

11216



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

"DISTRIBUCION DE CELULAS CON CROMOSOMA Y EN GONADOBLASTOMA Y GONADA DISGENETICA EN PACIENTES PEDIATRICOS CON CARIOTIPO 45,X/46.XY"

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
ORGANISMO DESCENTRALIZADO



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN GENETICA MEDICA
P R E S E N T A :

DIRECCION DE ENSEÑANZA REBECA ALVAREZ AUBERT

ASESOR: DRA. GLORIA QUEIPO GARCIA



MEXICO, D. F.

SUCESOR... DIVISION... 2004... U.N.A.M.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1. Antecedentes	1
1.1. Diferenciación sexual normal	1
1.2. Alteraciones de la diferenciación sexual	5
1.2.1. Síndrome de Turner	5
1.2.2. Disgenesia gonadal	6
1.2.3. Hermafroditismo verdadero	7
1.2.4. Pseudohermafroditismo masculino	8
1.3. Tumores testiculares	10
1.3.1. Tumores del estroma gonadal	10
1.3.2. Tumor de las células de Leydig	11
1.3.3. Tumor de las células de Sertoli	11
1.3.4. Tumor de células de la granulosa	12
1.3.5. Gonadoblastoma	12
1.3.6. Tumor de saco vitelino	14
1.3.7. Carcinoma embrionario	14
1.3.8. Coriocarcinoma	14
1.3.9. Teratoma	15
1.3.10 Seminoma/disgerminoma	15

2. Justificación	16
3. Objetivos	17
4. Material y métodos	18
4.1 Perfil hormonal	18
4.2 Análisis citogenético con bandas GTG	18
4.3 Análisis histológico	18
4.4 Extracción de DNA	20
4.5 Análisis por PCR	21
4.6 Análisis por FISH	23
5. Resultados	25
5.1 Estudio clínico	25
5.2 Estudio citogenético	29
5.3 Estudio molecular	30
5.3.1 Análisis por PCR	30
5.3.2 Análisis por FISH	31
6. Discusión	35
7. Bibliografía	40

AGRADECIMIENTOS

- Al departamento de Genética del Hospital General de México por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este trabajo.
- A mi tutora la Dra. Gloria Queipo por todo su apoyo, dedicación y orientación para la realización de este proyecto.
- A la Dra. Susana Kofman por haberme dado su apoyo y la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.
- A Karem Nieto e Icela Palma por su colaboración en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi mejor amigo y esposo Allan

1. ANTECEDENTES

1.1 DIFERENCIACION SEXUAL NORMAL

La diferenciación sexual es el proceso mediante el cual los mamíferos se desarrollan en machos o hembras. La importancia fisiológica de este proceso es poder mantener la reproducción sexual y la preservación de las especies.

En los humanos el proceso de la diferenciación sexual se divide en 3 etapas consecutivas (Kofman-Alfaro y cols, 1982). La primera etapa o **cromosómica** es cuando el espermatozoide portador de un cromosoma X o Y fertiliza a un óvulo, siempre portador de un X, lo que origina un cigoto con complemento cromosómico XX (femenino) o XY (masculino). El cromosoma Y es necesario para que se desarrolle el testículo ya que en él se encuentra el factor determinante testicular (Ford C y cols, 1959); ésto ocurre independiente al número de cromosomas X presentes (Muller U, 1994. Ford y cols, 1959). En la etapa **gonadal** ocurren los cambios que llevan a la transformación de la gónada indiferenciada hacia testículo u ovario. En el primer caso la presencia del gen determinante testicular (SRY) iniciará la cascada de señalización que finalizará con la formación del testículo fetal funcional, por el contrario en el caso de la hembra la ausencia de SRY favorecerá el desarrollo del ovario. La etapa **fenotípica** es consecuencia de la acción hormonal producida por el testículo y de la ausencia de éstas en la hembra. La primer hormona producida por el testículo fetal es sintetizada en las células de Sertoli y corresponde a la hormona inhibidora de müllerianos (HIM) cuya acción es degenerar los conductos de müller. Este proceso iniciará entre la octava y novena semana de gestación y terminará hacia la onceava semana. La segunda hormona en actuar es la testosterona, producida por las células de Leydig, cuyo efecto principal se ejercerá sobre los conductos de Wolff, los cuales se diferenciarán en epidídimo, conductos deferentes, vesículas seminales y conducto eyaculador. La tercera hormona es la dehidrotestosterona (DHT) que resulta del

metabolismo de la testosterona a su forma 5 alfa reducida por acción de la enzima 5 alfa reductasa, ésta se encargará de la diferenciación de los genitales externos. Al actuar sobre el tubérculo genital se desarrollará el pene, los pliegues genitales se alargarán y al fusionarse formarán la porción membranosa de la uretra masculina, mientras que los engrosamientos labioescrotales, localizados a ambos lados del orificio uretral formarán el escroto, donde se alojarán los testículos hacia el tercer trimestre de la gestación cuando terminen su descenso.

Aunque la vía molecular de la diferenciación sexual todavía no se conoce por completo, hasta el momento los genes que participan en esta vía se agrupan en 3 clases de acuerdo a su estructura o al momento en que ejercen su función (Fig. 1) (Swain A y cols, 1999). El primer grupo se constituye por **factores de transcripción**, los cuales participan desde las primeras etapas de la diferenciación en la cresta genital hasta los procesos finales durante la diferenciación de las diferentes estirpes celulares. En este grupo se encuentran genes como **SF1** (Morohasi K y cols, 1993. Luo X y cols, 1994), **WT1** (Kriedberg J, 1993. Reddy J y cols, 1996), **LIM1** (Shwalot W y cols, 1995), **Emx2** (Miyamoto N y cols, 1997), **GATA4** (Tevosian S y cols, 2002) y **DMTR1** (Raymond C y cols, 1998). En el segundo grupo se encuentran los genes **determinantes de testículo**, éstos pertenecen a la familia SOX (SRY-type HMG BOX), aquí se encuentra el gen **SRY** (**S**ex **d**etermining **R**egion on **Y**-chromosome) (Berta P y cols, 1990. Gubia J y cols, 1990) y **SOX9** (Kent J y cols, 1996. Da Silva SM y cols, 1996). La función específica de éstos es determinar y promover el desarrollo testicular. El tercer grupo está constituido por los genes que promueven el **desarrollo del ovario**, éstos son considerados antagonistas testiculares y a este grupo pertenecen principalmente **DAX1** Y **WNT4** (Swain A y cols, 1998. Vaino S y cols, 1999). Una característica importante es que son genes sensibles a dosis, esto se ha observado en pacientes con reversión sexual 46,XY y duplicación de DAX1 ó WNT4 (Swain A y cols, 1998. Vaino S, 1999).

Todos estos genes, participan en una compleja cascada cuyo fin es llevar a cabo la formación de gónadas bien diferenciadas. Si bien se consideraba que el desarrollo del ovario era un proceso pasivo, cada vez hay más evidencia de que su formación requiere de la expresión de ciertos genes.

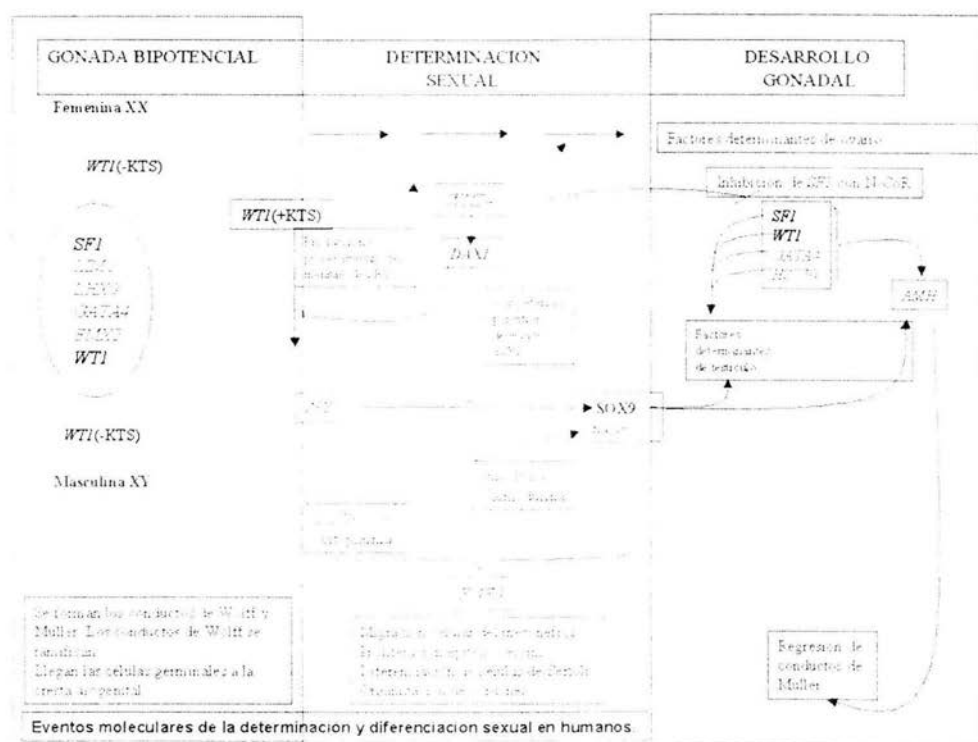


Fig. 1 Esquema de la cascada molecular de la diferenciación sexual

La gónada es el único órgano bipotencial ya que este puede desarrollarse hacia ovario o testículo. Esta se deriva de la cresta gonadal, pasa por un periodo indiferenciado y de acuerdo al ambiente genético, iniciará el desarrollo de un testículo hacia la 8 semana de gestación (SDG) o bien de un ovario a la 11 SDG. En el desarrollo de la gónada bipotencial genes como **SF1**, **WT1** y **LIM1** juegan un papel importante. Una vez establecida la gónada indiferenciada el desarrollo gonadal masculino iniciará con la expresión de **SRY**, el cual parecería ser el "switch" génico que desencadena los eventos celulares que conducirán a la formación del testículo. Dentro de las características de **SRY** se conoce que es un gen pequeño que contiene un solo exón y codifica para una proteína de 223 aminoácidos con un dominio central HMG (**High Mobility Group**). Las proteínas HMG fueron identificadas como un grupo heterogéneo de componentes no histónicos del nucleosoma; **SRY** tiene la característica de unirse a sitios específicos en la curvatura menor del DNA, induciendo un plegamiento organizado de la estructura de la cromatina y facilitando de esta forma el ensamblaje de complejos nucleoproteicos (Goodwin G y cols; 1973. M.J. O'Neill, et al). Se sugiere que el plegamiento en el DNA da como resultado una yuxtaposición de otros factores de transcripción unidos a sitios distantes, induciendo así la activación o represión de genes blanco. El blanco específico de **SRY** aún se desconoce, sin embargo, existen algunos candidatos como **SOX9**. Este es un gen autosómico localizado en 17q24 relacionado estructuralmente con **SRY** y que inicia su transcripción poco tiempo después de la expresión de éste gen (Wright E y cols, 1995. Kent J y cols, 1996). La expresión de **SOX9** se limita a la célula de Sertoli y se sugiere que ésta célula será la encargada de dirigir la organización de los túbulos seminíferos. Existe un reporte donde duplicaciones de **SOX9** en un individuo 46,XX ocasiona reversión sexual en ausencia de **SRY** (Huang B y cols, 1999). Este gen también reprime durante el desarrollo testicular a **WNT4** quien a su vez actúa sobre **DAX1** durante el desarrollo ovárico. Existe evidencia de que **SRY** también actúa sobre el promotor de la **HIM** participando en la expresión de esta hormona. A lo largo de esta

vía molecular pueden presentarse errores que conducen a alteraciones de la diferenciación sexual y que se dividen de acuerdo al momento en que se presentan.

1.2 ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Las alteraciones de la diferenciación sexual constituyen un grupo heterogéneo de padecimientos originados por defectos durante las etapas del desarrollo sexual. Tomando en cuenta todos los padecimientos que afectan el desarrollo genital, éstos se presentan en 1 de cada 250-300 recién nacidos vivos (Pask A y cols, 2003). Estas alteraciones se dividen en anomalías cromosómicas, gonadales y fenotípicas.

1.2.1 SÍNDROME DE TURNER

El síndrome de Turner es una entidad que resulta de la falta total o parcial de un segundo cromosoma sexual. La incidencia es de 1 en 2,000 a 3,000 recién nacidas vivas. Pueden presentarse diversos cariotipos, en 55-60% de los casos el cariotipo es 45,X, en 25% se encuentran mosaicos y en el resto encontramos alteraciones cromosómicas estructurales, siendo la más común el isocromosoma de brazos largos del cromosoma X. El complemento 45,X es una de las anormalidades cromosómicas más comunes en abortos espontáneos del primer trimestre (15-20%). Las principales características de este padecimiento son talla baja, disgenesia gonadal, amenorrea primaria e infertilidad y un espectro variable de anomalías conocidas como estigmas somáticos del síndrome, entre las cuales destacan alteraciones craneofaciales y de cuello, tórax en escudo, alteraciones esqueléticas, cardíacas (50%) y renales (60%). Se ha reportado que por cariotipo y técnicas moleculares, la presencia de una segunda línea celular con material cromosómico del Y está presente en 6-12%. Las pacientes con síndrome de Turner y secuencias positivas del Y tienen 10% de riesgo de presentar gonadoblastoma y éste aumenta con la edad (Gravholt CH y cols, 2000).

1.2.2 DISGENESIA GONADAL

La disgenesia gonadal 46,XY es una alteración de la diferenciación gonadal caracterizada por el desarrollo anormal de las gónadas. Histológicamente las disgenesias gonadales se dividen en 3 grupos (Le Caignec C y cols, 2003):

1. Disgenesia gonadal pura o completa (DGP): se caracteriza por ausencia de desarrollo testicular, estrías gonadales bilaterales, estructuras müllerianas bien desarrolladas y ausencia de derivados wolffianos.
2. Disgenesia gonadal mixta (DGM): se observa estría gonadal de un lado y testículo disgenético contralateral o de apariencia normal. El desarrollo de las estructuras müllerianas y wolffianas correlaciona con la gónada ipsilateral.
3. Disgenesia gonadal parcial: existen testículos disgenéticos bilaterales con desarrollo de estructuras müllerianas o wolffianas según el grado de diferenciación de la gónada.

La DGP es un síndrome de reversión sexual donde existe discordancia entre el sexo cromosómico y el sexo gonadal. Clínicamente los pacientes son fenotípicamente femeninos, con amenorrea primaria, desarrollo puberal inadecuado y genitales externos infantiles. El útero y las trompas de Falopio están presentes pero son hipoplásicos. En 15-20% se han identificado mutaciones en SRY principalmente en la caja HMG, éstas son muy heterogéneas, ya que se han descrito aproximadamente 35 diferentes mutaciones, siendo las más comunes de sentido equivocado y sin sentido. Los tumores de células germinales, principalmente el gonadoblastoma y el seminoma/disgerminoma, ocurren con frecuencia en este padecimiento. Al grupo de las reversiones sexuales también pertenecen los varones XX y los hermafroditas verdaderos.

Las disgenesias gonadales mixtas se caracterizan por alteraciones del desarrollo gonadal, clínicamente se presentan con ambigüedad genital, la cual puede variar dependiendo de la gónada presente. En la mayoría de los pacientes se encuentran 2 líneas celulares 45,X/46XY, siendo el Y normal o anormal. Es importante señalar que la

presencia de este cariotipo se asocia con un amplio espectro fenotípico que va desde pacientes con síndrome de Turner clásico y estigmas bilaterales, pasando por la DGM con las características antes mencionadas hasta individuos masculinos con testículos disgenéticos bilaterales. Todos ellos tienen el riesgo de desarrollar neoplasias gonadales. Estos mosaicos pueden ser generalizados o confinados a la gónada y no se distribuyen homogéneamente (Chemes H y cols, 2003), lo que nos podría explicar la alteración gonadal en la mayoría de estos pacientes. En pocos casos de DGM se han identificado microdeleciones en las regiones 3' ó 5' del gen SRY y mutaciones sin sentido.

1.2.3 HERMAFRODITAS VERDADEROS

Los hermafroditas verdaderos (HV) se caracterizan por la coexistencia de tejido ovárico y testicular en un mismo individuo (Berkovitz GD y cols, 1982), ya sea como ovotestes (tejido ovárico y testicular en una misma gónada) o con testículo de un lado y ovario contra lateral, la forma más frecuente de presentación es la primera. El tejido ovárico generalmente es funcional, no así el testicular, pudiendo llegar a presentarse ovulaciones. El HV es una anomalía genéticamente heterogénea, en 60% encontramos un cariotipo 46,XX; de los cuales únicamente el 10% son SRY positivos en sangre periférica y existen algunos casos de mosaicismo para SRY confinado a la gónada (Hadjithanasiou CG y cols, 1994. Inoue H y cols, 1998. Jiménez AL y cols, 1999. Queipo G y cols, 2002); un 33% son quimeras o mosaicos que presentan líneas celulares con Y y un 7% son 46,XY, dentro de los cuales en 3 casos se han identificado mutaciones en SRY Braun A y cols, 1993. Hiort O y cols, 1995. Maler E y cols, 2003). Clínicamente se presentan con ambigüedad genital y desarrollo variable de estructuras müllerianas y/o wolffianas. El tratamiento depende de varios factores como fenotipo, edad de diagnóstico, sexo de asignación, entre otros.

1.2.4 PSEUDOHERMAFRODITISMO MASCULINO

Los pseudohermafroditismos masculinos (SHM) son un grupo de enfermedades que se caracterizan por presentar desarrollo testicular bilateral y ambigüedad de genitales o fenotipo femenino. Existen múltiples causas que originan esta alteración; entre las más comunes se encuentran la insensibilidad completa y parcial a la acción de los andrógenos y la deficiencia de 5 alfa reductasa. La insensibilidad completa a la acción de los andrógenos tiene un patrón de herencia recesivo ligado al X, los individuos XY afectados presentan un fenotipo femenino con genitales externos y glándula mamaria bien desarrollados, el clítoris puede ser pequeño, los labios mayores y menores son hipoplásicos y la vagina es corta, terminando en un fondo de saco; es característico la ausencia de vello púbico y axilar. Debido a que las gónadas están localizadas en región inguinal o abdominal las pacientes pueden presentarse con hernias inguinales, dato que en una niña hace sospechar en este diagnóstico. Los conductos wolffianos están presentes, sin embargo, éstos no se diferencian por la falta de acción androgénica. Se piensa que antes de los 25 años el riesgo de malignización de las gónadas es bajo, sin embargo, después de esta edad se incrementa del 4 al 9%. Por este motivo se recomienda la remoción profiláctica de las gónadas. La insensibilidad parcial a la acción de los andrógenos es la variedad más frecuente de SHM. El espectro fenotípico es muy amplio, abarcando desde un fenotipo femenino con genitales externos hipoplásicos y escaso vello hasta un fenotipo masculino con datos de virilización incompleta como hipospadias. La infertilidad es una característica de estos pacientes debido a las alteraciones durante la espermatogénesis, así como a un mal desarrollo del sistema eyaculador.

La deficiencia de 5 alfa reductasa con patrón de herencia autosómico recesivo, se caracteriza por ausencia de la enzima encargada de convertir a nivel periférico la testosterona (T) a dehidrotestosterona (DHT), esta última responsable de la virilización de los genitales externos masculinos. Los pacientes presentan diversos grados de ambigüedad genital, es frecuente encontrar hipospadias, criptorquidia y micropene. El

diagnóstico se establece midiendo la relación entre la T y la DHT basal y después de estimulación con gonadotropina coriónica humana (hCG), la cual en condiciones normales no debe ser mayor de 15. En la adolescencia suele presentarse cierta virilización por acción de la testosterona como cambios en la voz, aumento de la masa corporal, crecimiento del pene y descenso testicular.

Los pacientes que cursan con estados intersexuales además de presentar las características propias de cada padecimiento, tienen un riesgo elevado de desarrollar tumores gonadales. El riesgo de presentar neoplasias testiculares se ha asociado de manera importante a 3 condiciones específicas: presencia de un cromosoma Y normal o anormal, evidencia molecular de secuencias derivadas del Y, y a la localización intraabdominal de la gónada (Chemes H y cols, 2003. Balzac I y cols, 1999. Slowikowska-Hilczer J y cols, 2003). Dentro de las alteraciones de la diferenciación sexual que presentan un mayor riesgo de desarrollar neoplasias gonadales, principalmente gonadoblastoma, se encuentran: la disgenesia gonadal (Scully RE, 1970. Gourlay WA y cols, 1994. Chemes H y cols, 2003), algunos pacientes con fenotipo Turner (Gravholt CH y cols, 2000), ocasionalmente el pseudohermafroditismo masculino 46, XY (Gourlay WA y cols, 1994. Chemes H y cols, 2003. Gravholt CH y cols, 2000. Chen CP y cols, 1999); y también se ha reportado en hermafroditas verdaderos 46,XX/46,XY (Talerman A y cols, 1990).

Dentro del abordaje de los pacientes con estados intersexuales, se debe realizar estudio citogenético y molecular; ya que con los resultados se pueden tomar las decisiones necesarias para disminuir el riesgo de desarrollar tumores gonadales.

1.3 TUMORES TESTICULARES

Los tumores testiculares son neoplasias frecuentes que se presentan de forma aislada o asociada a otros padecimientos. Existen varios tipos tumorales y la presentación varía de acuerdo a la raza, edad y patología de base. Como es el caso del gonadoblastoma, un tumor testicular poco frecuente que se observa de forma característica, aunque no exclusiva, en pacientes con estados intersexuales. La OMS clasifica los tumores testiculares de acuerdo a la tabla 1 (Eble JN y cols, 2004).

Tabla 1

Clasificación de los tumores testiculares

1.	Tumores de células germinales
2.	Tumores de una estirpe histológica (formas puras)
3.	Tumores de más de una estirpe histológica (formas mixtas)
4.	Tumores de cordones sexuales y estroma gonadal
5.	Tumores Misceláneos
6.	Tumores hematopoyéticos
7.	Tumores de los conductos colectores y de la rete testis
8.	Tumores de estructuras paratesticulares
9.	Tumores mesenquimatosos de cordón espermático y anexos testiculares
10.	Tumores secundarios de los testículos

1.3.1 TUMORES DEL ESTROMA GONADAL

Los tumores de estroma gonadal constituyen el 4-6% de los tumores testiculares del adulto y más del 30% de los tumores testiculares en los niños. Aproximadamente se

presentan metástasis en 10%, esto ocurre principalmente en los adultos y no es posible predecir su comportamiento en base a los hallazgos histológicos.

1.3.2 Tumor de las células de Leydig

También se le conoce como tumor de células intersticiales y representa el 1-3% de los tumores testiculares. Al inicio es un tumor benigno pero puede malignizar, está compuesto por elementos que semejan el desarrollo y evolución normal de las células de Leydig. Este tipo de tumores se puede encontrar en pacientes con síndrome de Klinefelter y del 5-10% de los pacientes que lo presentan tienen el antecedente de criptorquidia. La presentación tiene un comportamiento bimodal, el primer pico se observa en niños de 3-9 años mientras que el segundo pico abarca adultos entre la 3ª. y 6ª. década de la vida. Dentro de las manifestaciones clínicas se observa aumento no doloroso en el volumen testicular, ginecomastia en 30% de los casos y en algunos pacientes pediátricos se identifica pubertad precoz. Este tipo de tumor es considerado funcional ya que tiene la capacidad de sintetizar hormonas esteroides, principalmente testosterona, androstenediona y dehidroepiandrosterona; los estrógenos y el estradiol también pueden estar elevados. Encontrar estos tumores de forma bilateral no es frecuente. Los tumores mayores a 5 cm, con celularidad atípica, actividad mitótica aumentada, necrosis e invasión vascular son consideradas como lesiones malignas.

1.3.3 Tumor de células de Sertoli

También se le conoce como androblastoma. Es un tumor compuesto por células de Sertoli en distintas etapas del desarrollo (fetales, prepuberales y adultas). Estos tumores representan menos del 1% de todos los tumores testiculares y únicamente se han reportado 50 casos. Típicamente se presentan en adultos a una edad promedio de 45 años. La gran mayoría son esporádicos, sin embargo, algunos han sido asociados al síndrome de insensibilidad a los andrógenos, síndrome de Carney y síndrome de

Peutz-Jeghers. Clínicamente los pacientes se presentan con una masa testicular de crecimiento lento y rara vez malignizan.

1.3.4 Tumores de las células de la granulosa

Estos tumores se pueden dividir en 2 variantes: formas adultas y juveniles.

1. Forma adulta: es un tumor maligno poco frecuente con crecimiento lento y únicamente 24 casos han sido descritos en la literatura. La edad de presentación es en la quinta década de la vida. Aproximadamente el 25% de los casos presentan ginecomastia, los pacientes tienen niveles elevados de inhibina y de la hormona inhibidora de müllerianos. Se observan metástasis en aproximadamente 20% de los casos, incluso varios años después del diagnóstico inicial.
2. Forma juvenil: es una neoplasia multiquística en la que su estructura semeja la de los folículos de Graaf. Aunque poco frecuente, es el tumor testicular congénito más frecuente y comprende el 6.6% de todos los tumores testiculares en pacientes prepuberales. Clínicamente se presenta como una masa escrotal o intraabdominal asintomática, con mayor frecuencia del lado izquierdo, en 30% de los casos los testículos afectados tienen una localización abdominal. La mayoría de los tumores se observan en el periodo perinatal y su presentación después del primer año de vida es muy raro. En 20% de los casos se ha asociado a estados intersexuales principalmente la disgenesia gonadal mixta 45,X/46,XY. No se han observado recurrencias o metástasis.

1.3.5 GONADBLASTOMA

El gonadoblastoma es un tumor poco frecuente, compuesto de estroma, células germinales y componentes de cordones sexuales, que tiene potencial de malignizar. Esta neoplasia gonadal fue descrita por Scully en 1953 como un tumor benigno que se parecía a una gónada normal en desarrollo y que afectaba principalmente a un

subgrupo de pacientes con estados intersexuales (Scully RE, 1970). En este grupo de pacientes representa las 2/3 partes de los tumores gonadales y el riesgo estimado de que se desarrolle gonadoblastoma varía entre el 15-25% dependiendo de la patología de base. La edad de diagnóstico es variable con un rango que va desde el nacimiento hasta la cuarta década, sin embargo, 94% de los casos se diagnostican entre la 2ª. y 3ª. décadas de la vida. El diagnóstico en la edad pediátrica es raro (Dumic M y cols, 1993. Hadad NG y cols, 2003. Goswith J y cols, 1996) y existen pocos casos reportados en la literatura. El cuadro clínico está dado por la presencia de la masa tumoral y de la secreción ocasional de hormonas esteroides. En algunos pacientes la naturaleza de la gónada no puede ser determinada cuando éstas se encuentran reemplazadas en su totalidad por el tumor. El estado intersexual que se identifica con mayor frecuencia asociado al desarrollo de gonadoblastoma es la disgenesia gonadal; y se sabe que hacia los 40 años el 25% de los pacientes con DGM desarrolla gonadoblastoma o tumores de células germinales. Macroscópicamente las gónadas presentan una superficie rugosa y/o áspera con nódulos amarillentos y por su tamaño los tumores pueden presentarse como focos microscópicos o medir varios centímetros. Microscópicamente el tumor se compone de nidos bien circunscritos, redondos u ovales, con una mezcla de células germinales de gran tamaño y de los cordones sexuales que semejan células inmaduras de Sertoli o de la granulosa, que por lo general muestran calcificaciones centrales (Russell P y cols, 2002); éstas últimas pueden ser focales o extensas. En 2/3 de los pacientes se encuentran células de Leydig en el componente estromal y se ha sugerido que éstas son las responsables de la secreción hormonal observada en algunos casos. Las células de Sertoli se localizan en la periferia de los túbulos seminíferos y están en íntima asociación con la membrana basal que rodea los nidos. El gonadoblastoma tiene la capacidad de expresar y sintetizar algunas proteínas; las células germinales expresan la proteína VASA, TSPY (Testis Specific protein Y-encoded) y la proteína p53, mientras que las células estromales producen inhibina y la proteína de WT1 (Wilms Tumor gene). El

gonadoblastoma per se no tiene un comportamiento invasivo, sin embargo, 50% de los especímenes muestran evidencia de sobrecrecimiento a expensas del componente germinal, en cuyo caso la lesión ya no se considera benigna y se le denomina disgerminoma/seminoma. Un 10% adicional de los gonadoblastomas pueden desarrollar otros tipos de tumores mixtos de células germinales como el tumor de saco vitelino, el teratoma inmaduro, el carcinoma embrionario y el coriocarcinoma (Russell P y cols, 2002).

1.3.6 Tumor de saco vitelino

Es un tumor maligno que representa aproximadamente el 20% de los tumores primitivos de células germinales. Esta neoplasia se observa en 2 poblaciones diferentes: en niños durante la 1ª. década y en jóvenes postpuberales. El 10% de estos tumores ocurre en los niños, principalmente entre los 16-17 meses y en esta edad es considerada la neoplasia testicular más frecuente, mientras que en los adolescentes la edad promedio de presentación es entre los 16 y 19 años. Clínicamente se encuentra una masa pélvica o escrotal asintomática, 90% de los pacientes presentan elevaciones séricas de alfa feto proteína (AFP) y otros marcadores tumorales como el CA125 y el antígeno carcinoembrionario pueden estar elevados.

1.3.7 Carcinoma embrionario

Es un tumor poco frecuente de células germinales que se puede presentar durante las primeras 2 décadas de la vida, sin embargo, por lo general es diagnosticado alrededor de los 12 años. Los niveles séricos de AFP y hCG están elevados.

1.3.8 Coriocarcinoma

Esta neoplasia representa menos del 1% de los tumores de células germinales. Se presenta en adultos jóvenes entre los 25-30 años de edad y las manifestaciones clínicas se asocian a la presencia de metástasis. Los valores de hCG se encuentran

elevados y en 10% de los pacientes se observa ginecomastia. El pronóstico es malo ya que el diagnóstico por lo general es tardío.

1.3.9 Teratoma

Es un tumor benigno compuesto de distintos tejidos derivados de endo, meso y ectodermo, pueden tener tejidos bien diferenciados o inmaduros. Se presenta tanto en adultos como en niños, donde la edad promedio de diagnóstico es a los 20 meses. Estos son tumores no funcionales.

1.3.10 Seminoma/disgerminoma

Es un tumor maligno de células germinales, morfológicamente tiene un patrón muy uniforme. Se observan células de citoplasma claro o denso con núcleos grandes y regulares con uno o más nucleolos de bordes bien definidos. Clínicamente se presenta como una masa no dolorosa. Por ultrasonido se observa una imagen característica compuesta por un contorno bien delimitado, hipoeoico de manera uniforme y con o sin presencia de lóbulos.

2. JUSTIFICACION

El gonadoblastoma es un tumor poco frecuente que tiende a malignizar. Este se asocia a estados intersexuales, principalmente la DGM. El diagnóstico se realiza generalmente en la 2^a. década de la vida, por lo que el estudio de los casos diagnosticados durante la edad pediátrica podría brindar nuevos conocimientos acerca de la edad, forma de presentación, abordaje y manejo que se le da a los pacientes con riesgo de desarrollar esta neoplasia.

3. OBJETIVOS

1. Analizar las características histológicas de los gonadoblastomas en edad pediátrica.
2. Estudiar el cariotipo gonadal y corroborar el estudio con el resultado obtenido en leucocitos de sangre periférica.
3. Analizar el patrón de distribución de las diferentes líneas celulares en el tumor y en la gónada disgenética.
4. Estudiar la participación de los mosaicos gonadales dentro de la etiopatogenia de los tumores testiculares en la disgenesia gonadal mixta.

4. MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 5 pacientes en edad pediátrica con diagnóstico de disgenesia gonadal mixta que desarrollaron gonadoblastoma. Todos los casos fueron de origen mestizo-mexicano y el motivo de consulta fue la presencia de genitales ambiguos. Todos fueron esporádicos, con historia familiar negativa para ambigüedad genital, enfermedades genéticas, neoplasias y consanguinidad. La evaluación clínica en los pacientes 1-4 fue realizada entre el primer y el segundo año de edad mientras que el quinto caso fue evaluado a los 15 años. El cuadro clínico, edad de diagnóstico, sexo de asignación, cariotipo y hallazgos gonadales se resumen en la tabla 2.

4.1 PERFIL HORMONAL

Los parámetros endocrinos que se estudiaron incluyeron las siguientes mediciones: LH, FSH, ACTH, testosterona/dehidrotestosterona (post estimulación hCG), 17-OH, progesterona y cortisol.

4.2 ANALISIS CITOGENETICO CON BANDAS GTG

Se realizó análisis cromosómico con bandas GTG en leucocitos de sangre periférica y se analizaron 100 metafases en cada caso.

4.3 ANALISIS HISTOLOGICO – DEFINICION DE TERMINOS –

Estría gonadal: es una estructura intraabdominal alargada, que muestra estroma semejante al del ovario con o sin estructuras primitivas de cordones sexuales pero sin folículos o células germinales bien desarrolladas.

Testículo disgenético: es una gónada pequeña, redonda u ovalada, de localización intraabdominal o inguinal, circunscrita por albugínea delgada, con túbulos seminíferos

pobrementemente diferenciados localizados hacia el centro de la gónada y ampliamente separados de la periferia por tejido conectivo estromal.

Gonadoblastoma: Es una neoplasia compuesta principalmente por dos estirpes celulares, células germinales de gran tamaño similares a las observadas en el seminoma/disgerminoma y células pequeñas derivadas de cordones sexuales que semejan células inmaduras de Sertoli/granulosa. Estos elementos están íntimamente relacionados y forman pequeños nidos redondos u ovals, separados por bandas de tejido conectivo y contenidos por una célula basal gruesa. Las células germinales pueden mostrar una actividad mitótica aumentada mientras que los derivados de los cordones sexuales no muestran mitosis. En algunos nidos se observan calcificaciones.

Seminoma/disgerminoma: es un tumor maligno de células germinales compuesto por células grandes, uniformes, con citoplasma claro o denso, núcleos vesiculares y nucleolos prominentes, que se organizan en nidos compactos separados por tabiques finos de tejido conectivo.

Tumor juvenil de células de la granulosa: es una neoplasia compuesta por células uniformes eosinofílicas o pálidas, con núcleos ovals y nucleolos poco aparentes, formando capas alrededor de espacios quísticos semejando a los folículos de Graaf con ausencia de células germinales. Estas células forman figuras mitóticas y por inmunohistoquímica tiñen positivamente para vimentina, proteína S-100, citoqueratina e inhibina.

Tabla 2

Pte.	Edad	Sexo asignado	Genitales externos	Cariotipo	Gónada	
					Der	Izq
1	1m	Femenino	falo 1.3x1.5, seno urogenital, estigmas de Turner	*45,X/46,XY	TD GB	EG
2	11m	Femenino	falo 1.5x0.8, hipospadias, pliegues escrotales, seno urogenital	*45,X/46,XY	GB	GB
2	2m	Masculino	hipospadias escrotales, hernia inguinal	45,X/46,XY	GB EG	TD
4	28m	Femenino	Clitoromegalia de 1.8 cm	46,XY	TD EG GB	TD
5	15a	Femenino	Ambiguos, falo de 6x3, pliegues escrotales y estigmas de Turner	45,X/46,XY	DG	DG

GB=gonadoblastoma, TD=testículo disgenético, * línea celular con Y diagnosticada por análisis molecular, + línea celular 45,X detectada por FISH

4.4 EXTRACCION 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 3 ml de sangre periférica de cada sujeto, colocándose en tubos vacutainer que contenían 0.05 ml de Na₂EDTA como anticoagulante. Con el fin de lisar los eritrocitos, la sangre se colocó en un tubo cónico y se mezcló con un volumen igual de buffer de lisis TTS (trisHCL/ tritón X-100/ sacarosa). La mezcla se homogenizó y transfirió a tubos de microcentrífuga 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 en 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 50 mM y se agregaron 50 µl de SDS al 10% con la finalidad de lisar las

membranas leucocitarias. La mezcla se agitó durante algunos minutos, para precipitar las proteínas se adicionaron 200 μl de NaCl_2 5 M, se agitó y se dejó en reposo. El botón de leucocitos se centrifugó a 9,221g 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°C), 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 el volumen con 200 a 400 μl de agua estéril destilada y deionizada. Las alícuotas de DNA se almacenaron a -20° C hasta su uso.

4.5 ANALISIS POR PCR

En el paciente 1, se realizó estudio por PCR del DNA obtenido de leucocitos y se analizaron diferentes regiones del cromosoma Y (PABY, AMELY, SRY, Ycen y Yqh). Como control intraensayo se amplificó el repetido alfoide centromérico del cromosoma X. El volumen total de la PCR fue de 25 μl ; todas las reacciones incluyeron 50 ng de DNA, 100 ng de cada primer, 1U de taq polimerasa, 1.5 mM MgCl_2 y 80 μl de cada dNTP. El programa para la amplificación de SRY fue: 94° C (5 min), 94° C (1 min), 68° C (1 min) y 72° C (2 min) por 35 ciclos y después 72° C (10 min). Los programas utilizados para el resto de las secuencias fue similar al anterior, lo único que cambió dependiendo de la secuencia analizada fue la temperatura de alineamiento (tabla 3). Todos los ensayos se realizaron por triplicado incluyendo como controles un blanco negativo y DNA de un varón sano como positivo.

Tabla 3

Nombre	Secuencia	Temp. de aliniamiento	Producto amplificado
PABY	PABY-1: 5' - TGG GCA CTT ACA CAT AGA CGT - 3' PABY-2: 5' - CTT CTC TTT GAA GTG TAA GGA G - 3'	Tm = 56° C	250 pb
AMELY	AMELY-1: 5' - CCT ACC GCA TCA GTG AAT TTC - 3' AMELY-2: 5' - TCT GTA TGT GGA GTA CAC ATG G - 3'	Tm = 58° C	216 pb
SRY	XES 10: 5' - GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG C - 3' XES 11: 5' - GTA GCC AAT GTT ACC CGA TTG TC - 3'	Tm = 68° C	615 pb
Ycen	Y1: 5' - ATG ATA GAA ACG GAA ATA TG - 3' Y2: 5' - AGT AGA ATG CAA AGG GTC CC - 3'	Tm = 57° C	170 pb
Yqh	Y1.1: 5' - TCC ACT TTA TTC CAG GCT TGT CC - 3' Y1.2: 5' - TTG AAT GGA ATG GGA ACG AAT GG - 3'	Tm = 57° C	130 pb
Xcen	X1: 5' - AAT CAT CAA ATG GAG ATT TG - 3' X2: 5' - GTT CAG CTC TGT CAG TGA AA - 3'	Tm = 57° C	130 pb

4.6 ANALISIS POR FISH

El análisis por FISH se realizó en cortes desparafinados de tejido gonadal. Se utilizaron sondas de casa comercial Vysis de regiones centroméricas de X y Y marcadas con fluorescencia verde y roja respectivamente; como control interno se utilizó una sonda centromérica del cromosoma 18 marcada en aqua (Figura 2). Se realizó de la siguiente manera: se montaron cortes de 5 micras de espesor del tejido gonadal sobre laminillas cargadas positivamente (FISHER). Para desparafinar se utilizó un kit de casa comercial (Vysis, Inc. Downers Grove, IL), de forma inicial se realizaron 3 lavados consecutivos con un detergente no iónico (Citrisolv) durante 10 minutos, posteriormente la muestra se lavó en 2 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 minutos 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 10 µl de la sonda previamente desnaturalizada, la laminilla se selló y se dejó hibridar a 37° C durante 24 horas. Posteriormente la muestra se lavó a 73° C durante 2 minutos en una solución de lavado que contenía 0.4XSSC/0.3% NP-40 (nonidet P 40), se repitió el lavado en las mismas condiciones en una solución con 2XSSC y 1% de NP-40. Para la visualización de la sonda se aplicaron 10 µl de la contra tinción de DAPI II y se analizó en un microscopio de fluorescencia. Las condiciones de hibridación fueron previamente descritas (Pinkel D y cols, 1986).

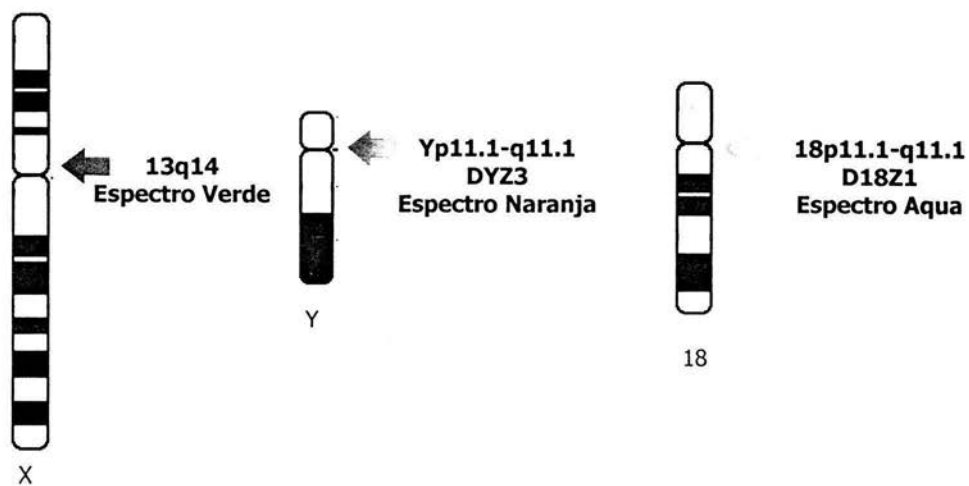


Fig. 2. Sondas utilizadas para el análisis por FISH

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDIO CLINICO

Paciente 1. Esta paciente con sexo de asignación femenino fue valorada al mes de nacida por presentar estigmas de Turner, clínicamente era pequeña para la edad cronológica y en los siguientes meses presentó retardo en el crecimiento. El perfil endocrinológico mostró un estado hiperandrogénico persistente (niveles de testosterona basal de 280 ng/ml; valores de referencia 3-10 ng/ml). Se realizó una laparotomía donde se observó un “quiste paraovárico” derecho de aproximadamente 1 cm, el cual fue extirpado. El análisis histológico reveló un tumor juvenil de las células de la granulosa y el diagnóstico fue confirmado por tinciones de inmunoperoxidasa que fueron positivas para citoqueratina, proteína S-100, vimentina e inhibina (Fig. 5). Se realizó una segunda laparotomía donde se extirparon ambas gónadas y genitales internos; el estudio anatomopatológico reportó del lado derecho un testículo disgenético de 1.0 cm de diámetro con gonadoblastoma focal, trompa de falopio y cordón espermático. En el lado izquierdo se encontró una estría de 0.8x0.4x0.2 cm con trompa de falopio. El útero se encontró en posición central (Fig. 3,4).

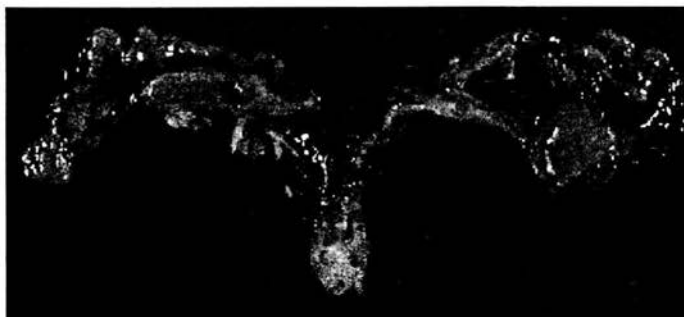


Fig. 3 Genitales internos: **a.** estría y trompa de falopio izquierdo, **b.** testículo disgenético, trompa de falopio y cordón espermático derecho, **c.** útero en posición central

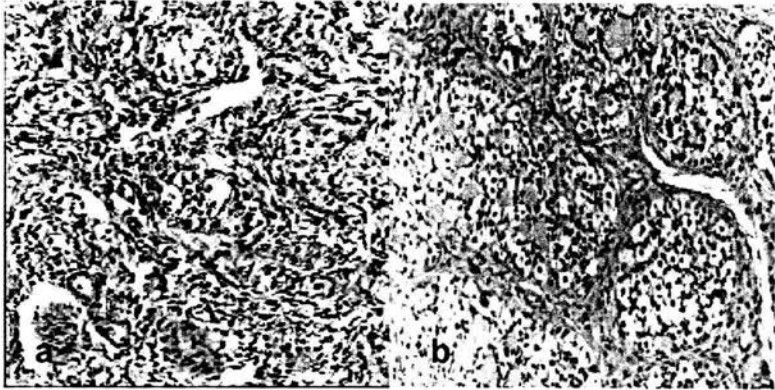


Fig. 4 a. Estría gonadal del lado izquierdo **b.** Gonadoblastoma derecho

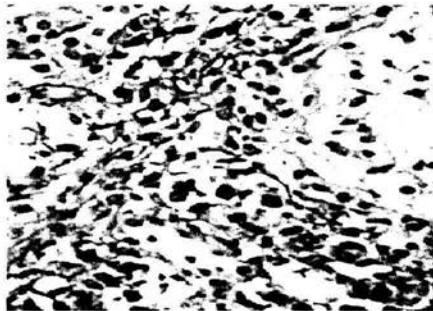


Fig. 5 Tumor juvenil de células de la granulosa con tinción de inmunoperoxidasa

Paciente 2. Este paciente de asignación masculina fue sometido a una laparotomía a los 11 meses de edad en donde se observaron gónadas bilaterales, estructuras parecidas a trompas de falopio y un útero central. Se tomó biopsia de cada gónada la cual reveló gonadoblastoma bilateral (Fig. 6).

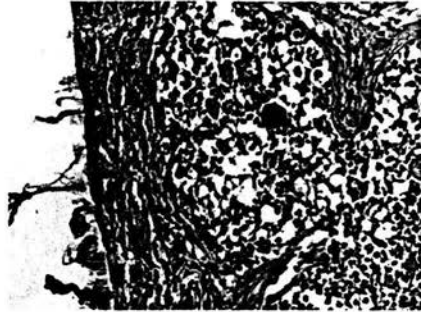


Fig. 6 Corte histológico de gónada derecha con presencia de gonadoblastoma

Paciente 3. Este paciente de asignación masculina, fue sometido a los 2 meses de edad a una laparotomía que reveló: testículo inguinal izquierdo de 1.2 cm de diámetro, el cual fue extirpado, por histología se diagnosticó como un testículo disgenético. A los 24 meses se le realizó una segunda cirugía, en donde fueron extirpados el útero y una gónada derecha de 1.5x0.5x0.5 cm; histológicamente la gónada estaba reemplazada por un gonadoblastoma (Fig. 7).

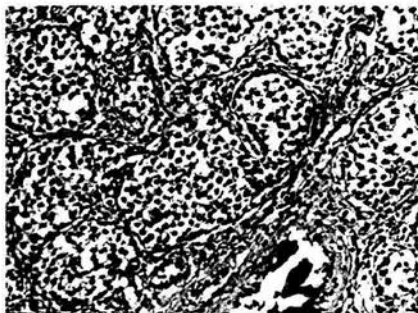


Fig. 7 Gónada derecha reemplazada por gonadoblastoma

Paciente 4. A esta paciente de asignación femenina se le realizó una laparotomía a los 28 meses de edad y ambas gónadas fueron resecadas. La gónada derecha de 2.5 cm correspondía a un testículo disgenético con gonadoblastoma en la región periférica (Fig. 8). Hacia el hilio se identificó una pequeña estría, así como epidídimo rudimentario y una trompa de falopio. En el lado izquierdo solo se identificó una trompa de falopio.

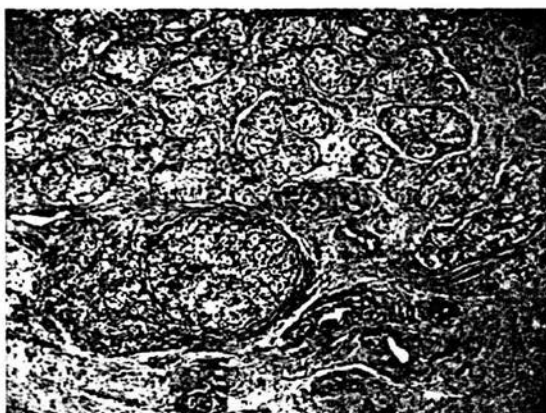


Fig. 8 testículo disgenético con gonadoblastoma

Paciente 5. Esta paciente de 15 años de edad fue valorada por una masa abdominal. La laparotomía mostró en el lado derecho un tumor de 6 cm de diámetro que fue diagnosticado como disgerminoma, éste presentaba áreas de calcificación sugerentes de que provenía de la transformación de un gonadoblastoma (Fig. 9). La gónada izquierda medía 4.5 cm en su diámetro mayor e histológicamente estaba reemplazada por gonadoblastoma con transformación local a disgerminoma. La naturaleza de las gónadas no pudo ser elucidada.



Fig. 9 Disgerminoma derecho con presencia de algunas calcificaciones

5.2 ESTUDIO CITOGENETICO

Se realizó estudio citogenético con bandas GTG en linfocitos de sangre periférica, en cada caso se analizaron 100 metafases, los resultados se observan en la tabla 4.

Tabla 4

PACIENTE	CARIOTIPO
1	Cariotipo 45,X
2	Cariotipo 46,XY
3	Cariotipo 45,X/46,XY
4	Cariotipo 46,XY
5	Cariotipo 45,X/46,XY

5.3 ESTUDIO MOLECULAR

5.3.1 ANALISIS DE PCR

Se realizó estudio por PCR de secuencias del cromosoma Y en la paciente 1. Clínicamente se observaron estigmas de Turner y un cariotipo 45,X. El estudio identificó la presencia de todas las secuencias analizadas, sugiriendo la existencia de una segunda línea celular con Y (Fig. 10). Con la finalidad de identificarla se realizó un nuevo estudio citogenético en donde ésta no se observó en 200 metafases.



Fig.10 Gel de agarosa al 1.5%. Se observan en ambos paneles los productos de amplificación para todas las secuencias del Y analizadas. **a.** Control masculino. **b.** Paciente 1.

5.3.2 ANALISIS POR FISH

Se realizó estudio por FISH en tejido gonadal incluido en parafina con el objetivo de corroborar el cariotipo obtenido en sangre periférica, así como para analizar la distribución de los cromosomas X/Y en células de tejido gonadal y del tumor.

Paciente 1. Con la finalidad de corroborar los resultados por PCR, se realizó análisis por FISH, el cual identificó señal de hibridación para el cromosoma Y en baja proporción. Este resultado confirma la presencia de una segunda línea celular con Y. El análisis de la distribución celular mostró en 300 núcleos, que la línea XY fue 3 veces más frecuente en el gonadoblastoma comparado con la línea celular 45,X presente en la estría gonadal (Fig. 11). Sin embargo, debido a la baja proporción de células con Y observada el significado estadístico disminuyó (tabla 5).

Paciente 2. En este caso el cariotipo en sangre periférica fue 46,XY, con el objetivo de identificar un mosaicismo gonadal 45,X, se realizó análisis por FISH en los tumores bilaterales. Los resultados mostraron la presencia de algunas células con una sola señal de hibridación para el X, evidenciando la presencia de una línea monosómica para el cromosoma X. Con estos resultados se modificó el cariotipo original a 45,X/46,XY.

Paciente 3. Se observaron 300 núcleos en el área del gonadoblastoma derecho y los resultados revelaron que en el gonadoblastoma la línea celular 46,XY representaba el 79%, mientras que la presencia de las células XY en el testículo disgenético fue de 45.6% (Fig. 12, 13). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas e indican que las células con Y son 1.7 veces más frecuentes en el tumor que en los testículos (tabla 5).

Paciente 5. El análisis bilateral del gonadoblastoma/disgerminoma demostró que aproximadamente dos tercios de las células fueron XY. En el tumor izquierdo, el análisis reveló que más de la mitad de las células tumorales (64.8%) fueron XY y el resto tenía una sola X, del lado derecho el 59.8% de las células fueron XY.

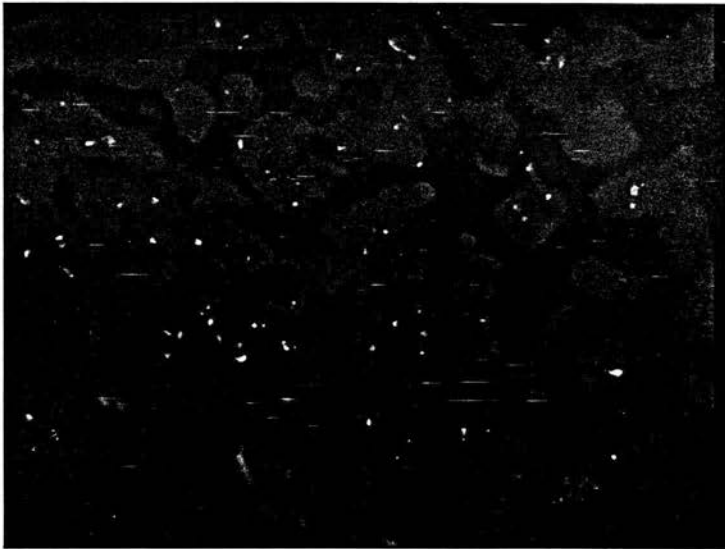


Fig. 11 Estría gonadal derecha. Centrómero de Y (rojo), centrómero de X (verde) y centrómero de cromosoma 18 (aqua)



Fig. 12 Gonadoblastoma. Centrómero de Y (rojo), centrómero de X (verde), centrómero del cromosoma 18 (aqua)



Fig. 13 Testículo disgenético. Centrómero de Y (rojo), centrómero de X (verde), centrómero de cromosoma 18 (aqua)

Tabla 5

Resultados de los hallazgos en los pacientes 1,3 y 5 en el estudio por FISH

Paciente	Cariotipo	Tejido gonadal	18 18 X Y	18 18 X
1	45,X/46,XY	GB derecho	19	281
		Estría izquierda	6	294
3	*45,X/46,XY	GB derecho	237	63
		TD izquierdo	137	163
5	45,X/46,XY	DG derecho	182	122
		DG izquierdo	81	44

GB=gonadoblastoma, TD=testículo disgenético, DG=disgerminoma, 18=sonda centromérica del cromosoma 18, *p<0.001

5. DISCUSION

El gonadoblastoma es un tumor benigno con potencial de malignizar. Aproximadamente 50% de todos los pacientes con gonadoblastoma desarrollan tumores de células germinales, principalmente seminoma/disgerminoma. Alrededor de 8-10% adicional desarrolla otras neoplasias malignas de células germinales como tumor de saco vitelino, teratoma inmaduro, carcinoma embrionario y coriocarcinoma. (Scully RE, 1970. Gourlay WA y cols, 1994. Russell P y cols, 2002). Este tipo de tumores afecta casi de manera exclusiva a un grupo de pacientes con problemas de la diferenciación sexual, sin embargo, se han reportado tres casos de pacientes masculinos sin alteración gonadal y desarrollo de gonadoblastoma (Slowikowska-Hilczler J y cols, 2003). Los síndromes bien caracterizados que se asocian con riesgo de desarrollo tumoral son: disgenesia gonadal mixta (Scully RE, 1970. Gourlay WA y cols, 1994. Chemes H y cols, 2003), algunos pacientes con fenotipo Turner (Gravholt CH y cols, 2000), ocasionalmente algunos casos de pseudohermafroditismo masculino 46, XY (Gourlay WA y cols, 1994. Chemes H y cols, 2003. Gravholt CH y cols, 2000. Chen CP y cols, 1999) y también se ha reportado en un hermafrodita verdadero 46,XX/46,XY (Talerman A y cols, 1990). El desarrollo tumoral en estos pacientes se ha asociado a la presencia del cromosoma Y normal o anormal; a evidencia molecular de secuencias derivadas del Y y a la presencia de gónadas de localización intraabdominal (Chemes H y cols, 2003. Balzac I y cols, 1999. Slowikowska-Hilczler J y cols, 2003).

La edad en que se realiza el diagnóstico del gonadoblastoma es variable, con un rango que va desde el nacimiento hasta la cuarta década, sin embargo, cerca del 94% de los casos reportados en la literatura han sido diagnosticados durante la segunda o tercera década de la vida (Scully RE, 1996). Existen 10 casos donde se reporta gonadoblastoma en edad pediátrica; de éstos, 5 pacientes se diagnosticaron como DGM (Gibbons B y cols, 1999. Obata NH y cols, 1995. Krawczynski M y cols, 1976. Iliev DI y cols, 2002) y sólo en uno de estos casos el diagnóstico se realizó a los 9 meses (Hadad NG y cols, 2003), mientras que el resto de los pacientes tenían

alrededor de 10 años al momento del diagnóstico. De los 5 casos restantes con gonadoblastoma en la niñez, en 4 se identificaron mutaciones en el gen WT1 (Auber F y cols, 2003. Perez de Nanclares G y cols, 2002. Shimoyama H y cols, 2002. Manivel J y cols, 1987) y en uno el diagnóstico fue displasia campomélica (Hong JR y cols, 1995). El gen WT1 es un gen tumor supresor que juega un papel importante en el desarrollo urogenital y gonadal, por lo que anomalías en éste pueden ser las responsables del desarrollo de gonadoblastoma en los pacientes que presentaron mutaciones en WT1. En un caso de disgenesia gonadal 46,XY y gonadoblastoma bilateral se identificó un rearrreglo en la región 13q14, locus para el gen tumor supresor RB, lo que apoyaría la posible participación de estos genes en el desarrollo tumoral (Antonini S y cols, 1997).

En la presente tesis se muestran los hallazgos clínicos, histológicos y moleculares de 5 pacientes en edad pediátrica con disgenesia gonadal mixta y tumor gonadal; en 4 de ellos el tumor se diagnosticó durante los dos primeros años de vida y en el quinto caso una masa abdominal fue la causa del diagnóstico a los 15 años.

El gonadoblastoma es un tumor en el que las células germinales y las células inmaduras de Sertoli/granulosa se encuentran íntimamente mezcladas, cuando se observa sobrecrecimiento del componente germinal y del estroma gonadal, la lesión deja de considerarse benigna. En el caso 1, se identificó un tumor pequeño localizado en la región paraovárica, el análisis histológico reveló un tumor juvenil de células de la granulosa. Aunque es un tumor raro, esta neoplasia ha sido descrita tanto en testículos de niños con un desarrollo sexual anormal como normal (Tanaka Y y cols, 1994. Young RH y cols, 1985. Raju U y cols, 1986. Goswith J y cols, 1996). Como ya se mencionó estos tumores presentan inmunorreactividad para algunos marcadores, por lo que en nuestro paciente el diagnóstico definitivo se confirmó mediante inmunohistoquímica para citoqueratina, proteína S-100, vimentina e inhibina. Se realizó una segunda cirugía, en donde fueron extirpados el útero y una gónada derecha histológicamente reemplazada por gonadoblastoma. El análisis histológico de los casos 2-4 reveló las

características histopatológicas clásicas de gonadoblastoma. En el caso 5, se observó del lado derecho un seminoma/disgerminoma con la presencia de calcificaciones extensas y se observó un gonadoblastoma izquierdo con sobrecrecimiento de las células germinales, por lo que se le consideró como una lesión maligna. En el caso 1 diagnosticado originalmente como síndrome de Turner con cariotipo 45,X, el estudio molecular reveló la presencia de una segunda línea celular 46,XY. Estos hallazgos están de acuerdo con varios reportes de la literatura donde material del cromosoma Y o un cromosoma Y, puede estar presente hasta en un 12% de los casos con fenotipo Turner (Saenger P y cols, 2001. Schellhas HF y cols, 1974). Este caso fue diagnosticado por citogenética convencional como 45,X; pero el estudio por PCR de DNA obtenido de leucocitos de sangre periférica y el análisis de FISH realizado en tejido gonadal confirmó la presencia, en bajos niveles, de una línea celular XY. Antes del advenimiento de los estudios moleculares se sugería que 30% de estos pacientes tenían riesgo de desarrollar gonadoblastoma (Schellhas HF y cols, 1974. Verp MS y cols, 1987), sin embargo, datos más recientes basados en evidencias moleculares, indican que la ocurrencia de gonadoblastoma entre las pacientes con Turner Y positivas es entre 7-10% y este valor incrementa con la edad (Gravholt CH y cols, 2000. Canto P y cols, 2004). El caso 2 fue originalmente diagnosticado como 46,XY, sin embargo, el análisis por FISH en tejido gonadal mostró una línea celular 45,X. Este resultado demostró la presencia de un mosaicismo oculto para una monosomía del X. Recientemente se han identificado mosaicos ocultos para los cromosomas sexuales asociados a hermafroditismo verdadero (Braun A y cols, 1993. Hiort O y cols, 1995. Queipo G y cols, 2002. Maler E y cols, 2003). En el caso 2 la presencia de la línea celular 45,X de localización gonadal sugiere que este mecanismo también puede participar en la patogénesis de la gónada disgenética (Röpke A, 2004). Con estos resultados y la evidencia en la literatura, proponemos realizar análisis molecular en todas las gónadas disgenéticas.

Por los resultados obtenidos en nuestros pacientes, observamos que no solo alteraciones en genes que participan en estos procesos ocasionan anomalías en el desarrollo sexual. La presencia de mosaicos podría considerarse como otro mecanismo importante en la etiología del desarrollo gonadal anormal (Pöpke A y cols, 2004).

Las diferencias en la distribución y proporción de las líneas X/Y en las gónadas disgenéticas y los tumores gonadales, mostraron en los casos 1,3 y 5 una mayor proporción de células XY en el tumor comparadas con la gónada disgenética (tabla 5). Nuestros datos están de acuerdo con reportes previos en donde el análisis por FISH demostró que la distribución de las líneas celulares X/Y en pacientes con DGM no es homogénea (Chemes H y cols, 2003) y otro estudio donde se reportan 3 casos con disgenesia gonadal mixta y gonadoblastoma, encontró que la proporción de células XY era significativamente mayor en el tumor que en el testículo disgenético. Estos autores proponen que la presencia del cromosoma Y podría participar en la patogénesis del tumor (Iezzoni JC y cols, 1997). Nuestros datos confirman estos hallazgos, sugiriendo la participación del gen **TSPY**, localizado en el locus GBY (gonadoblastoma locus on the Y chromosome) en el desarrollo del tumor (Lau YF y cols, 2003. Page DC y cols, 1987. Salo P y cols, 1995). El gen TSPY podría ser considerado como el gen responsable del desarrollo del gonadoblastoma ya que evidencias en la literatura apoyan este hecho. Este gen se encuentra codificado por un miembro de la familia secuencia específica del cromosoma Y localizado en Yp. Estudios realizados con inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra la proteína de TSPY demostraron diferencias entre el gonadoblastoma y la gónada disgenética, ya que se observó una intensa inmunorreactividad en las células del gonadoblastoma (Hildenbrand R y cols, 1999). Por lo tanto la especificidad y el aumento en la expresión de este gen observada en los tumores testiculares sugiere la participación activa de TSPY en la transformación maligna. Los datos en la literatura apoyan nuestros resultados donde proponemos que una mayor proporción de línea celular con Y resulta en una sobre expresión de TSPY. Recientemente Page et al reportaron que el TSPY está localizado en una región

está localizado en una región repetida – amplificada – del cromosoma Y y se calcula que existen 35 copias del gen, tanto funcionales como no funcionales. Estas están dispuestas en tandem, su expresión se limita al testículo y no se han encontrado homólogos en el cromosoma X o en autosomas. El “cluster” de 35 unidades del TSPY es el arreglo en tandem más grande y homogéneo que codifica para proteínas identificado en el genoma humano y se ha identificado que estas secuencias en el cromosoma Y tienen potencial de conversión génica (Skaletsky H y cols, 2003). Por esta razón sugerimos que en estos pacientes la edad temprana de desarrollo tumoral pudiera ser atribuida al mecanismo de conversión génica, que ocasiona microarreglos en el cromosoma Y alterando la función de TPSY. Otra posibilidad podría ser la relación entre la influencia ambiental y el genoma.

En pacientes con disgenesia gonadal pura 46,XY el riesgo calculado de malignidad es de 28% a los 20 años mientras que para pacientes con disgenesia gonadal mixta es de 19% a la misma edad (Scully RE, 1996). Sin embargo, es necesario realizar estudios combinando varias metodologías para poder precisar la frecuencia real del riesgo de malignización ya sea de la estría o del testículo. Nuestros casos demuestran que los tumores gonadales pueden presentarse a edades muy tempranas por lo que la remoción profiláctica de las gónadas es aconsejable.

REFERENCIAS

Antonini S, Barbosa AS, Rosenberg C, Barbosa AC, Moreira-Filho AC, Vianna-Morgante AM. 1997. RB1 deletion in gonadoblastoma in a XY female. *Hum Genet.* 101(2):181-5.

Auber F, Lortat-Jacob S, Sarnacki S, Jaubert F, Salomon R, Thibaud E, Jeanpierre C, Nihoul-Fekete C. 2003. Surgical Management and genotype/phenotype correlations in WT1 gene-related diseases Drash, Frasier syndromes. *J Pediatr Surg.* 38: 124-9.

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, Lohrs U, Schwarz HP, 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(3):578-85.

Canto P, Kofman-Alfaro S, Jiménez AL, Soderlund D, Barron C, Reyes E, Méndez JP, Centeno JC. 2004. *Cancer Genet Cytogenet.* 150(1):70-2.

Chemes H, Muzulin PM, Venara MC, Mulhmann, Mdel C, Martinez M, Gamboni M. 2003. Early manifestations of testicular dysgenesis in children: pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumors development. *APMIS.* 111:12-23.

Chen CP, Chern SR, Wang TY, Wang W, Wang KL, Jeng CJ. 1999. Androgen receptor gene mutations in 46,XY females with germ cell tumors. *Hum Reprod.* 14:664-670.

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. *Nature Genetics.* 14:62-68.

Dumic M, Jukic S, Batinica S, Ille J, Filipovic-Grcic B. 1993. Bilateral gonadoblastoma in a 9-month-old infant with 46,XY gonadal dysgenesis. *J Endocrinol Invest.* 16:291-293.

Eble JN, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn IA. 2004. Tumors of the testis and paratesticular tissue. En: *Pathology & Genetics, Tumors of the Urinary System and*

Male Genital Organs, World Health Organization Classification of Tumors. IARC Press. Lyon. pp. 217-260.

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

Gibbons B, Tan SY, Yu CC, Cheah E, Tan HL. 1999. Risk of gonadoblastoma in female patients with Y chromosome abnormalities and dysgenetic gonads. *J Pediatr Child Health*. 35:210-3.

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

Goswith J, Pettinato G, Manivel JC. 1996. Testicular sex cord stromal tumors in children: Clinicopathologic study of sixteen children with review of the literature. *Pediatr Pathol Lab Med*. 16:451-470.

Gourlay WA, Johnson HW, Pantzar JT, McGillivray B, Crawford R, Nielsen WR. 1994. Gonadal tumors in disorders of sexual differentiation. *Urology*. 43:537-540.

Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW, Muller J. 2000. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:3199-3202.

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.

Haddad NG, Walvoord EC, Cain MP, Davis MM. 2003. Seminoma and a gonadoblastoma in an infant with mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr*. 143(1):136.

Hadjithanasiou 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.

Hatano T, Yoshino Y, Kawashima Y, Shirai H, Iizuka N, Miyazawa Y, Sakata A, Onishi T. 1999. Case of gonadoblastoma in a 9-year-old boy without physical abnormalities. *Int J Urol*. 6:164-166.

Hildenbrand R, Schroder W, Brude E, Schepler A, Koing R, Stutte HJ, Arneemann J. 1999. Detection of TSPY protein in a unilateral microscopic gonadoblastoma of a Turner mosaic patient with a Y-derived marker chromosome. *J Pathol.* 189(4):623-6.

Hiort O, Gramss B, Klauber GT. 1995. True hermaphroditism with 46,XY karyotype and a point mutation in the SRY gene. *J Pediatr.* 126(6):1022.

Hong JR, Barber M, Scott CI, Guttenberg M, Wolfson PJ. 1995. 3-Year-old phenotypic female with campomelic dysplasia and bilateral gonadoblastoma. *J Pediatr Surg.* 30:1735-7.

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

Iezzoni JC, Von Kap-Herr C, Golden WL, Gaffey MJ. 1997. Gonadoblastomas in 45,X/46,XY mosaicism: analysis of Y chromosome distribution by fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol.* 108:197-201.

Iliev DI, Ranke MB, Wollmann HA. 2002. Mixed gonadal dysgenesis and precocious puberty. *Horm Res.* 58:30-3.

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.

Jiménez AL, Kofman-Alfaro A, Berumen J, Hernández E, Canto P, Méndez 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.

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.

Kofman Alfaro S, Méndez Blanco JP, Zenteno Ruíz JC. 2001. Diferenciación sexual normal y sus alteraciones. En: *Genética Clínica: Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias.* 3ª. Edición. Editorial Manual Moderno. México. pp. 443-466.

- Krawczynski M, Walczak M, Miskowiak B, Sarrazain O. 1976. Gonocytoma III (gonadoblastoma) in a 12-year-old girl with mixed gonadal dysgenesis. *Endokrynol Pol.* 27:299-306.
- Kriedberg J, Sariola H, Loring J, Maeda M, Pelletier J. 1993. Wt-1 is required for early kidney development. *Cell.* 174: 679-691.
- Lau YF, Lau HW, Komuves LG. 2003. Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res.* 101:250-260.
- Le Caignec C, Baron S, McElreavey K, Joubert M, Rival JM, Mechinaud F, David A. 2003. 46,XY gonadal dysgenesis: Evidence for autosomal dominant transmission in a large kindred. *Am J Med Genet.* 116A:37-43.
- Lopez M, Canto P, Aguinaga M, Torres L, Cervantes A, Alfaro G, Mendez JP, Kofman-Alfaro S. 1998. Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet.* 5:120-124.
- 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, Leeitner 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.
- Manivel J, Sibley R, Dehner L. 1987. Complete and incomplete Drash syndrome: a clinicopathologic study of six cases of a dysontogenetic-neoplastic complex. *Hum Pathol.* 18:80-89.
- Melo KF, Martin RM, Costa EM, Carvalho FM, Jorge AA, Arnhold IJ, Mendonca BB. 2002. An unusual phenotype of Frasier syndrome due to IVS9 +4C>T mutation in the WT1 gene: predominantly male ambiguous genitalia and absence of gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(6):2500-5.
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S. 1997. Defects of urogenital development in mice lacking EmX2. *Development.* 124:1653-1664.
- 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.

Obata NH, Nakashima N, Kawai M, Kikkawa F, Mamba S, Tomoda Y. 1995. Gonadoblastoma with dysgerminoma in one ovary and gonadoblastoma with dysgerminoma and yolk sac tumor in the contralateral ovary in a girl with 46XX karyotype. Gynecol Oncol. 58:124-8.

Page DC. 1987. Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. Development; 101:151-155.

Pask A, Overbeek, Behringer R. 2003. Mouse Models of Penis Disorders. Third International Symposium on the biology of vertebrate sex determination. Kona, Hawaii. pp 83.

Perez de Nanclares G, Castano L, Bilbao JR, Vallo A, Rica I, Vela A, Martul P. 2002. Molecular analysis of Frasier syndrome: mutation in the *WT1* gene in a girl with gonadal dysgenesis and nephronophthisis. J Pediatr Endocrinol Metab. 15:1047-1050.

Pinkel D, Gray JW, Trask B. 1986. 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. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci USA. 83: 2934-2938.

Queipo G, Zenteno JC, Pena R, Nieto K, Radillo A, Dorantes LM, Erana L, Lieberman E, Soderlund D, Jimenez AL, Ramon G, Kofman-Alfaro S. 2002. Molecular analysis in true hermaphroditism: demonstration of low-level hidden mosaicism for Y-derived sequences in 46,XX cases. Hum Genet. 111:278-283.

Raju U, Fine G, Warriar R, Rini R, Weiss L. 1986. Congenital testicular juvenile granulosa cell tumor in a neonate with X/Y mosaicism. Am J Surg Pathol. 10:577-583.

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.

Röpke A, Pelz A-F, Volleth M, Schlößer H-W, Morlot S, Wieacker PF. 2004. Sex chromosomal mosaicism in the gonads of patients with gonadal dysgenesis, but normal female or male karyotypes in lymphocytes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 190:1059e62.

Russell P, Robboy SJ, Anderson MC. 2002. Germ cell tumors of the ovaries. In: Robboy SJ, Anderson MC, Russell P. Ed. *Pathology of the female reproductive tract*. London. Churchill Livingstone; pp 641-690.

Saenger P, Wikland KA, Conway GS, Davenport M, Gravholt CH, Hintz R, Hovatta O, Hultcrantz M, Landin-Wilhelmsen K, Lin A, Lippe B, Pasquino AM, Ranke MB, Rosenfeld R, Silberbach M. 2001. Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 86:3061-3069.

Salo P, Kaariainen H, Petrovic V, Peltomaki P, Page DC, de la Chapelle A. 1995. Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome. *Genes Chromosomes Cancer*. 14:210-214.

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

Schellhas HF. 1974. Malignant potential of the dysgenetic gonad. II. *Obstet Gynecol*. 44:455-462.

Scully RE. 1970. Gonadoblastoma A Review of 74 cases. *Cancer*; 25:1340-1356.

Scully RE. 1996. Embryology and disorders of sexual development. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tubes and broad ligament. *Atlas of Tumor Pathology*. 3^a. Edición. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology; pp. 307-312.

Shimoyama H, Nakajima M, Naka H, Park YD, Hori K, Morikawa H, Yoshioka A. 2002. A girl with bilateral ovarian tumors: Frasier syndrome. *Eur J Pediatr*. 16:81-83.

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

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R,

McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S, Page DC. 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 423:825-837.

Slowikowska-Hilczer J, Romer TE, Kula K. 2003. Neoplastic potential of germ cells in relation to disturbances of gonadal organogenesis and changes in karyotype. *J Androl*. 24:270-278.

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

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

Talerman A, Verp MS, Senekjian E, Gilewski T, Vogelzang N. 1990. True hermaphrodite with bilateral ovotestes, bilateral gonadoblastomas and dysgerminomas, 46,XX/46,XY karyotype, and successful pregnancy. *Cancer*. 66:2668-2672.

Tanaka Y, Sasaki Y, Tachibana K, Suwa S, Terashima K, Nakatani Y. 1994. Testicular juvenile granulosa cell tumor in an infant with X/XY mosaicism clinically diagnosed as true hermaphroditism. *Am J Surg Pathol*. 18:316-322.

Tevosian S, Albrecht 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 y FOG2. *Development*. 129:4627-4634.

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

Verp MS, Simpson JL. 1987. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet*. 25:191-218.

Vlasak I, Plochl E, Kronberger G, Bergendi E, Rittinger O, Hagermann M, Schmitt K, Blumel P, Glatzl J, Fekete G, Kadrnka-Lovrencic M, Borkenstein M, Hausler G, Frisch. 1999. Screening of patients with Turner syndrome for "hidden" Y-mosaicism. *Klin Padiat*. 211:30-34.

Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P. 1995. The Sry-related gene *Sox9* is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature Genet.* 9:15-20.

Young RH, Lawrence WD, Scully RD. 1985. Juvenile granulosa cell tumor. Another neoplasm associated with abnormal chromosomes and ambiguous genitalia. *Am J Surg Pathol.* 9:737-743.

Distribution of Y-chromosome-bearing cells in gonadoblastoma and dysgenetic testis in 45,X/46,XY infants

Yolanda-Rocío Peña¹, Karem Nieto², Rebeca Alvarez², Icela Palma², Nayelli Nájera², Luis Eraña³, Luis M Dorantes⁴, Susana Kofman-Alfaro² and Gloria Queipo²

¹Department of Pathology, Hospital Infantil de Mexico Federico Gómez; ²Department of Human Genetics, Hospital General de México-School of Medicine Universidad Nacional Autónoma de México; ³Department of Urology and ⁴Department of Endocrinology, Hospital Infantil de Mexico Federico Gómez, Mexico city, Mexico

Gonadoblastoma is an unusual mixed germ cell–sex cord–stromal tumor that has the potential for malignant transformation and 30% of all patients with gonadoblastoma develop germ cell tumors mainly dysgerminoma/seminoma. An additional 10% gives rise to other malignant germ cell neoplasms. This tumor affects a subset of patients with intersex disorders. The age at diagnosis is variable ranging from birth to the fourth decade, but around 94% of cases are diagnosed during the first three decades of life and there are few cases with gonadoblastoma diagnosed in infants. In this paper, we present the histological and molecular findings of four patients with gonadal dysgenesis who developed gonadoblastoma in the first 2 years of life and one case with bilateral dysgerminoma diagnosed at 15 years of age. The sex chromosomes of mosaic patients do not distribute homogeneously in dysgenetic gonads; however, statistical analysis of FISH results revealed significant differences between the XY cell line in the gonadoblastoma compared with the dysgenetic testis. Our cases demonstrate that tumors could be present at a very early age, so the prophylactic removal of the gonads is advised.

Modern Pathology (2004) 0, 000–000. doi:10.1038/modpathol.3800293

Keywords: mixed gonadal dysgenesis; early gonadal tumors; gonadoblastoma; dysgerminoma/seminoma; FISH analysis

Gonadoblastoma is an unusual mixed germ cell–sex cord–stromal tumor that has the potential for malignant transformation. This unique gonadal neoplasm was described by Scully¹ in 1957 as a benign tumor that affects mostly a subset of patients with intersex disorders. The syndromes associated with a clear risk for tumor development are mixed gonadal dysgenesis,^{1–3} some patients with Turner phenotype,⁴ occasionally in 46,XY male pseudohermaphroditism^{2–5} and there is also a reported case in a 46,XX/46,XY true hermaphrodite.⁶ Tumor development in these patients is associated with the presence of either normal or abnormal Y-chromosomes or molecular evidence for Y-derived sequences and intrabdominal location of the abnormal gonad.^{3,7,8} Histologically, the tumor is

composed of well-circumscribed round to oval nests with a mixture of germ cells and sex-cord-type cells resembling immature Sertoli or granulosa cells that often show central calcification.⁹ Gonadoblastoma *per se* does not show invasive behavior but 30% of the specimens demonstrate evidence of overgrowth by the germinal component. In this case, the lesion is no longer considered benign and it is termed dysgerminoma/seminoma. An additional 10% of gonadoblastomas develops different types of germ cell neoplasias, such as yolk sac tumor, immature teratoma, embryonal carcinoma and choriocarcinoma.⁹ Around 94% of cases are diagnosed during the first three decades; however, the age at diagnosis is variable ranging from birth up to the fourth decade of life. Diagnosis in infants is rare;^{10–12} however, several cases were diagnosed around 10 year of age.^{13–17} The presence of gonadoblastoma in young patients and the potential risk for malignant transformation is the main reason for early diagnosis and treatment in some cases of intersex patients. In this paper, we present the histological and molecular findings of four patients with gonadal dysgenesis,

Correspondence: G. Queipo, Department of Genetics, Hospital General de México-Facultad de Medicina, UNAM, Dr Balmis 148 Col. Doctores CP 06726, Mexico City, Mexico.
E-mail: skofman@servidor.unam.mx
Received 13 July 2004; revised 06 August 2004; accepted 12 August 2004; published online 00 00 0000

who developed gonadoblastoma in the first 2 years of life and one case with bilateral dysgerminoma diagnosed at 15 years of age.

Material and methods

We studied five patients with mixed gonadal dysgenesis, who developed gonadoblastoma at an early age. All cases were of Mexican mestizo origin and consulted because of ambiguous genitalia. Clinical evaluation in cases 1–4 was performed between 1 and 2 years of age while the fifth patient was evaluated at 15 years old. All cases were sporadic, family history was negative for genital ambiguity, genetic diseases, neoplasia and consanguinity. Clinical features, age of diagnosis, sex of rearing, karyotype and gonadal findings are summarized in Table 1.

GTG chromosomal analysis was performed on peripheral blood leukocytes analyzing at least 100 metaphases in each case. The endocrinal profile includes LH, FSH, ACTH, testosterone/dihydrotestosterone (after GCH stimulation), 17-OH progesterone and cortisol.

Histological Analysis

Hematoxylin and eosin sections of all gonads were reviewed by one of the authors.

PCR Analysis

In patient 1, PCR in DNA obtained from leukocytes, analyzing different regions of Y-chromosome (*PABY*, *ZFY*, *SRY*, *Ycen* and *Yqh*) was performed according to a previous report.¹⁴ An X-chromosome aliphoid

centromeric repeat was also amplified as an internal positive control. The total PCR volume was 25 μ l; all amplifications included 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. Program for *SRY* amplification was: 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). All assays were performed in triplicate including a blank as negative control and DNA from a normal male as a positive control.

FISH Analysis

FISH analysis was carried out in paraffin-embedded gonadal tissue sections. Using an X and Y centromeric region labeled with spectrum green and orange, respectively; as an internal control we used a centromeric probe of chromosome 18 labeled in aqua. Hybridization conditions were previously described by Pinkel et al.^{20,21} After hybridization, the number of X- and Y-chromosome signals per nucleus in the tumor and in the dysgenetic testis was scored by two observers, 300 nuclei were counted from each tissue, the tumor and the tissue score were performed independent and repeated two times. Only nuclei where two 18 centromeres were scored and all damage, overlapping or without hybridization signal nuclei were discarded. The hybridization efficiency, defined as the percentage of intact nonoverlapping cells containing signal was 96%. Statistical analysis of the FISH data was performed using a χ^2 test.

Results

Patient 1. At the age 1 month this phenotypic female assigned with stigmata of Turner and 45,X karyotype

Table 1 Clinical characteristics

Patient	Age	Sex of rearing	External genitalia	Karyotype	Gonad	
					R	L
1	1 mo	Female	Ambiguous genitalia: phallus 1.3X1.5, urogenital sinus, Turner stigmata	45,X/46,XY ^a	DT+GB	Streak
2	11 mo	Female	Ambiguous genitalia: phallus 1.5X0.8 hypospadias, scrotal folds urogenital sinus	45,X/46,XY ^b	BX GB	BX GB
3	2 mo	Male	Ambiguous genitalia: scrotal hypospadias, inguinal hernia	45,X /46,XY	GB+Streak	DT
4	28 mo	Female	Enlarged clitoris 1.8 cm DT+Streak+GB	46,XY DT		
5	15y	Female	Ambiguous genitalia: phallus 6 \times 3 cm, scrotal folds, Turner stigmata	45,X/46,XY	DG+blunt out GB	DG

DT = dysgenetic testis; GB = gonadoblastoma; BX GB = gonadoblastoma observed in a biopsy.

^aY cell line was recognized with molecular analyses.

^bIn this case the 45,X was detected by FISH. mo = months, y = years.

underwent laparoscopy because of hyperandrogenic status (basal testosterone levels 280 ng/ml; reference value 3–10 ng/ml). A right 'paraovarian cyst' measuring approximately 1 cm was observed and excised. Histological analyses revealed a juvenile granulosa cell tumor (JGCT) (Figure 1d, e). The diagnosis was confirmed by immunoperoxidase stains that were positive for cytokeratin, protein S-100, vimentin and inhibin. The child was small for age and on the following months she had failure to thrive. A second laparoscopic surgery was performed and both gonads and internal genitalia were removed. There was a dysgenetic testis measuring 1.0 cm in diameter with focal gonadoblastoma, spermatic cord and fallopian tube on the right side while a streak measuring $0.8 \times 0.4 \times 0.2$ cm with fallopian tube was on the left side. A central uterus was also removed (Figure 1a–c).

Patient 2. Laparoscopic findings at 11 months of age in this male assigned infant revealed bilateral gonads resembling ovaries, fallopian duct-like structures and a central uterus. A biopsy taken from both gonads showed bilateral gonadoblastoma.

Patient 3. A laparotomy was performed in this 2-month-old assigned male that revealed a 1.2 cm in diameter left inguinal testis that was resected, histologically it was diagnosed as a dysgenetic testis. A second surgery was performed at age 24 months, an uterus and the right gonad measuring $1.5 \times 0.5 \times 0.5$ cm were removed; histologically this gonad was replaced by gonadoblastoma.

Patient 4. Abdominal gonads were removed through laparotomy at 28 months old in a female reared patient. The right gonad was a 2.5 cm in diameter dysgenetic testis with peripheral gonadoblastoma. Towards the hilus a small streak was observed as well as a rudimentary epididymis and fallopian tube. On the left side only a fallopian tube was identified.

Patient 5. A laparotomy was performed due to an abdominal mass at 15 years of age. A right side tumor measuring 6.0 cm in largest dimension was diagnosed as dysgerminoma; it had areas of calcification suggesting a 'burned-out gonadoblastoma' (Figure 1e). The left gonad measured 4.5 cm in its major dimension and histologically it was replaced by gonadoblastoma with focal transformation to dysgerminoma. The nature of the gonads could not be elucidated.

PCR and FISH Analysis

PCR amplification of DNA obtained from leukocytes was performed in patient 1 where all Y sequences analyzed were present disclosing a Y-positive cell line, therefore, the final karyotype was 45,X/46,XY (data not shown).

FISH analysis was performed to search a hidden mosaicism for X monosomy, as well as to know the X- and Y-chromosome cell distribution in the

gonadal tissue and in the tumor on these patients. Results are summarized in Table 2. In patient 1, a low percentage of Y hybridization signal was observed compared with the 45,X cell line in the left side gonadoblastoma and in the right side streak (Figure 1g, h). These data confirm the presence of an XY cell line in this patient. However, the gonadoblastoma contained three more times the XY cells than the streak but the low level of Y-bearing cells observed diminished the significance of these findings. In case 3, we scored 300 cells and the results revealed that the 46,XY cell line was 79% in the gonadoblastoma (Figure 1i), while the presence of XY cell in the dysgenetic testis was 46%. These results indicated that the Y-bearing cells are 1.7 times more frequent in the tumor than in the testis ($P < 0.001$). The hybridization efficiency was 96% in the tumor and in the dysgenetic testis, thus, the data obtained cannot be attributed to technical differences. In patient 2, the GTG karyotype in peripheral blood was 46,XY. In order to identify the presence of a hidden 45,X cell line in the gonad, we performed FISH analysis in the bilateral tumors. The results showed the presence of some cells with only an X hybridization signal, confirming the presence of a hidden X monosomy and modifying the original karyotype to 45,X/46,XY. In patient 5, the analysis of the bilateral gonadoblastoma/dysgerminoma revealed that approximately 60% of the cells were XY in the right side, while the analysis of the contralateral tumor showed that 65% of the cells were XY and the rest had only one X.

Discussion

Pure gonadoblastoma is regarded as an *in situ* form of germ cell tumor; it does not behave as a malignant lesion but approximately 30% of all patients with gonadoblastoma develop germ cell tumors mainly dysgerminoma/seminoma.⁹ An additional 10% gives rise to other malignant germ cell neoplasms such as yolk sac tumor, immature teratoma, embryonal carcinoma or choriocarcinoma. These tumors have a malignant behavior; therefore early prophylactic removal of the gonads in these patients is advised.^{1,9} This kind of tumor affects almost exclusively a subset of patients with intersex disorders, however, there are three cases in the literature where gonadoblastoma developed in normal males.²² The well-known syndromes associated with a risk for tumor development are: mixed gonadal dysgenesis, some patients with Turner phenotype and in several cases of 46,XY male pseudohermaphroditism.²⁻⁷ There is also a reported case of this type of tumor in a 46,XX/46,XY true hermaphrodite.⁹ The tumor development in these patients had been associated with the presence of normal or abnormal Y-chromosomes, molecular evidence for Y-derived sequences and intrabdominal location of the abnormal gonads.^{1,4,7,8,19} The age at diagnosis is variable ranging

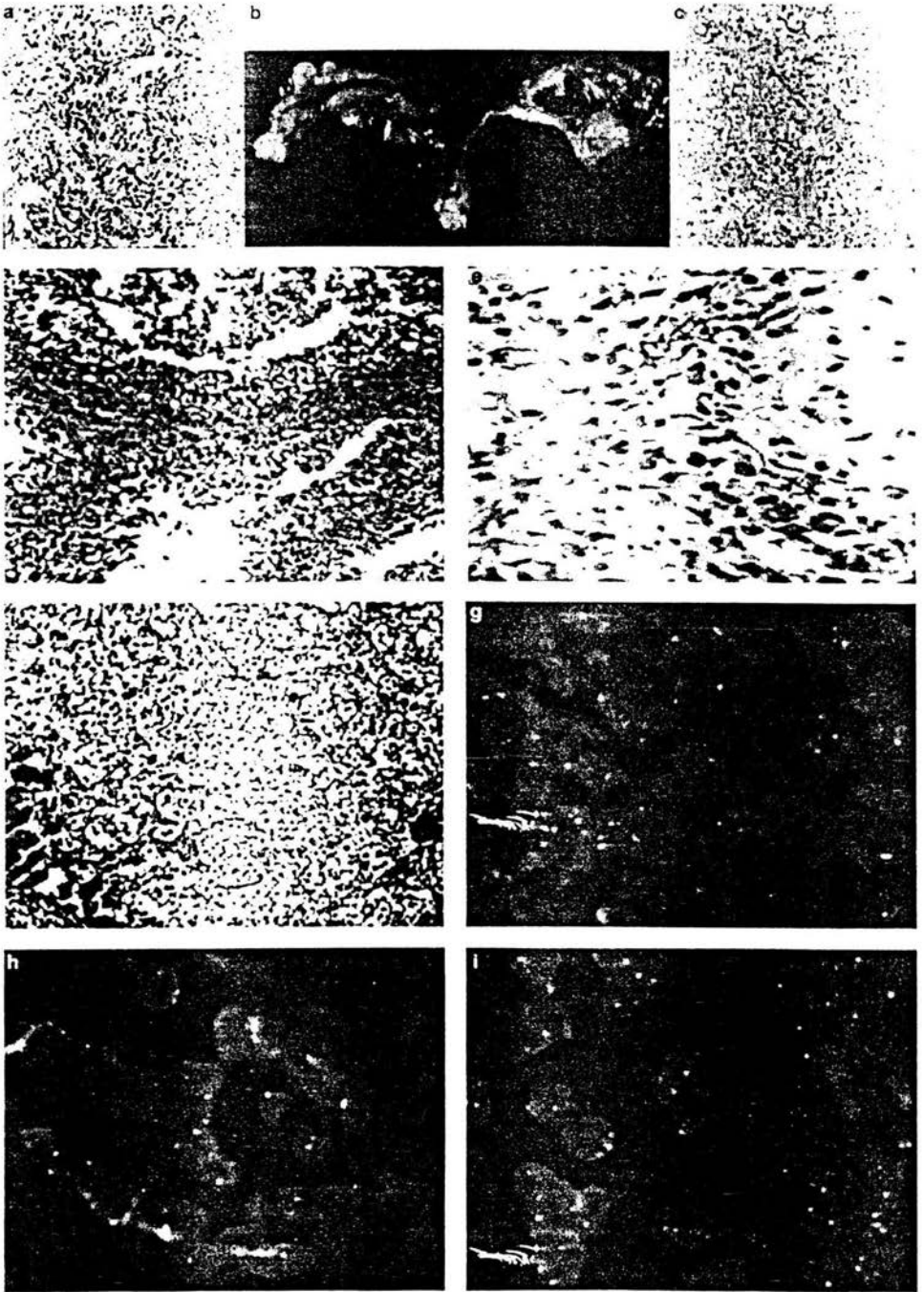


Table 2 FISH analysis

Case	Karyotype	Tissue	1818XY	1818X
1	45,X/46,XY	Right GB	19	281
		Left streak	6	294
3	45,X/46,XY	Right GB	237	63
		Left DT	137	163
5	45,X/46,XY	Right GB+Dys	182	122
		Left GB+Dys	81	44

GB = gonadoblastoma; DT = dysgenetic testis; Dys = dysgerminoma. An 18 centromere DNA probe was used as an internal control and only nuclei with two hybridization signals were considered. 1818XY = 46,XY. 1818X = 45,X. **P* < 0.001.

from birth to the fourth decade; around 94% of cases reported in the literature was diagnosed during the second or third decades of life.²³ Data in the literature revealed 10 cases where the tumor developed during childhood, five of them had a 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenesis and the diagnosis was performed only in one case at 9 months old while the rest were diagnosed around 10 years of age.¹⁰⁻¹⁵ The other five patients had a 46,XY gonadal dysgenesis, one of them, a 3-year-old girl had campomelic dysplasia, sex reversal and bilateral gonadoblastoma while in the other four a *WT1* mutation was observed.^{16,24-27} The presence of a suppress tumor mutation in these individuals could participate in early tumor development.

Here we present the histological and FISH analysis in four infants and in one 15-year-old patient with mixed gonadal dysgenesis and gonadal tumor. Four of them were diagnosed during the first 2 years of life and in the fifth case an abdominal mass was the cause of the diagnosis.

Gonadoblastoma is a unique tumor in which germ cells and immature Sertoli/granulosa cells are intimately mixed, in addition to the germ cell overgrowth, the stromal-cell component is also capable of neoplastic transformation. In case 1, a small paraovarian cystic tumor proved to be a JGCT. Although rare, this neoplasm has been described in testicles of infants, children with abnormal sexual development²⁸⁻³⁰ and in some patients with no apparent sexual abnormalities.¹² Histological analysis of the tumors in cases 2-4 revealed typical characteristics of gonadoblastoma. In case 5, a dysgerminoma/seminoma with extensive calcifications was observed in the right side and a gonadoblastoma with overgrowth of germ cells in the left side.

Molecular findings in cases 1 and 2 revealed the presence of hidden mosaicisms. Case 1 was diag-

nosed by conventional cytogenetics as 45,X but PCR in DNA obtained from peripheral blood and FISH performed in gonadal tissue confirmed the presence of a low-level XY cell line. These findings are in agreement with several reports, in which Y material in Turner Syndrome could be present in approximately 12% of the cases.^{31,32} Previous studies suggested that 30% of these patients have the potential risk of developing gonadoblastoma.^{32,33} However, new molecular data indicate that the occurrence of gonadoblastoma among the Y-positive Turner patients is lower than 10% and this risk increases with age.⁴ Case 2 was originally diagnosed as 46,XY, but FISH analysis in gonadal tissue showed a 45,X cell line. Recently, hidden mosaicisms for X- and Y-chromosomes were detected by FISH analysis and associated with true hermaphroditism.³⁴ The presence of a hidden X-bearing cell line in case 2 confirms that this mechanism could also participate in the pathogenesis of the abnormal gonad and we propose to perform molecular analysis in all the dysgenetic gonads. We also analyzed the differences in cell distribution between the gonads and the tumors in cases 1, 3 and 5. A higher proportion of XY cells were observed within the tumors compared with the dysgenetic gonads (Table 2). Our data obtained by FISH analysis demonstrated that the sex chromosomes of mosaic patients do not distribute homogeneously in dysgenetic gonads as was previously described³ and confirms the original findings reported by Iezzoni *et al*³⁵ where the proportion of the XY cell line was higher in the tumor than in the stromal cells. These authors proposed that the presence of Y-chromosome material participates in the pathogenesis of the tumor. Our data are in agreement with these findings and suggest that the previously proposed *TPSY* gene (testis-specific protein, Y encoded) localized within the GBY locus (gonadoblastoma locus on the Y-chromosome), participates in the multistep malignant transformation.¹⁶⁻¹⁸ The higher proportion of the Y cell line observed in the tumor suggests a *TPSY* overexpression. Recently, Skaletsky *et al*³⁶ proposed that *TPSY* is localized in a Y-chromosome amplicon repeated region. This cluster is the largest and homogenous tandem array identified in the human genome and these sequences have the potential for gene conversion. The early age of tumor development in these patients could be attributed to gene conversion leading to microrearrangements on the Y-chromosome that upset the *TPSY* function. Another possibility could be an abnormal relation between the environmental influence and the genome. In patients with pure 46,XY gonadal dysgenesis, the calculated risk for malig-

Figure 1 Patient 1: (a) Streak gonad, (b) uterus, bilateral tubes, streak on the left side and dysgenetic testis with gonadoblastoma on the right side, (c) gonadoblastoma, (d) juvenile granulosa cell tumor (JGCT), (e) immunoperoxidase for inhibin on JGCT, (f) dysgerminoma in patient 5. FISH analysis using an X centromere probe (green), a Y centromere probe (red) and an 18 centromere probe (aqua). Patient 1: (g) left streak showing a very low-level of Y hybridization signal and (h) right gonadoblastoma, showing a higher level of Y signal than the streak. Patient 3: (i) FISH analysis in the right side gonadoblastoma exhibiting a higher hybridization signal for the Y-chromosome.

nancy is 28% by the age of 20 years while for patients with mixed gonadal dysgenesis it is 19% at the same age;²⁴ nevertheless, our cases demonstrate that tumors could be present at a very early age, so prophylactic removal of the gonads is advised.

Acknowledgement

This work was supported by a DGAPA Grant number IN206902-3, the Research Division of the Hospital General de México and CONACYT Grant number 45209-M.

References

- 1 Scully RE. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 1970;25:1340-1356.
- 2 Gourlay WA, Johnson HW, Pantzar JT, *et al.* Gonadal tumors in disorders of sexual differentiation. *Urology* 1994;43:537-540.
- 3 Chemes H, Muzulin PM, Venara MC, *et al.* Early manifestations of testicular dysgenesis in children: pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumors development. *APMIS* 2003;111:12-23.
- 4 Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW, *et al.* Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3199-3202.
- 5 Chen CP, Chern SR, Wang TY, *et al.* Androgen receptor gene mutations in 46,XY females with germ cell tumors. *Hum Reprod* 1999;14:664-670.
- 6 Talerman A, Verp MS, Senekjian E, *et al.* True hermaphrodite with bilateral ootestes, bilateral gonadoblastomas and dysgerminomas, 46,XX/46,XY karyotype, and successful pregnancy. *Cancer* 1990;66:2668-2672.
- 7 Vlasak I, Ploch E, Kronberger G, *et al.* Screening of patients with Turner syndrome for 'hidden' Y-mosaicism. *Klin Padiat* 1999;211:30-34.
- 8 Slowikowska-Hilczler J, Romer TE, Kula K. Neoplastic potential of germ cells in relation to disturbances of gonadal organogenesis and changes in karyotype. *J Androl* 2003;24:270-278.
- 9 Russell P, Robboy SJ, Anderson MC. Germ cell tumors of the ovaries. In: Robboy SJ, Anderson MC, Russell P (eds). *Pathology of the Female Reproductive Tract*. Churchill Livingstone: London, 2002, pp 641-690.
- 10 Dumic M, Jukic S, Batinica S, *et al.* Bilateral gonadoblastoma in a 9-month-old infant with 46,XY gonadal dysgenesis. *J Endocrinol Invest* 1993;16:291-293.
- 11 Haddad NG, Walvoord EC, Cain MP, *et al.* Seminoma and a gonadoblastoma in an infant with mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr* 2003;143:136.
- 12 Goswith J, Pettinato G, Manivel JC. Testicular sex cord stromal tumors in children: Clinicopathologic study of sixteen children with review of the literature. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996;16:451-470.
- 13 Gibbons B, Tan SY, Yu CC, *et al.* Risk of gonadoblastoma in female patients with Y chromosome abnormalities and dysgenetic gonads. *J Pediatr Child Health* 1999;35:210-213.
- 14 Obata NH, Nakashima N, Kawai M, *et al.* Gonadoblastoma with dysgerminoma in one ovary and gonadoblastoma with dysgerminoma and volk sac tumor in the contralateral ovary in a girl with 46XX karyotype. *Gynecol Oncol* 1995;58:124-128.
- 15 Krawczynski M, Walczak M, Miskowiak B, *et al.* Gonocytoma III (gonadoblastoma) in a 12-year-old girl with mixed gonadal dysgenesis. *Endokrynol Pol* 1976;27:299-306.
- 16 Auber F, Lortat-Jacob S, Sarnacki S, *et al.* Surgical Management and genotype/phenotype correlations in WT1 gene-related diseases Drash, Frasier syndromes. *J Pediatr Surg* 2003;38:124-129.
- 17 Iliev DI, Ranke MB, Wollmann HA. Mixed gonadal dysgenesis and precocious puberty. *Horm Res* 2002;58:30-33.
- 18 Hong JR, Barber M, Scott CI, *et al.* 3-Year-old phenotypic female with campomelic dysplasia and bilateral gonadoblastoma. *J Pediatr Surg* 1995;30:1735-1737.
- 19 Lopez M, Canto P, Aguinaga M, *et al.* Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 1998;5:120-124.
- 20 Pinkel D, Gray JW, Trask B. Cytogenetic analysis by *in situ* hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;1:151-157.
- 21 Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2934-2938.
- 22 Hatano T, Yoshino Y, Kawashima Y, *et al.* Case of gonadoblastoma in a 9-year-old boy without physical abnormalities. *Int J Urol* 1999;6:164-166.
- 23 Scully RE. Embryology and disorders of sexual development. Tumors of the ovary, mal developed gonads, fallopian tubes and Broad Ligament. In: *Atlas of Tumor Pathology*, 3rd ed. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC, 1996, pp 307-312.
- 24 Hong JR, Barber M, Scott CI, *et al.* 3-Year-old phenotypic female with campomelic dysplasia and bilateral gonadoblastoma. *J Pediatr Surg* 1995;30:1735-1737.
- 25 Perez de Nanclares G, Castano L, Bilbao JR, *et al.* Molecular analysis of Frasier syndrome: mutation in the WT1 gene in a girl with gonadal dysgenesis and nephronophthisis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15:1047-1050.
- 26 Shimoyama H, Nakajima M, Naka H, *et al.* A girl with bilateral ovarian tumors: Frasier syndrome. *Eur J Pediatr* 2002;16:81-83.
- 27 Manivel J, Sibley R, Dehner L. Complete and incomplete Drash syndrome: a clinicopathologic study of six cases of a dysontogenetic-neoplastic complex. *Hum Pathol* 1987;18:80-89.
- 28 Tanaka Y, Sasaki Y, Tachibana K, *et al.* Testicular juvenile granulosa cell tumor in an infant with X/XY mosaicism clinically diagnosed as true hermaphroditism. *Am J Surg Pathol* 1994;18:316-322.
- 29 Young RH, Lawrence WD, Scully RD. Juvenile granulosa cell tumor. Another neoplasm associated with abnormal chromosomes and ambiguous genitalia. *Am J Surg Pathol* 1985;9:737-743.
- 30 Raju U, Fine G, Warrior R, *et al.* Congenital testicular juvenile granulosa cell tumor in a neonate with X/XY mosaicism. *Am J Surg Pathol* 1986;10:577-583.

- 31 Saenger P, Wikland KA, Conway GS, *et al*. Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3061–3069.
- 32 Schellhas HF. Malignant potential of the dysgenetic gonad. II. *Obstet Gynecol* 1974;44:455–462.
- 33 Verp MS, Simpson JL. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;25:191–218.
- 34 Queipo G, Zenteno JC, Pena R, *et al*. Molecular analysis in true hermaphroditism: demonstration of low-level hidden mosaicism for Y-derived sequences in 46,XX cases. *Hum Genet* 2002;111:278–283.
- 35 lezzoni JC, Von Kap-Herr C, Golden WL, *et al*. Gonadoblastomas in 45,X/46,XY mosaicism: analysis of Y chromosome distribution by fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Clin Pathol* 1997;108:197–201.
- 36 Lau YF, Lau HW, Komuves LG. Expression pattern of a gonadoblastoma candidate gene suggests a role of the Y chromosome in prostate cancer. *Cytogenet Genome Res* 2003;101:250–260.
- 37 Page DC. Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development* 1987;101:151–155.
- 38 Salo P, Kaariainen H, Petrovic V, *et al*. Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;14:210–214.
- 39 Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, *et al*. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003;423:825–837.