ocurren esporádicamente, sin embargo se ha observado que estos dos padecimientos pueden coexistir en una sola familia y pudieran ser manifestaciones de los mismos procesos patogénicos. Aunque un porcentaje de estos padecimientos son positivos al *SRY*, cuando éste gen no esta presente, el desarrollo testicular puede depender de otros factores, los cuales pueden ser genéticos (46,53-58,60-81,85).

Con base en estos antecedentes, se llevó a cabo el estudio molecular de los cinco exones del gen *WNT-4* en sangre periférica de 12 pacientes con diagnóstico de HV 46,XX y de 7 pacientes con diagnóstico de síndrome de varón XX; siendo el primer estudio de la secuencia del gen *WNT-4* en estos padecimientos, no evidenciándose alteraciones moleculares en el marco de lectura del gen, y de esta forma no se pudo comprobar la hipótesis propuesta.

La diferenciación de tejido testicular en sujetos con HV 46,XX y en sujetos con síndrome de varón XX pudiera explicarse por la presencia de un mosaicismo oculto con una línea celular con cromosoma Y, o bien debido a la traslocación de material del cromosoma (incluyendo al gen *SRY*) a otros cromosomas (45,63,75-77). En el caso de los pacientes que se incluyeron en este estudio (tanto con diagnóstico de HV 46,XX como con diagnóstico de síndrome de varón XX) nuestro grupo de investigación realizó la búsqueda de secuencias derivadas del cromosoma Y (gen *SRY*, *ZFY*, una región repetitiva alfoide específica del cromosoma Y, así como la región de heterocromatina del brazo largo del cromosoma Y), con el fin de descartar un mosaicismo oculto que contenga al cromosoma Y (o secuencias derivadas del mismo). Solamente en un paciente con HV 46,XX y en 5 pacientes con síndrome de varón XX se demostró la presencia del gen *SRY*, lo que pudiera explicar el desarrollo testicular en estos pacientes.

Otra explicación plausible para el desarrollo testicular en los sujetos incluidos en este estudio, es que pudiera ser que la alteración molecular del gen *WNT-4* se encontrara confinada en el tejido gonadal. Como es el caso de un sujeto HV 46,XY, en el cual se encontró una mutación postcigótica en el gen *SRY* (86); es decir el gen *SRY* presenta una secuencia silvestre en sangre, pero mutada en gónadas. Asimismo, nuestro grupo de investigación, encontró en otro sujeto con reversión sexual XY, una

mutación postcigótica en el *SRY*. Por lo que en el presente trabajo no se descarta la posibilidad de que la secuencia del gen *WNT-4* pudiera presentar una mutación en el tejido gonadal.

El hecho de que no se haya demostrado la presencia de mutaciones en los 12 pacientes HV 46,XX y en los 7 pacientes con síndrome de varón XX, en ninguno de los cinco exones que constituyen al gen *WNT-4*, no descarta la posibilidad de que existan alteraciones moleculares en otras regiones del gen *WNT-4*, como es en la región promotora o en las regiones intrónicas del mismo; como se ha reportado tanto en individuos con alteraciones en la diferenciación sexual (87,88-90) como en otras entidades patológicas (91-93). Entre estos individuos se encuentran algunos pacientes con reversión sexual XY, en donde se ha reportado la presencia de mutaciones en la región promotora del gen *SRY*, dando lugar a una alteración en la expresión del mismo (94).

Asimismo, la presencia de mutaciones en las regiones intrónicas puede crear nuevas secuencias consenso del sitio de corte y empalme, dando lugar a diferentes formas de proteínas con función(es) alterada(s), que se traduce en una alteración fenotípica. Con base en lo anterior, no se puede descartar que los pacientes incluidos en este estudio, pudiesen presentar alguna alteración molecular en los intrónes de *WNT-4*.

Las células responden a una señal determinada por la combinación de proteínas y factores reguladores de la transcripción. El conjunto de factores que participan en este proceso y su adecuada actividad determinan la expresión de otros genes como respuesta a un evento de señalización específico. Así en este trabajo no se descarta la posibilidad de que pudiera haber alguna alteración en algún paso de la

regulación transcripcional del gen *WNT-4* que pudiera bloquear su señal. En la cascada de señalización de *WNT-4* se conoce con certeza y en otros casos solo se presume la participación de diversas moléculas, algunas de estas son la β -catenina, el TCF, proteína G, Ca^{2+} , GSK-3 β , Dsh, las cuales son necesarias para transmitir la señal de *WNT-4*. (37-40,95,96). Zom y cols. (38), demostraron que algunas proteínas pertenecientes a la familia SOX pueden unirse a β -catenina impidiendo su unión con el TCF, interfiriendo así con la señal *WNT-4*. Por otro lado la unión del gen *WNT-4* a su receptor involucra otro paso importante para la transmisión de su señal, un estudio realizado por Gazit y cols. (96) en un homólogo del receptor Frizzled humano, encuentran que la delección en la región carboxilo terminal de este receptor impide la transmisión de la señal de algunas proteínas *Wnt* dependientes de TCF, concluyendo que el dominio carboxilo terminal del receptor frizzled es indispensable para una eficiente transducción de la señal de estas proteínas *Wnt*.

Asimismo, hay que considerar que para la amplificación del exón 1 del gen analizado en este estudio, el oligonucleotido en dirección 5' \longrightarrow 3' que se utilizó abarcó las primeras 16 bases del exón, por lo que no podemos descartar la presencia de alguna mutación en estas bases lo que pudiera dar lugar a las entidades patológicas analizadas.

En la diferenciación sexual participan diversos genes, los cuales juegan un papel importante en este proceso, así, además del gen *SRY* y *WNT-4* otros genes autosómicos o ligados al cromosoma X pudieran estar involucrados en la etiología de los HV 46,XX y del síndrome de varón XX. El gen *WNT-4* es regulado por genes "río arriba" en el camino de la determinación sexual y a su vez este gen también ejerce su función interactuando con otros genes "río abajo" en el mismo camino. Algunos de

estos genes son el gen supresor del tumor de Willms (*WT1*), el factor esteroideogénico 1 (*SF1*), *SOX9* y *DAX1* (4,34,41,97-99).

Entre los genes que actúan "corriente arriba" de *WNT-4* en la cascada de la diferenciación sexual se encuentran el gen *WT1* y *SF1* (4,41,97). Se ha demostrado que la mutación en alguno de estos genes da lugar a reversión sexual (22,100-102). Asimismo, se han reportado casos en la literatura, en los cuales la sobreexpresión de algunos genes como son *SOX9* y *DAX1* dan lugar a reversión sexual XX y XY respectivamente (34,42,43,98,103).

CONCLUSIONES

- ❖ No se demostraron mutaciones en sangre periférica a lo largo del marco de lectura de los cinco exones que constituyen al gen WNT-4, en los pacientes con diagnóstico comprobado de hermafroditismo verdadero 46,XX y en pacientes con diagnóstico de síndrome de varón XX, analizados en este trabajo.
- ❖ El no haber demostrado mutaciones en sangre periférica en el marco de lectura de los exones del gen WNT-4, pudiera indicar que la alteración molecular del gen se encuentre confinada en el tejido gonadal.
- ❖ Asimismo, la alteración molecular de WNT-4 pudiera encontrarse en la región promotora o regiones intrónicas del gen o en algún factor que intervenga en la cascada de señalización del mismo, o bien encontrarse en las primeras 16 bases del exón 1.
- ❖ Finalmente, la patología de HV 46,XX y la de síndrome de varón XX pudieran ser secundarias a alteraciones en otro(s) gene(s) que interviene(n) en la cascada de la diferenciación sexual.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. En: Labhart A, editor. *Monographs on Endocrinology*. Berlin: Springer-Verlag; 1967. p. 5.
2. Jacobs P, Ross A. Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature* 1966;210:352.
3. Goodfellow P, Darling S. Genetics of sex determination in man and mouse. *Development* 1988;102:251.
4. Parker K, Schedl A, Schimmer B. Gene interactions in gonadal development. *Annu Rev Physiol* 1999;61:417.
5. Jirásek J. *Development of the genital system and male pseudohermaphroditism*. Baltimore: John Hopkins University Press; 1971.
6. Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Invest Clin* 1982;34:349.
7. McKay D. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rev* 1953;117:201.
8. Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow P. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346:240.
9. López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am J Med Genet* 1995;55:356.
10. Zenzes M, Müller U, Aschmoneit I, Wolf U. Studies on H-Y antigen in different cell fractions of the testis during pubescence. In mature germ cells are antigen H-Y negative. *Hum Genet* 1978;45:297.
11. Jones K, Singh L. Conserved repeated DNA sequences in vertebrates sex chromosomes. *Hum Genet* 1981;58:46.
12. Page D, Mosher E, Simpson E, Fisher E, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown L. The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 1987;51:1091.
13. Cuevas-Covarubias S, Kofman-Alfaro S. El cromosoma Y humano. *Rev Invest Clin* 1990;42:290.
14. Cameron F, Sinclair A. Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum Mutat* 1997;9:388.

15. Cameron F, Smith M, Warne G, Sinclair A. Novel mutation in the SRY gene results in 46,XY gonadal dysgenesis. *Hum Mutat* 1998;Suppl 1:S110.
16. Domenice S, Nishi M, Correia A, Latronico A, Medeiros M, Russell A, Vass K, Carvalho F, Costa E, Prado I, Bilharinho B. A novel missense mutation (S18N) in the 5' non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial dysgenesis and his normal male relatives. *Hum Genet* 1998;102:213.
17. Poulat F, Desclozeaux M, Tuffery S, Jay P, Boizet B, Berta P. Mutation in the 5' noncoding region of the SRY gene in an XY sex-reversed patient. *Hum Mutat* 1998; Suppl 1:S192.
18. Assumpcao J, Guerra A, Palandi de Mello M. Recurrence of a nonsense mutation in the conserved domain of SRY in a Brazilian patient with 46,XY gonadal dysgenesis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12:455.
19. Uehara S, Funato T, Yaegashi N, Suzuki H, Sato J, Sasaki T, Yajima A. SRY mutation and tumor formation on the gonads of XP pure gonadal dysgenesis patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;113:78.
20. Okuhara K, Tajima T, Nakae J, Fujieda K. A novel missense mutation in the HMG box region of the SRY gene in a Japanese patient with an XY sex reversal. *J Hum Genet* 2000;45:112.
21. Schaffler A, Barth N, Winkler K, Zietz B, Rummele P, Knuchel R, Scholmerich J, Palitzsch KD. Identification of a new missense mutation (Gly95Glu) in a highly conserved codon within the high-mobility group box of the sex-determining region Y gene: report on a 46,XY female with gonadal dysgenesis and yolk-sac tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2287.
22. Pelletier J, Bruening W, Kashtan C, Mauer S, Manivel J, Strieger J, Houghton D, Junien C, Habib R, Fouser L, Fine R, Silverman B, Haber D, Housman D. Germ-line mutations in the Wilm's tumour suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991;67:437.
23. Bennett C, Docheerty Z, Robb S, Ramani P, Hawkins J, Grant D. Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet* 1993;30:518.
24. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley K, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McGabe E, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 1994;7:497.
25. Foster J, Dominguez-Steglich M, Guioli S, Kwok Ch, Weller P, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young I, Goodfellow P, Brook J, Schafer A. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994;372:525.

26. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli F, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY related gene SOX9. *Cell* 1994;49:1111.
27. López M, Torres L, Méndez J, Cervantes A, Pérez-Palacios G, Erickson R, Alfaro G, Kofman-Alfaro S. Clinical traits and molecular findings in 46,XX males. *Clin Genet* 1995;48:29.
28. Eicher E, Washburn LL, Schork N, Lee B, Shown E, Xu X, Dredge R, Pringle M, Page D. Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-YPOS sex reversal. *Nat Genet* 1996;14:206.
29. Foster J. Mutations in SOX9 cause both autosomal sex reversal and campomelic dysplasia. *Acta Paediatr Jpn* 1996;38:405.
30. Ogata T, Matsuo N. Sex determining gene on the X chromosome short arm: dosage sensitive sex reversal. *Acta Paediatr Jpn* 1996;38:390.
31. Torres L, López M, Méndez JP, Canto P, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Med Genet*. 1996;63:348.
32. Wirth J, Wagner T, Meyer J, Pfeiffer R, Tietze H, Schempp W, Scherer G. Translocation breakpoints in three patients with campomelic dysplasia and autosomal sex reversal map more than 130 kb from SOX9. *Hum Genet* 1996;97:186.
33. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon A. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999;397:405.
34. Jordan B, Mohammed M, Ching S, Délot E, Chen X-N, Dewing P, Swain A, Rao N, Elejalde R, Vilain E. Up-regulated of Wnt-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 2001;68:1102.
35. Jeays-Ward K, Hoyle Ch, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development* 2003;130:3663.
36. Cadigan K, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286.
37. Dale T. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 1998;329:209.
38. Zorn A, Barish G, Williams B, Lavender P, Klymkowsky M, Varmus H. Regulation of Wnt signaling by Sox Proteins: Xsox17 α/β and Xsox3 physically interact with β -catenin. *Mol Cell* 1999;4:487.

39. Kühl M, Sheldahl L, Park M, Miller J, Moon R. The Wnt/Ca²⁺ pathway a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 2000;16:279.
40. Moon R, Brown J, Torres M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet* 1997;13:157.
41. Sim E, Smith A, Szilagi E, Rae F, Ioannou P, Lindsay M, Little M. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene* 2002;21:2948.
42. Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. Dax 1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 1998;391:761.
43. Goodfellow P, Camerino G. DAX-1, an "antitestis" gene. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:857.
44. Merchant-Larios H. Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: Van Blerkom J, Motta P, editores. *Ultrastructure of Reproduction*. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers; 1984. p. 19.
45. George F. Sexual differentiation. En: Griffin D, Ojeda S, editores. *Textbook of Endocrine Physiology*. Oxford: University Press; 1992. p. 117.
46. Grumbach M, Conte F. Disorders of sex differentiation. En: Wilson J, Foster D, editores. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 1998. p.1303.
47. Jost A. Problems of fetal endocrinology. The gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Progr Horm Res* 1953;8:379.
48. Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet J. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res* 1973;29:1.
49. Jirásek J. The relationship between the structure of the testis and differentiation of the external genitalia and phenotype in man. En: Wolstenholme G, O'Connor M, editores. *Endocrinology of the Testis*. Boston: Little Brown & Co; 1967. p. 3.
50. Wilson J. Metabolism of testicular androgens. En: Greep R, Astwood E, editores. *Handbook of Physiology. Endocrinology, Male Reproductive System*, vol V. Washington: American Physiological Society; 1975. p. 491.
51. Griffin J, Wilson J. The androgen resistance syndrome: 5 α -reductase deficiency, testicular feminization and related disorders. En: Scriver R, editor. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw Hill; 1989. p. 1919.
52. Imperato-McGinley J, Gautier T. Male pseudohermaphroditism due to inherited 5 α -reductase deficiency in man. En: Martinez-Mora, editor. *Intersexual Status: disorders of sex differentiation*. Barcelona: Doyma; 1994. p. 231.

53. Goldstein J, Wilson J. Hereditary disorders of sexual development in man. En: Motulsky A, Lentz W, editores. Birth Defects International Congress Series 310. Amsterdam: Excerpta Medica; 1974. p. 1.
54. Wilson J, Goldstein J. Classification of hereditary disorders of sexual development. En: Bergsma D, editor. Genetic Forms of Hypogonadism. New York: Birth Defects: Original Article Series Stratton Corp; 1975. p. 1.
55. Griffin J, Wilson J. Disorders of sexual differentiation. En: Walsh P, editor. Campbell's Urology. Philadelphia: Saunders; 1986. p. 1819.
56. Pérez-Palacios G, Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. True hermaphroditism. En: Martínez-Mora J, editor. Intersexual States: disorders of sex differentiation. Barcelona: Doyma; 1994. p. 253.
57. Pérez-Palacios G, Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. Sex reversal in humans: the XX male syndrome and related disorders. En: Martínez-Mora J, editor. Intersexual States: disorders of sex differentiation. Barcelona: Doyma; 1994. p. 269.
58. Jiménez R, Sánchez A, Burgos M, Díaz de la Guardia R. Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. Trends Genet. 1996;12:164.
59. Van Niekerk W. True hermaphroditism. En: Josso N, editor. The intersex child: Pediatric and adolescent endocrinology. Basel: Karger; 1981. p. 80.
60. Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Pérez-Palacios G. Estudios clínicos, citogenéticos endocrinológicos e histológicos en hermafroditas verdaderos. Rev Invest Clin 1992;44:229.
61. Van Niekerk W. True hermaphroditism: an analytic review with a report of 3 new cases. Am J Obstet Gynecol 1976;126:890.
62. Modan-Moses D, Litmanovitch T, Rienstein S, Meyerovitch J, Goldman B, Aviram-Goldring A. True hermaphroditism with ambiguous genitalia due to a complicated mosaic karyotype: clinical features, cytogenetic findings, and literature review. Am J Med Genet 2003;116A:300.
63. Aaronson I. True hermaphroditism: a review of 41 cases with observations in testicular histology and function. Brit J Urol 1985;57:775.
64. Hadjiathanasiou C, Brauner R, Lortat-Jacob S, Nivot S, Jaubert F, Fellous M, Nihoul-Fekété C, Rappaport R. True hermaphroditism: genetic variants and clinical management. J Pediatr 1994;125:738.
65. Kuhnle U, Schwarz H, Löhns U. Familial true hermaphroditism: paternal and maternal transmission of the hermaphroditism (46,XX) and XX maleness in the absence of Y-chromosomal sequence. Hum Genet 1993;92:571.

66. McElreavy K, Rappaport R, Vilain E. A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY. *Hum Genet* 1992;90:121.
67. Domenice S, Nishi M, Billerbeck A, Carvalho F, Frade E, Latronico A, Arnhold I, Mendonca B. Molecular analysis of SRY gene in Brazilian 46,XX sex reversed patients: absence of SRY sequence in gonadal tissue. *Med Sci Monit* 2001;7:238.
68. McElreavy K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3368.
69. de la Chapelle A, Horting H, Niemi M, Wennstrom J. XX sex chromosomes in a human male. First case. *Acta Med Scan* 1964;412:S25.
70. Therkelsen AJ. Sterile male with chromosomal constitution 46,XX. *Cytogenetics* 1964;3:207.
71. Zenteno JC, López M, Vera C, Méndez JP, Kofman-Alfaro S. Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Hum Genet* 1997;100:606.
72. de la Chapelle A, Schroder J, Murros J, Tallqvist G. Two XX males in one family and additional observations bearing on the etiology of XX males. *Clin Genet* 1977;11:91.
73. López M, Torres L, Cervantes A, Pérez-Palacios G, Erickson R, Alfaro G, Kofman-Alfaro S. Clinical traits and molecular findings in 46,XX males. *Clin Genet* 1995;48:29.
74. Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Canto P, Reyes E, Díaz-Cueto L, Pérez-Palacios G. Phenotypical expression in XX males correlates with testicular response to exogenous choriogonadotropin in early infancy: does a variable degree of testicular failure determine the degree of genital ambiguity? *Arch Androl* 1996;37:19.
75. de la Chapelle A, Tippet PA, Wetterstrand G. Genetic evidence of X-Y interchange in a human XX male. *Nature* 1984;307:170.
76. Magenis R, Webb M, McKeon R. Translocation (X:Y) (p22:33;p11.2) in XX males: etiology of male phenotype. *Hum Genet* 1982;62:271.
77. Petit C, de la Chapelle A, Levilliers J. An abnormal X-Y interchange accounts for most but not all cases of human XX maleness. *Cell* 1987;49:595.
78. Jarrah N, El-Shanti H, Khier A, Nouri-Obeidat F, Haddidi A, Ajlouni K. Familial disorder of sex determination in seven individuals from three related sibships. *Eur J Pediatr* 2000;159:912.
79. Ferguson-Smith M, Cooke A, Affara N, Boyd E, Tolmie J. Genotype-phenotype correlations in XX males and their bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet* 1990;84:198.

80. Abbas N, Toublanc J, Boucekkine C. A possible common origin of "Y-negative" human XX males and XX true hermaphrodites. *Hum Genet* 1990;84:356.
81. Pereira E, Cabal de Almeida J, Gunha A. Use of probes for ZFY, SRY, and the Y-pseudoautosomal boundary in XX males, XX true hermaphrodites and an XY female. *J Med Genet* 1991;28:591.
82. Jordan B, Shen J, Olaso R, Ingraham H, Vilain E. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/ β -catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10866.
83. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press; 2001. p. 8.18.4.19,8.112.
84. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463.
85. Yordam N, Alikasifoglu A, Kandemir N, Caglar M, Baler S. True hermaphroditism: clinical features, genetic variants and gonadal histology. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14:421.
86. Braun A, Kammerer S, Cleve H, Lohrs U, Schwarz H-P, Kuhnle U. 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* 1993;52:578.
87. McElreavey K, Vilain E, Barbaux S, Fuqua J, Fechner P, Souleyreau N, Docofenzy M, Quereu C, Fellous M, Berkovitz G. Loss of sequences 3' to the testis-determining gene, SRY, including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3590.
88. McElreavey K, Vilain E, Abbas N. XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11016.
89. Kwok C, Tyler-Smith C, Mendonca B, Hughes I, Berkovitz G, Goocifellow P, Hawkins J. Mutation analysis of the 2 Kb 5' to SRY in XY females and XY intersex subjects. *J Med Genet* 1996;33:465.
90. Veitia R, Ion A, Barbaux S, Jobling M, Souleyreau N, Ennis K, Oster H, Tosi M, Meo T, Chibani J, Fellous M, McElreavey K. Mutation and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individual with a 46,XY female phenotype. *Hum Genet* 1997;99:648.
91. Le Flem L, Picard V, Emmerich J. Mutations in promotor region of thrombomodulin and venous thromboembolic disease. *Arterioscler tromb Vasc Biol* 1999;19:1098.

92. Zertal-Zidani S, Merghoub T, Gerard N, Satta D, Krishnamoorthy R, Ducrocq R. A novel C → A tranversion within the distal CCAAT motif of the gamma-globin gene in the Algerian gammabeta +/- hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hemoglobin* 1999;23:189.
93. Lalioti M, Scott H, Antonarakis S. Altered spacing of promotor elements due to the dodecamer repeat expansion contributes to reduced expression of the cytatn B gene in EPMI. *Hum Mol Genet* 1999;8:1791.
94. Koopman P. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:839.
95. Liu T, De-Costanzo A, Liu X, Wang H, Hallagan S, Moon R, Malbon C. G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the β -Catenin-Lef-Tcf pathway. *Science* 2001;292:1718.
96. Gazit A, Yaniv A, Bafico A, Pramila T, Igarashi M, Kitajewski J, Aaronson S. Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional reponse. *Oncogene* 1999;18:5959.
97. Gummow B, Winnay J, Hammer G. Convergence of Wnt signaling and steroidogenic factor-1 (SF-1) on transcription of the rat inhibin gene. *J Biol Chem* 2003;278:26572.
98. Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, Morohashi K-I. Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol* 2003;4:507.
99. Veitia R, Sálas-Cortés L, Ottolenghi Ch, Pailhoux E, Cotinot C, Fellous M. Testis determination in mammals: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179:3.
100. Pelletier J, Bruening W, Li F, Haber D, Glaser T, Housman D. WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 1991;353:431.
101. Tremblay J, Viger R. A mutated form of steroidogenic factor 1 (SF1-G35E) that causes sex reversal in humans fails to synergize with transcription. *J Biol Chem* 2003;278:42637.
102. Achermann J, Ito M, Hindmarsh P, Jameson J. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure en humans. *Nature Genet* 1999;22:125.
103. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb A, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* 1999;87:349.