

11216

4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.

"ANALISIS DEL GEN SRY EN TEJIDO GONADAL Y SANGRE PERIFERICA DE PACIENTES HERMAFRODITAS VERDADEROS CON CARIOTIPO 46,XX"

T E S I S

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
C. I. O. ESPECIALIZADO
PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN GENETICA MEDICA

P R E S E N T A :
GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCIA



Handwritten signature of Gloria Eugenia Queipo Garcia

ASESORES DE TESIS: DRA. SUSANA KOFMAN E.

DR. JUAN CARLOS ZENTENO R.



Handwritten signature of Juan Carlos Zenteno R.

2001

MEXICO, D. F.

SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M.



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO, O.D.



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.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética del Hospital General de México; bajo la tutoría de la Dra. Susana Kofman E y el Dr. Juan Carlos Zenteno R.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Genética del Hospital General de México, por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Susana Kofman por su apoyo para la realización de esta tesis.

Al Dr. Juan Carlos Zenteno por su tutoría.

A todos mis compañeros Residentes.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
Etapa cromosómica	3
Esquema molecular de la diferenciación sexual	4
Etapa gonadal	15
Etapa fenotípica	23
Hermafroditismo Verdadero (HV)	24
JUSTIFICACIÓN	28
OBJETIVOS	29
SUJETOS Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	49
REFERENCIAS	56

RESUMEN

En el humano la diferenciación sexual se produce en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica. La primera se inicia con la fertilización, estableciendo un complemento cromosómico XY para el varón o XX para la hembra. En ausencia del cromosoma Y las gónadas bipotenciales evolucionarán a ovarios, por lo que la presencia de este cromosoma es necesaria para la diferenciación testicular. La segunda etapa esta dirigida por el gen SRY que induce la transformación de la gónada primitiva en testículo, y por último el desarrollo sexual fenotípico, que está determinado por la acción de hormonas sintetizadas por la gónada fetal. Alteraciones en cualquier fase del desarrollo sexual conducen a diversas anomalías de la diferenciación sexual. El hermafroditismo verdadero, considerado como una forma de reversión sexual, se caracteriza por el desarrollo de tejido testicular y ovárico en un mismo sujeto; los individuos con esta anomalía presentan ambigüedad genital variable y en el 60% de los casos son 46,XX. En el resto de los casos se encuentran líneas celulares con presencia de Y. Mediante técnicas moleculares se ha observado que solo el 10% de los HV 46,XX presentan SRY en su genoma, y el mecanismo por el cual ocurre el desarrollo testicular en estos pacientes permanece sin explicación. Determinar la presencia de secuencias del cromosoma Y en las gónadas de pacientes con HV verdadero puede contribuir a la

identificación de nuevos mecanismos de formación del ovotestis en estos pacientes. En el presente estudio se analizaron 4 pacientes con HV y cariotipo 46,XX. Todos los pacientes estudiados fueron negativos para secuencias del gen SRY en DNA de linfocitos de sangre periférica; el estudio del DNA extraído de las gónadas de los pacientes 1 y 2 demostró secuencias de SRY en DNA del ovotestis y DNA de la región testicular del ovotestis, mientras que la amplificación en DNA de los ovotestis de los pacientes 3 y 4 resultó ser negativa para este gen. Además la paciente 1 presentó una delección de la región 5' de SRY mientras que la secuencia de este gen en la paciente 2 no mostró ninguna mutación. Estos resultados indican la existencia de un mecanismo etiológico poco usual en la formación de la gónada en los HV 46,XX en donde la presencia temprana de SRY es suficiente para diferenciar parcialmente el testículo, y posteriormente este material genético se pierde en la mayoría de los tejidos.

ANTECEDENTES

Etapa cromosómica

La diferenciación sexual es uno de los fenómenos biológicos de mayor trascendencia, ya que permite la perpetuación de las especies con reproducción sexual. En el humano la diferenciación sexual se produce en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica⁽¹⁾.

La diferenciación cromosómica se inicia al momento de la fertilización, cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza un óvulo que aporta un cromosoma X. De esta forma se establece el dimorfismo sexual que caracteriza a los mamíferos, en los cuales la hembra presenta un complemento cromosómico sexual XX y el macho XY. La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma de un individuo^(2,3).

El desarrollo temprano de la cresta urogenital, hacia la gónada indiferenciada y finalmente al tejido gonadal diferenciado depende de la expresión e interacción de una serie de genes que actúan sobre las diferentes estirpes celulares localizadas en estas estructuras.

Esquema molecular de la diferenciación sexual

El esquema molecular que caracteriza a la diferenciación sexual en mamíferos aún no se define, por lo que para su estudio estos genes, se han clasificado en tres grupos⁽⁴⁾.

El primero consiste en factores de transcripción como por ejemplo SF1^(5,6), WT1^(7,8), LIM1⁽⁹⁾, Emx2⁽¹⁰⁾, GATA4⁽¹¹⁾ M33⁽¹²⁾, DMT1⁽¹³⁾ entre otros, los cuales están involucrados en algunos de los procesos de diferenciación temprana, y aunque no de manera consecutiva y no necesariamente interactuando entre ellos, participan desde la diferenciación de la cresta genital, hasta la diferenciación de las estirpes celulares específicas de las gónadas y estructuras relacionadas.

El segundo grupo de genes, representados principalmente por SRY^(14,15), SOX9^(16,17) y otros genes relacionados, tiene la función específica de promover el desarrollo testicular. Un tercer grupo participa antagonizando el desarrollo testicular y probablemente promoviendo el desarrollo del ovario (DAX1⁽¹⁸⁾ y Wnt4⁽¹⁹⁾). (Figura 4).

La caracterización tanto de la estructura como de la función de estos genes, se realiza principalmente en modelos biológicos animales (animales "knock-out") o en pacientes con alguna alteración de la diferenciación sexual, quienes al perder uno o dos alelos funcionales sugieren el momento del desarrollo en que estos genes, ejercen su función.

SF1

Este gen es miembro de la subfamilia de receptores nucleares huérfanos, para los que aún no se ha identificado un ligando activador específico⁽⁵⁾.

Las características estructurales de este factor de transcripción son: un dominio de unión al DNA compuesto por dos dedos de zinc, altamente conservados entre los mamíferos, en la región carboxiterminal se encuentra un dominio característico a esta familia de receptores nucleares, que interactúa con secuencias específicas (AGGTCA) del DNA, tiene además dos regiones, una rica en prolina y la otra del tipo AF-2 involucradas en la activación de la transcripción de este gen⁽²⁰⁾.

SF1 fue el primer gen identificado como activador en la biosíntesis de esteroides, se encuentra activo durante el desarrollo embrionario en regiones asociadas a funciones endocrinas como son las gónadas, suprarrenales, hipófisis e hipotálamo^(21,22).

En mutantes nulas para SF1 se observa que existe pérdida de las gónadas, suprarrenales, además de alteraciones en la función de los gonadotropos y estructuras hipotalámicas ventromediales⁽²³⁻²⁵⁾.

En las gónadas de animales mutantes que carecen de este gen, la cresta genital inicia su desarrollo, es colonizada por las células germinales, y alrededor del día 11-11.5 d.p.c detiene su desarrollo y degenera vía apoptosis⁽²³⁾ y además no se observa la formación de suprarrenales; estos hallazgos sugieren que SF1 no está involucrado en el desarrollo

inicial de la gónada sino por el contrario su participación parece ser necesaria para la diferenciación, mantenimiento y desarrollo de las células somáticas.

WT1

WT1 es otro de los genes identificados, cuya función se circunscribe al desarrollo temprano de la gónada y el riñón.

Este gen es considerado como un factor de transcripción con un dominio de dedos de zinc, se ha asociado a tumor de Wilms y se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 (p13). Tiene 10 exones, que durante la transcripción y empalme generan cuatro formas mayores de RNA⁽⁷⁾, existen dos sitios de inicio de la traducción y las modificaciones post-traduccionales generan dos isoformas prácticamente idénticas que únicamente difieren en la presencia o ausencia de tres aminoácidos lisina (K), treonina (T), serina (S) localizados entre el tercero y cuarto dedo de zinc; La presencia del dominio KTS modifica la afinidad de la proteína por el DNA.

La isoforma KTS positiva se asocia con proteínas implicadas con el empalme y la edición del RNA, sugiriendo que además de participar como factor de transcripción tiene una función en el procesamiento del RNA⁽²⁶⁾ Al interactuar con otros genes WT1 puede regular la transcripción como activador o como represor⁽²⁷⁾.

Se han asociados tres síndromes diferentes a mutaciones en este gen: 1) pacientes con deleciones heterocigotas de WT1 presentan diversas malformaciones genitourinarias menores así como predisposición al desarrollo de tumores renales en infancia.

2) El síndrome de Denys-Drash (DDS) caracterizado por reversión sexual, malformaciones genitourinarias y tumor de Willms, se ha explicado por mutaciones heterocigotas sin sentido localizadas en los dominios de dedos de zinc⁽²⁸⁾. La repercusión molecular de estas mutaciones se considera como un efecto dominante negativo ya que pierde la capacidad para unir DNA y de esta forma interfiere con la función normal del alelo silvestre.

3) El Síndrome de Frasier es otra de las anormalidades relacionadas con mutaciones en WT1; En este síndrome los pacientes 46,XY presentan reversión sexual así como malformaciones urogenitales, en los pacientes con síndrome de Frasier existe perdida de la forma KTS, por lo que esta alterado el empalme del RNA considerado como crítico para la determinación sexual⁽²⁹⁾.

A los 9.5 d.p.c, WT1 se expresa en el mesodermo intermedio, posteriormente la expresión se localiza en la gónada y en el mesenquima del mesonefros. La presencia de WT1 es necesaria para regular las señales del epitelio celómico, dirigiendo el ingreso de células del este epitelio ⁽³⁰⁾, hacia la cresta urogenital.

Lim1 y Emx2

Estos genes pertenecen a la familia de genes con caja homeótica⁽⁹⁾, se expresan durante el desarrollo temprano en la cresta urogenital, epitelio celómico, los ductos mesonéfricos, gónadas, suprarrenales, y el riñón⁽¹⁰⁾.

Ratones homocigotos para deleciones en estos genes pierden desde etapas muy tempranas la capacidad para desarrollar estas estructuras.

M33

Este gen está relacionado estructuralmente con los genes "*polycomb*" (PcG) de *Drosophila*, y sus mutaciones en ratones originan retardo en el desarrollo gonadal, y aunque la gónada logra desarrollarse ésta no es normal. Los fenotipos encontrados en animales XY que pierden este gen presentan diversos grados de reversión sexual, por lo que no ha sido posible identificar la etapa precisa del desarrollo donde actúa esta proteína. Se ha propuesto que M33 actúa antes y después de SRY/Sry⁽¹²⁾.

En la *Drosophila* los productos de estos genes son los encargados de mantener la expresión de genes homeóticos, responsables de proveer información de posición al embrión⁽¹²⁾. El mecanismo de acción es la expresión de genes formando complejos multiméricos que compactan la cromatina haciendo inaccesible la interacción con factores de transcripción⁽³¹⁾. Los genes blancos homeóticos de M33 en el sistema

urogenital aún no son identificados, sin embargo se conoce que genes como Hox 3 y Hox 4. se expresan a lo largo del sistema urogenital⁽³²⁾.

DMT1

Este gen se encuentra asociado con genes que participan en la diferenciación sexual de *C. Elegans* y *Drosophila*. Estos genes pertenecen a la familia de factores de transcripción que contienen dominio de unión al DNA (DM)⁽¹³⁾ el cual se asocia con secuencias específicas de DNA. En el humano DMT posee el dominio DM y esta relacionado con la determinación sexual, se localiza en 9p región asociada a reversión sexual en individuos XY⁽⁴⁾.

GATA 4

Pertenece a la familia de factores de transcripción identificados en el testículo y en el ovario (GATA1-6). GATA4 es el único en expresarse en la gónada en desarrollo⁽¹¹⁾. A los 11.5 d.p.c se expresa en la cresta urogenital de ambos sexos, posteriormente en el macho se localiza en la célula de Sertoli y las células intersticiales, mientras que en el ovario existe incremento de su expresión a las 16 d.p.c.

La proteína codificada por este gen une secuencias consenso de SF1, WT1 y Hormona antimulleriana (HAM), aunque no es el responsable directo de la regulación de estos genes⁽³³⁾.

SRY

El dimorfismo gonadal, se inicia en la sexta semana de la vida intrauterina. En presencia del cromosoma Y la gónada primitiva se transformará en testículo por acción del Factor Determinante Testicular (FDT) localizado en el brazo corto del cromosoma Y (Yp 11.3); de no existir FDT, como ocurre en los productos 46,XX, la gónada primitiva evolucionará hacia ovario^(3,34).

En 1990 se identificó el gen específico que induce la transformación de la gónada primitiva en testículo. El gen del factor determinante testicular, denominado SRY en el humano y Sry en el ratón se encuentra localizado y conservado en todas las especies de mamíferos⁽³⁵⁾. Al presentarse mutaciones en este gen en humanos, o deleciones únicas de Sry en ratón (Y^{Tdyml}) originan síndromes de reversión sexual⁽³⁶⁾, indicando que la participación de este gen en el desarrollo testicular es crítica.

Entre de los días 10.5 y 12 d.p.c. Sry se expresa en la porción gonadal de la cresta urogenital, antes de que ocurra la divergencia histológica hacia ovario o testículo. Esta expresión se limita a las diferentes estirpes celulares del testículo, la expresión de SRY debe de ser específica en el tiempo y este lapso es crítico para una función adecuada, por lo que si la expresión de este gen es fuera del tiempo indicado, puede ocasionar pérdida de la función⁽³⁶⁻³⁸⁾.

SRY presenta una estructura sencilla, contando únicamente con un sólo exón y no tiene intrones, los transcritos originados son de 1.1 kb, presenta un marco abierto de lectura (ORF) de 615 pares de bases (pb), el cual codifica para una proteína de 204 aminoácidos con un peso molecular de 23.9 kilodaltones⁽³⁹⁾. Aunque se desconocen los elementos reguladores específicos de la transcripción, se sabe que estos se localizan principalmente en la región 5´ y en algunas secuencias de la región 3´^(40,41).

Estudios en ratones transgénicos han aportado datos interesantes al estudio de la regulación y función de este gen. La presencia de Sry en algunos animales transgénicos XX induce el desarrollo testicular y reversión sexual completa⁽⁴²⁾. Si se regula la expresión de Sry la severidad de la reversión sexual es variable y esto también ocurre si se modifica la concentración del transcrito y el momento en el que se expresa. Estos datos muestran hechos interesantes: el primero es que Sry es capaz de activarse en animales transgénicos XX, sugiriendo que todos los genes necesarios para la activación de este factor se encuentran presentes en un ambiente genético XX y, en segundo lugar la expresión de Sry crea un umbral crítico para la determinación sexual y este es altamente sensible a efectos de dosis y de tiempo^(43,44).

SRY codifica para una proteína con un dominio conservado de alta movilidad HMG (*High mobility group*), que actúa como regulador de la

transcripción en otros genes⁽⁴⁵⁾. No se ha identificado ningún tipo de polimorfismo asociado a esta región, a diferencia de las regiones localizadas fuera de este dominio que comparte poca homología entre las diferentes especies^(46,47).

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, facilitando de esta forma el ensamblaje de complejos nucleoproteicos⁽⁴⁸⁾, y presumiblemente el plegamiento en el DNA da como resultado una yuxtaposición de otros factores de transcripción unidos a sitios distantes, de esta forma se induce la activación o represión de la transcripción de genes blanco⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾.

El estudio del SRY en algunos de pacientes con reversión sexual 46,XY, ha permitido identificar mutaciones que señalan los aminoácidos importantes para la estabilidad estructural de la proteína así como los sitios críticos de contacto con el DNA⁽⁵²⁾.

Algunas alteraciones de la diferenciación sexual han sido asociadas con mutaciones en el gen SRY. En 10-20% de los pacientes 46,XY con disgenesia gonadal se han observado mutaciones de novo en SRY. También han sido reportados algunos casos familiares⁽⁴⁶⁾.

Otro grupo de proteínas asociadas al gen SRY son las denominadas SOX (Sry-like HMG-box), estas comparten 60% de homología con el dominio HMG del gen determinante del testículo. Hasta el momento varias proteínas SOX han sido caracterizadas, sin embargo no todas se han relacionado con el desarrollo y la diferenciación sexual⁽⁵³⁾. Un miembro de esta familia es SOX9 el cual participa activamente durante los procesos de diferenciación sexual. SOX 9 fue identificado por primera vez como el responsable de la displasia campomélica, patología ósea asociada a reversión sexual XY⁽⁵³⁻⁵⁵⁾. En estudios de expresión en gónadas en desarrollo de ratones, se observa un patrón de expresión dimórfico: en estadios muy tempranos el transcrito se expresa en ambos sexos en bajas concentraciones y alrededor del día 11.5 d.p.c la expresión aumenta en la gónada masculina y se inhibe en la gónada femenina; cuando los cordones testiculares ya se han formado la expresión de SOX9 se limita y se mantiene únicamente en las células de Sertoli^(14,56). La máxima expresión de este gen correlaciona con la expresión de Sry por lo que se considera que ambos genes participan de forma conjunta en el mismo momento y lugar en la diferenciación testicular. Estudios en pacientes con displasia campomélica y reversión sexual han apoyado los hallazgos en animales de laboratorio y actualmente se conoce que además de la función que tiene esta proteína

en la morfogénesis del hueso, SOX 9 se encuentra relacionado con el desarrollo testicular⁽⁵⁷⁾.

DAX1 y Wnt-4

Por último, los genes que se consideran como antagonistas del desarrollo ovárico y probablemente promotores del desarrollo ovárico son DAX1⁽¹⁶⁾ y Wnt-4⁽¹⁷⁾. DAX1 es miembro de la familia de receptores nucleares, este gen se encuentra ligado al cromosoma X, localizado en la región del brazo corto de este cromosoma que se relaciona con reversión sexual sensible de dosis (DSS), duplicaciones o translocaciones de esta región ocasionan reversión sexual en pacientes XY⁽⁵⁸⁾. En 1994 se identificó en esta región al gen responsable de hipoplasia suprarrenal congénita e hipogonadismo hipogonadotrópico (AHC)⁽⁵⁹⁾. En ambos sexos DAX1 se expresa en la cresta urogenital; en la gónada masculina coincide con la expresión de Sry y conforme la diferenciación continua su expresión es inhibida en la gónada masculina y mantenida en la gónada femenina. Debido a que mutaciones de este gen no parecen afectar de forma directa el desarrollo ovárico, se ha sugerido que este tiene una función antitestículo, antagonizando con la función de SRY. DAX1 actúa en la misma vía que SF1 y al parecer su efecto represor lo ejerce a través de interactuar con este gen.

El último, y más reciente gen asociado con desarrollo ovárico es Wnt4. Este factor de transcripción pertenece a la familia de genes Wnt, se ha relacionado con el desarrollo de las células esteroideogénicas. En ovarios en desarrollo de ratones XX que carecen de este gen se observa expresión de enzimas características de las células de Leydig. En machos adultos Wnt^{-/-} se observa disrupción de la arquitectura testicular y del desarrollo ductal. Estos hallazgos sugieren la hipótesis de que Wnt4 es necesario para suprimir el desarrollo de las células de Leydig en el ovario⁽¹⁷⁾.

Etapas gonadales

La gónada primitiva se desarrolla a partir de una estructura mesodérmica denominada cresta urogenital, la cual ocupa la cavidad celómica, ésta se encuentra localizada entre los primordios de las extremidades. La cresta urogenital se divide en tres segmentos diferentes: el pronefros que contiene el primordio de la glándula suprarrenal, la región central denominada mesonefros de donde emergerá la gónada; en esta región también se localizan los ductos mesonéfricos y túbulos mesonéfricos que posteriormente desarrollarán las estructuras wolffianas y müllerianas. En la región posterior de la cresta urogenital se encuentra el metanefros que contribuirá a la formación de los riñones. (Figura 1).

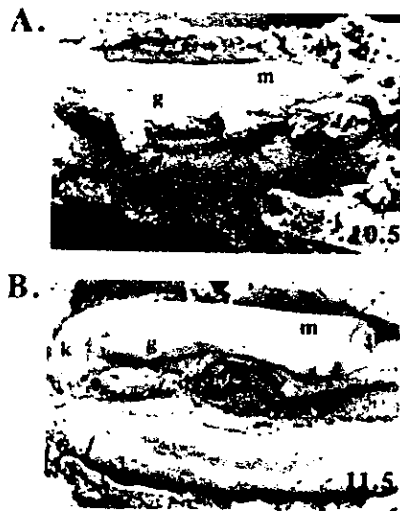


Figura 1: Micrografía electrónica de la cresta urogenital a los 10.5 d.p.c (A) La región(g) donde se localiza la cresta genital. (B) a los 11.5 d.p.c, en la región mesonéfrica de la cresta urogenital se localiza el primordio gonadal (g), y el riñón (k) localizado en la región metanéfrica.

La gónada se desarrolla a partir de la superficie ventro-medial del mesonefros, e inicia su desarrollo como resultado del engrosamiento y de la proliferación del epitelio celómico⁽⁶⁰⁾.

En estadios muy tempranos el primordio gonadal es bipotencial, esto implica que tanto en el macho como en la hembra cada una de las células localizadas en esta estructura tiene la capacidad de desarrollarse hacia células de sostén (Sertoli o granulosa) o células esteroideogénicas (Leydig o teca)⁽⁶¹⁾.

En 1991, los estudios realizados por Burgoyne *et al*⁽⁶²⁾ sugirieron por primera vez que la célula de Sertoli es necesaria para la diferenciación testicular. En estos trabajos se analizó el genotipo de las células en todos los tejidos de ratones quiméricos XX/XY y se observó que había 50% de células XX y 50% de XY. Es importante señalar que en la gran mayoría de las quimeras XX/XY la gónada se diferenció hacia testículo y el genotipo de las células en todas las estirpes presentes con excepción de Sertoli, fueron 50% XX y 50% XY. Sin embargo, más del 90% de las células de Sertoli tenían un genotipo XY. Actualmente se sabe que la célula de Sertoli es el primer tipo celular en diferenciarse y que actúa como centro organizador de la gónada masculina^(63,64), también existe suficiente evidencia que implica a la célula de preSertoli como el primer sitio de expresión del gen SRY. El origen de esta estirpe celular aún se encuentra en debate, sin embargo se considera que migra a partir del epitelio celómico. La migración celular es un mecanismo específico del desarrollo gonadal⁽⁶⁰⁾ masculino, y el movimiento celular que dirige a la célula de Sertoli se origina en respuesta a las señales de genes que actúan como factores de transcripción y que se expresan en estadios tempranos en la gónada, uno de los genes implicados en la migración celular es el gen Wnt2, miembro de la familia de factores de transcripción Wnt⁽⁶⁵⁾. La célula de Sertoli ya diferenciada aparece por primera vez a los 11.5 d.p.c coincidiendo con la expresión del Sry. La expresión de este gen inicia una

serie de cambios en la histología gonadal, incrementándose la proliferación de las células precursoras de Sertoli, así mismo se movilizan otras estirpes celulares como las células peritubulares mioides y células endoteliales como por ejemplo PECAM [CD31] que se ha relacionada con densidad vascular y angiogénesis, que inician cambios importantes en la vasculatura de la gónada⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. Todos estos cambios ocasionan que las células de Sertoli una vez diferenciadas rodeen a las células germinales y formen los cordones testiculares, mientras esto ocurre las células peritubulares mioides rodean a las de Sertoli y forman una lámina basal donde reposarán los cordones testiculares. (Figura 2 y 3).

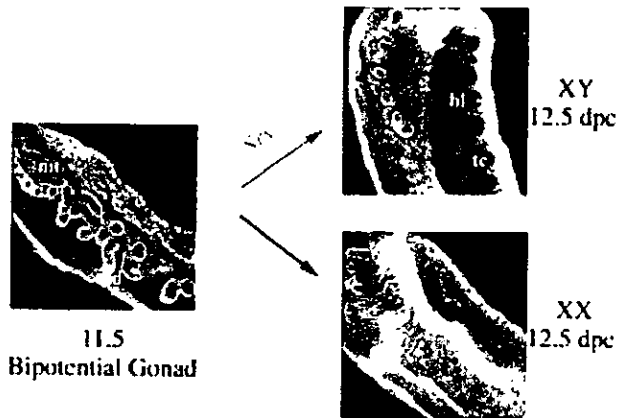


Figura 2: Imágenes confocal a los 11.5 y 12.5 d.p.c. Se observa que tanto en los embriones XX como en los XY. La gónada(g) es un primordio bipotencial localizado en la superficie ventromedial del mesonefros. Se observan los ductos mesonéfricos (md) así como los túbulos mesonéfricos (tm). La expresión del SRY en la gónada XY induce la proliferación del epitelio gonadal, la migración y población de células de Sertoli con la formación de cordones testiculares (tc) rodeados por una lámina basal (bl). Estos cambios no se observan en la gónada XX.

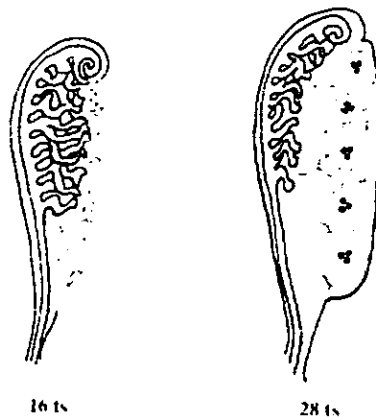


Figura 3: Esquema de los cambios inducido por la expresión del gen SRY en la gónada. Los precursores de las células peritubulares mioideas (azul claro) migran hacia la gónada y obligan a las células de soporte (verde) a rodear a las células germinales (negro) dentro de los cordones testiculares. El tejido vascular (azul oscuro) prolifera a partir del mesonefros únicamente en la gónada XY.

Esta organización morfológica relega a la célula de Leydig hacia el espacio intersticial y es esta arquitectura celular la que se encuentra en los testículos de los vertebrados^(66,67). Las células de Sertoli además de organizar la formación de los cordones testiculares, serán las encargadas de producir la hormona inhibidora de Mullerianos (HIM)⁽⁶⁹⁾, que ejercerá su acción principal en la etapa fenotípica de la diferenciación sexual masculina.

Otra de las estirpes celulares que se diferenciarán como resultado de una proliferación y migración del epitelio celómico, es la célula de Leydig. Los precursores de esta estirpe celular se desarrollan a partir de una población única de células esteroideogénicas⁽⁶⁸⁾, localizadas en la cresta urogenital a lo largo del mesonefros, las células ya diferenciadas se localizan en el espacio intersticial de la gónada alrededor del día 11.5 d.p.c.⁽⁷⁰⁾, el producto hormonal de esta estirpe celular es la testosterona (T)⁽⁷¹⁾.

Las células germinales (CG), migran a la cresta gónadal a través del mesenterio intestinal y el mesonefros, llegando en el día 9.5 - 11d.p.c. a colonizar la gónada^(72,73).

La participación de estas células en la etapa temprana de la diferenciación gonadal es diferente en los machos y en las hembras.

En los machos no se ha demostrado ninguna participación de las CG en la organogénesis testicular, ya que en ratones mutantes que carecen de

estas células, la formación y estructura celular de las gónadas es normal aunque existe un discreto retardo en la formación de los cordones testiculares⁽⁷⁴⁾. Por el contrario en las gónadas de productos 46,XX las CG son necesarias en la organización y mantenimiento de los folículos. Las CG se comportan de la misma forma en los machos que en las hembras hasta el día 12.5 d.p.c.⁽⁶⁰⁾, en este momento la célula germinal XY es secuestrada dentro de los cordones testiculares, continua dividiéndose en forma mitótica hasta poco antes del nacimiento y reinicia la mitosis en la vida posnatal⁽⁷⁴⁾.

Estudios realizados por Mc Laren en 1997 demostraron que en algunos casos anormales donde las células germinales se encuentran localizadas fuera de los cordones testiculares (*i.e.* en la región ovárica del ovotestis o en cultivos donde la célula migra hacia la glándula suprarrenal) se observa que independientemente que posean genotipo XX o XY, las células entran en meiosis casi al mismo tiempo en que lo hace las CG XX en condiciones normales⁽⁷⁵⁾. Esto sugiere que la progresión hacia la meiosis es una propiedad autónoma de las CG XX, que opera de manera regulada por el tiempo. Los genes que participan en la interacción entre las células somáticas y germinales aún no se encuentran del todo caracterizados; sin embargo se han relacionado principalmente a Bmp8 (bone morphogenic protein 8B) gen relacionado con el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis⁽⁷⁶⁾ y Dhh (Desert hedgehog) gen

asociado con la regulación del desarrollo de la línea germinal⁽⁷⁷⁾, en ratones XY mutación de estos genes generan pérdida de la línea germinal e infertilidad.

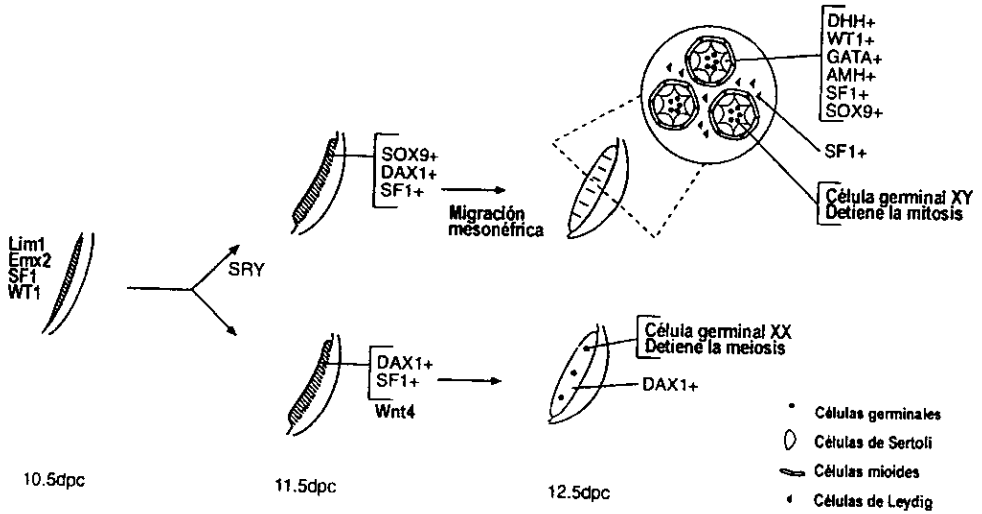


Figura 4: Genes implicados, cambios moleculares y morfológicos ocurridos en la gónada durante la diferenciación.

Etapa Fenotípica

El desarrollo del fenotipo masculino es resultado del efecto ejercido por tres hormonas fetales sintetizadas y secretadas por las células ya diferenciadas del testículo, en el humano entre la sexta y la octava semana de gestación, se produce la involución de los conductos Mülllerianos. La regresión de estas estructuras está mediada por la hormona glicoproteica HIM⁽⁶⁹⁾, la secreción de esta hormona se inicia entre la sexta y octava semana de gestación y concluye en la décimo primera. La acción de esta hormona se realiza a través de un receptor transmembranal, localizado en las células mesenquimatosas adyacentes a los conductos Mülllerianos⁽⁷⁸⁾.

La segunda hormona que participa en esta etapa es la T⁽⁷¹⁾ cuya secreción se inicia en la novena semana de gestación, alcanza su máximo valor alrededor de la semana 15 para después descender y mantenerse hasta la pubertad, esta hormona tendrá la función de regular el eje hipotálamo hipófisis gónada, para mantener adecuadas concentraciones hormonales y de esta forma continuar con el crecimiento y función testicular⁽⁷⁹⁾, así como ejercer el efecto virilizante sobre los conductos Wolffianos que se diferencian a epidídimo, vas deferens, vesículas seminales y conducto eyaculador, durante este periodo las concentraciones de testosterona encontradas en el feto son semejantes a las encontradas durante la vida adulta. La T es el precursor o prohormona de la tercera hormona fetal

virilizante, la dihidrotestosterona (DHT)⁽⁸⁰⁾. Este andrógeno se forma en la célula blanco por la acción de la enzima 5 α -reductasa-2 sobre la T, y es considerado el mediador intracelular de la gran mayoría de las acciones de los andrógenos. La DHT es responsable de la diferenciación de los genitales externos masculinos y del desarrollo de la próstata. La síntesis de T está regulada en un inicio por la gonadotropina coriónica (hCG) placentaria; sin embargo, a partir de la semana 11-12 de gestación, el eje hipotálamo-hipófisis-testículo inicia su actividad y entonces la hormona luteinizante (LH) se encarga de estimular la síntesis de T⁽⁸¹⁾. Por el contrario en ausencia de síntesis y secreción de estas hormonas por el tejido ovárico diferenciado se iniciara el desarrollo de las estructuras mullerianas que dan como resultado la formación de útero trompas y el tercio superiores de la vagina.

Hermafroditismo Verdadero (HV)

Las alteraciones en cualquier fase del desarrollo sexual conducen a diversos estados conocidos como anomalías de la diferenciación sexual. Estas alteraciones se clasifican de acuerdo con la etapa en la que se originaron: errores del sexo cromosómico, errores del sexo gonadal y errores en el sexo fenotípico. Una de las anomalías de la diferenciación sexual son los síndromes de reversión sexual que se definen como la discordancia entre el sexo cromosómico y el sexo gonadal-fenotípico.

El hermafroditismo verdadero es una forma de reversión sexual y aunque la prevalencia de esta enfermedad se desconoce se han reportado mas de cuatrocientos casos en la literatura. Esta patología se caracteriza por el desarrollo de tejido testicular y ovárico en un mismo sujeto⁽⁸³⁾. Ambos tipos de tejido pueden coexistir en una sola gónada denominada ovotestis o bien encontrarse en gónadas separadas. El hermafroditismo verdadero se clasifica en alternante (testículo de un lado y ovario del otro) esta forma se encuentra en el 20% de los casos, unilateral (ovotestis de un lado y testículo u ovario del otro lado) y bilateral (ovotestis en ambos lados) en el 30%. La localización de las gónadas es variable ya que pueden situarse intrapélvicas, inguinales o labioescrotales, dependiendo de la cantidad de tejido testicular presente⁽⁸³⁾ el ovario siempre se encuentra localizado de forma normal. Las manifestaciones clínicas generalmente son ambigüedad genital de diversos grados hasta un fenotipo masculino o femenino normal; los pacientes con ambigüedad genital en su mayoría son asignados y criados como masculinos, y pueden presentar clitoromegalia con hipospadias y pliegues labiescrotales que pueden estar o no fusionados; en muy raras ocasiones se llega a encontrar uretra peneana. La mitad de estos pacientes presentan hernias inguinales que contienen una de las gónadas o el útero. El desarrollo de estructuras müllerianas y wölfianas es variable y dependerá de la cantidad de tejido testicular

funcional, aunque en la mayor parte de los casos el útero está presente. La gónada que se observa con mayor frecuencia es el ovotestis y puede encontrarse en forma terminal (tejido ovárico y testicular bien delimitados) o imbricado. En la mayoría de los casos la porción ovárica del ovotestis es endocrinamente funcional y en el 50% de los casos durante la vida adulta puede presentarse incluso ovulación. En la región testicular o en el testículo la función endocrina se encuentra alterada los túbulos seminíferos presentan fibrosis intersticial por lo que es raro que exista espermatogénesis^(82,83).

El hermafroditismo verdadero es una anomalía genética heterogénea: 60% de los casos presentan cariotipo 46,XX, mientras que el resto son quimeras 46,XY/46,XX, mosaicos con cromosoma Y normal o anormal o son 46,XY⁽⁸⁴⁾. En los hermafroditas verdaderos con cromosoma Y, el desarrollo testicular parcial puede explicarse por la presencia del gen SRY. Mediante estudios de biología molecular se ha podido determinar que 10% de los hermafroditas verdaderos con cariotipo 46,XX presentan el gen SRY en su genoma. Sin embargo en la mayoría de los casos no se logra detectar secuencias del cromosoma Y, por lo que el desarrollo testicular en estos sujetos permanece sin explicación⁽⁸⁵⁾. Se ha sugerido un mecanismo de ganancia de función en mutaciones de genes autosómicos o ligados al X que participan en la diferenciación gonadal^(100,101), son las responsables del padecimiento, por otra parte se

han descrito dos casos de hermafroditismo verdadero 46,XX que presentan secuencias del cromosoma Y confinadas a las gónadas o incluso a la porción ovárica del ovotestis^(86,87). Sin embargo no existen estudios en que hayan establecido la distribución del material genético derivado del Y en las diferentes estirpes celulares de las gónadas.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de la presencia de secuencias del cromosoma Y en el tejido gonadal de hermafroditas verdaderos, así como la identificación de secuencias del gen SRY en las gónadas de pacientes con HV, permitirá reconocer un modelo alternativo para la formación de ovotestis en estos pacientes. El hermafroditismo verdadero ofrece un modelo biológico excelente para estudiar estos aspectos y contribuir a un mejor entendimiento del proceso de gonadogénesis así como ampliar el conocimiento actual de esta patología de la diferenciación sexual.

OBJETIVOS

- ✓ Identificar la presencia del gen SRY en las porciones testicular y ovárica de individuos con HV.

- ✓ Identificar la presencia de secuencias específicas del cromosoma Y en las porciones testicular y ovárica de individuos con hermafroditismo verdadero.

- ✓ Secuenciar el marco abierto de lectura de SRY en los casos positivos.

SUJETOS Y MÉTODOS

Sujetos

Se estudiaron 4 pacientes con diagnóstico histológico de hermafroditismo verdadero. Los datos clínicos de los sujetos analizados se muestran en la tabla 1.

Todos los pacientes fueron evaluados antes de los 7 años de edad, en todos lo pacientes se observó ambigüedad genital de grado variable: clitoromegalia, labios mayores escrotalizados, seno urogenital en la paciente 2, cuerda tendinosa en la paciente 4. El estudio citogenético se realizó mediante la técnica de bandas GTG analizando 100 metafases en cada uno de los casos. Todos los pacientes mostraron un complemento cromosómico 46,XX. No se realizó estudio citogenético en las gónadas de los pacientes. El análisis histológico de las gónadas demostró ovotestis bilateral en la paciente 1, en los pacientes 2 y 3 se encontró ovotestis izquierdo con ovario derecho mientras en la paciente 4 se identificó ovotestis derecho con ovario izquierdo, en la paciente 1 se retiró la porción testicular, mientras que en el resto de los casos se conservó la gónada contralateral que fue tejido ovárico morfológicamente normal.

PACIENTE	EDAD/SEXO	MANIFESTACIONES CLÍNICAS	GÓNADA	CARIOTIPO
1	1/ F	Ambigüedad genital: falo 1.8 cm	Ovotestis bilateral	46,XX
2	1/ F	Ambigüedad genital: falo 2 cm seno urogenital, escroto bífido gónada palpable en canal inguinal	Ovotestis izquierdo Ovario derecho	46,XX
3	1/ F	Ambigüedad genital: falo 2 cm labios mayores escrotalizados labios menores fusionados	Ovotestis izquierdo Ovario derecho	46,XX
4	7/ F	Ambigüedad genital: falo 3 cm glande, cuerda tendinosa labios mayores escrotalizados	Ovotestis derecho Ovario izquierdo	46,XX

Tabla 1: Manifestaciones clínicas, hallazgos histológicos y cariotipo de los pacientes incluidos en el estudio.

Extracción de DNA de tejido gonadal fijado en parafina

La extracción de DNA a partir de tejido embebido en parafina se realizó de acuerdo al método descrito por Banerjee⁽⁸⁸⁾. Se transfirieron cortes de aproximadamente 5µm de grosor del tejido gonadal fijado en

parafina a tubos con 200 μ l del buffer de digestión (TrisHCl 50mM pH 8, EDTA1mM.Tween 20 05%) se homogeneizaron durante 5 minutos y fueron sometidos a irradiación con microondas (500W/15 segundos/3-4 veces). Se centrifugaron a temperatura ambiente a una velocidad de 22,000g, se extrajo la parafina y el tejido fue tratado con buffer de digestión (proteinasas K 200 μ g/ml) (Boheringer Mannheim, Indianapolis, IN). Las muestras se incubaron por 12 horas a 42°C y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 5 minutos a 5,500g; para eliminar el efecto residual de la proteinasas K, el sobrenadante se incubó a 97°C. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

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

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

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

Extracción de DNA genómico

El DNA genómico de los pacientes estudiados, se obtuvo siguiendo la técnica descrita previamente por Buffone y Kempter^(89,90) con algunas modificaciones⁽⁹¹⁾.

Se extrajeron 3ml de sangre periférica de cada sujeto, colocándose en tubos Vacutainer que contenían 0.05ml de Na₂EDTA como anticoagulante. Con el fin de lisar a los eritrocitos, la sangre se colocó en un tubo cónico y se mezcló con un volumen igual de buffer de lisis TTS (trisHCl/ triton X-100/ sacarosa). La mezcla se homogeneizó y se transfirió a tubos de microcentrifuga 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 1ml de TTS, centrifugándose con las mismas condiciones. Este último paso se repitió hasta obtener un botón libre de eritrocitos. El paquete de leucocitos se resuspendió en 570µl de NaCl 50mM, se agregaron 50µl 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 200µl de NaCl 5M, 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, se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto (-20°C) para precipitar el DNA. 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 y se reuspendió en un volumen entre 200 y 400 μ l de agua estéril destilada y deionizada. Las alicuotas de DNA se almacenaron a -20°C hasta su uso.

La calidad, concentración y pureza del DNA se determinó de la forma antes mencionada.

Extracción de DNA de células epiteliales de la mucosa oral

El DNA de células epiteliales de la mucosa oral de la paciente 1 se obtuvo siguiendo la técnica descrita previamente por Rudbeck y Dissing⁽⁹²⁾. Las células epiteliales se obtuvieron realizando un raspado de la mucosa del carrillo oral, utilizando un hisopo. Se dejó secar a temperatura ambiente, una vez seco se cortó parte del algodón, se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se agregaron 20 μ l de 0.2M de NaOH y se incubó durante 6-10 minutos a 75°C . La reacción se detuvo añadiendo 180 μ l de una solución de 0.04M (40mM) Tris-HCl pH 7.5. Se retiró el algodón restante y la solución se utilizó como templado para la reacción de PCR. Aproximadamente 5 μ l del extracto se utilizaron para una reacción de 50 μ l. La calidad, concentración y pureza del DNA se determinó de la forma ya mencionada.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Por medio de la técnica de PCR se amplificó el marco abierto de lectura del gen SRY (615pb). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes: SRY 6F (5' GTG GTC TCG CGA TCA CA 3') XES11R (3' GTA GCC ATT GTT ACC CGA TTG TC5') que amplificó un producto de 432pb (del nucleótido 207 al nucleótido 638 con respecto al codón de inicio) AP1F (5'GAATAT TCC CGC TCT CGG 3') AP2R (5'ACA ACC TGT TGT CCA GTT3') amplificó un producto de 421pb que abarcó la caja HMG (de la posición 60 al nucleótido 490) XES7F (5'TGA CAA TGC AAT CAT ATG CTT CTG C 3') SRY8R (5'CTT CGG ACG AGG TCG ATA 3') amplificó un fragmento de 380 pb (del nucleótido -140 al 240) XES10F (5'GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG C 3') SRY3R (5'TAG AGC CAT CTT GCG CCT 3') que generó un fragmento de 529pb (del nucleótido -127 al 402) XES10F (5'GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG C 3') SRY8R(5'CTT CGG ACG AGG TCG ATA 3') que amplificó un fragmento de 380 pb.

La representación gráfica y el nombre utilizado de los iniciadores además de la dirección y la posición de estos oligonucleótidos con respecto al ORF del gen se muestran en la figura 5.

Las secuencias y el nombre de los pares de iniciadores utilizados para amplificar otras secuencias específicas del cromosoma Y como región pseudoautosómica, cetrómero y heterocromatina del brazo largo se muestran en la tabla 2.

Nombre	Secuencia	Tiempo y temperatura de alineamiento	Producto amplificado
PABY Región pseudautosómica	PABY-1: 5' - TGG GCA CTT ACA CAT AGA CGT - 3'	T _m = 62 ° C	250 pb
	PABY-2: 5' -CTT CTC TTT GAA GTG TAA GGA G - 3'	T _m = 58 ° C	
Centrómero de Y	Y1 : 5' - ATG ATA GAA ACG GAA ATA TG - 3'	T _m = 52 ° C	170 pb
	Y2 : 5' - AGT AGA ATG CAA AGG GTC CC - 3'	T _m = 60 ° C	
Heterocromatina de brazo largo del Y	Y 1.1: 5' TCC ACT TTA TTC CAG GCT TGT CC-3'	T _m = 63 ° C	154 pb
	Y 1.2: 5' TTG AAT GGA ATG GGA ACGAAT GG-3'	T _m = 61 ° C	
Centrómero de X	X1: 5' -AAT CAT CAA ATG GAG ATT TG-3'	T _m = 52 °C	130 pb
	X2: 5' - GTT CAG CTC TGT CAG TGA AA-3'	T _m = 58°C	

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

Los oligonucleotidos fueron adquiridos de una casa comercial (GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES) y llevados a una concentración final de 100µM.

En todos los casos se preparó una reacción estándar de 25µl de acuerdo a las condiciones descritas por Sambrook *et al*⁽¹⁰³⁾. Esta contenía una

concentración de DNA entre 0.5 y 1µg, solución amortiguadora de amplificación 10X (Tris-HCl, KCl, Mg₂Cl) a una concentración final 1x, mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) a una concentración final de 80µM, oligonucleótidos iniciadores a concentraciones finales específicas, 0.5UI de *Taq* polimerasa (Perkin-Elmer Corp, Branchburg New Jersey, USA) y agua destilada deionizada. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador (Gene Amp PCR System 9700 de Perkin Elmer). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo a 94°C (5 minutos), 35 ciclos a 94°C (1 minuto), 68°C (1 minuto) y 72°C (2 minutos) y un ciclo final a 72°C (10 minutos). Los productos amplificados de cada reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio al 0.0002%. En todos los casos se incluyó un marcador de peso molecular, un control positivo, y un control negativo que consistió en una reacción sin DNA.

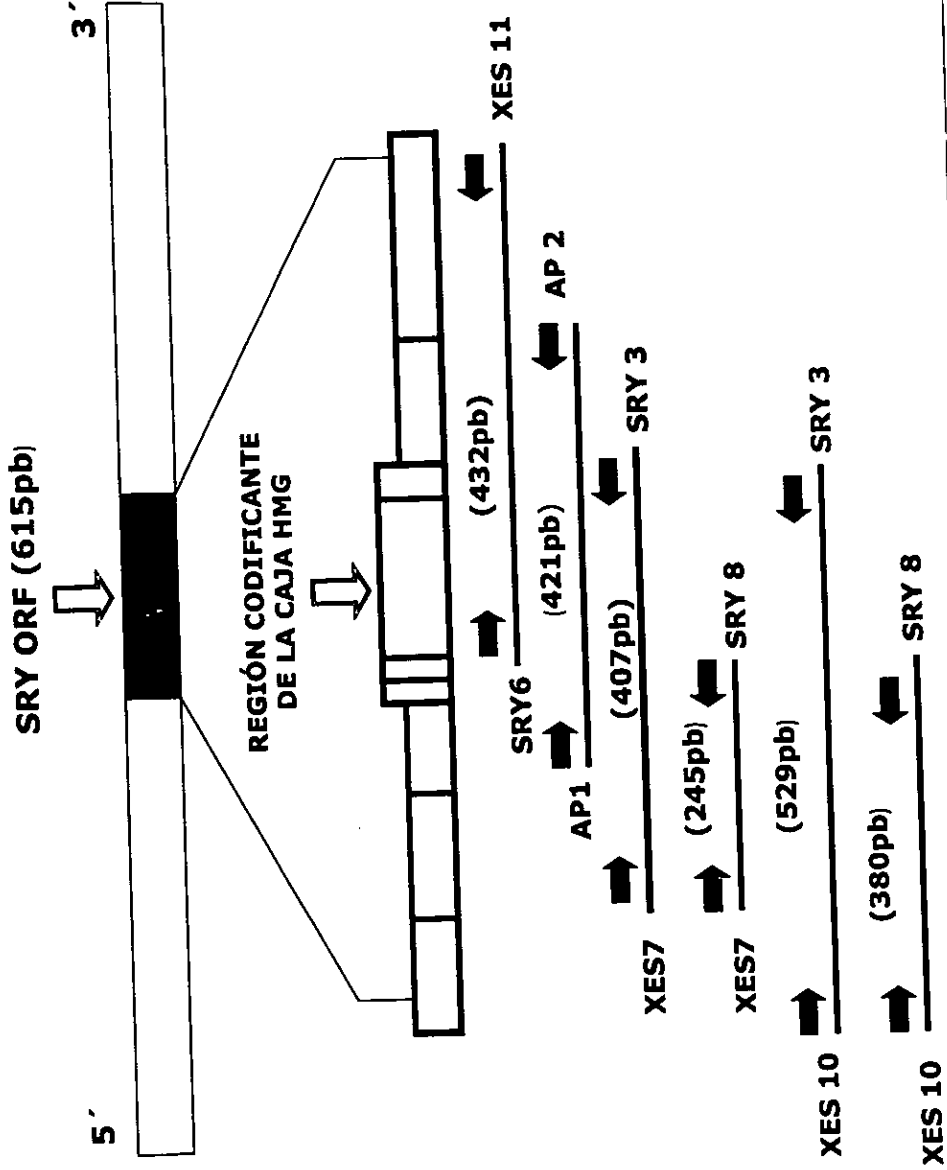


Figura 5: Representación esquemática del gen SRY indicando nombre, dirección y la posición relativa de los iniciadores utilizados en el estudio.

Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR a partir del gel de agarosa se realizó utilizando el *Kit QIAEX gel Extraction* (Qiagen, Chatsworth, CA USA). Se cortó la banda del gel con el producto amplificado se colocó en tubo de microcentrifuga de 1.5ml, se pesó y agregó buffer QX1 pH 7.5 y 4 μ l de la resina QX2, se agitó la mezcla, se colocó a 55°C durante 3 minutos (en dos ocasiones consecutivas, agitando entre una y otra incubación). Una vez disuelta la agarosa esta se eliminó mediante centrifugación durante 1 minuto a 9,221g, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 500 μ l de buffer QX 1, se agitó vigorosamente y se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas, una vez que se decantó el sobrenadante el exceso de buffer se retiró con una pipeta hasta dejar únicamente el botón que contenía el DNA, el cual se fue resuspendido en 500 μ l de buffer PE (que contiene principalmente alcohol). Se centrifugó nuevamente y se lavó con buffer PE; una vez que se decantó, se colocó a 55°C durante 10 minutos hasta que se seco la muestra la cual se resuspendió en un volumen de 20 μ l con agua destilada y deionizada, se incubó durante toda la noche a 4°C, para centrifugarse en las mismas condiciones, el sobrenadante fue recuperado y se utilizó como templado.

Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR obtenidos a partir del DNA genómico y de las gónadas embebidas en parafina que se estudiaron se realizó con un estuche de secuencia de DNA [ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Corp, Branchburg New Jersey, USA)]. El procedimiento seguido se basó en el método descrito por Sanger *et al*⁽⁹³⁾ con algunas modificaciones.

RESULTADOS

Los 4 pacientes con diagnóstico de hermafroditismo verdadero y cariotipo 46,XX fueron estudiados antes de los 7 años de edad, el motivo de la consulta fue ambigüedad genital en todos los casos. En la paciente 1 se encontró ovotestis bilateral mientras que los pacientes 2-4 presentaron ovotestis con ovario contralateral normal. Tabla 1.

Se obtuvo DNA de los 4 pacientes estudiados a partir de leucocitos de sangre periférica y de tejido gonadal embebido en parafina. Del paciente 1 se extrajo DNA de la porción testicular del ovotestis de los pacientes 2-4 el DNA obtenido fue de homogenado de ovotestis además se extrajo DNA de la mucosa oral del caso 1. Como controles positivos se analizó el DNA de leucocitos de sangre periférica de sujetos sanos así como testículo normal embebido en parafina.

Con la finalidad de conocer la concentración y la pureza del DNA extraído, a todas las muestras analizadas de DNA se les realizó espectrofotometría. En todos los casos la relación 260/280nm obtenida estaba dentro de los límites esperados de 1.8-2.0. El análisis de las muestras por medio de electroforesis en gel de agarosa mostró un DNA íntegro, de alto peso molecular y sin evidencia de degradación.

Se amplificaron diferentes regiones del gen SRY (Figura 5). Los resultados de la amplificación por PCR del ORF en DNA de leucocitos de

sangre periférica, así como de DNA de tejido gonadal embebido en parafina se muestran en la tabla 3.

PACIENTE	SRY	
	SANGRE PERIFÉRICA	OVOTESTES
1	Negativo	Positivo*
2	Negativo	Positivo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo

Tabla 3: Amplificación del gen SRY en DNA de linfocitos de sangre periférica y DNA de ovotestis embebido parafina.

*Porción testicular del ovotestis

Amplificación del gen SRY en sangre periférica

La amplificación del gen SRY en leucocitos de sangre periférica no identificó ninguna de las diferentes regiones analizadas del gen en los 4 pacientes estudiados (Figura 6). Estos hallazgos descartan la presencia de SRY en el DNA genómico de los pacientes.

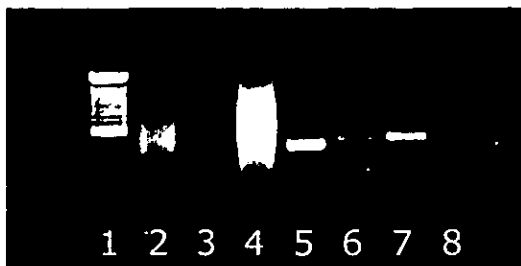


Figura 6: PCR del ORF del gen SRY en DNA de leucocitos de sangre periférica de la paciente 2: carril 1 marcador de peso molecular (escalera de 100pb), **carril 2** producto de 380 pb utilizando XES10 y SRY8 como iniciadores **carril3** producto de 421 pb utilizando AP1 y AP2, **carril 4** producto de 432 pb utilizando SRY6 y XES11. **Carril 5-7** DNA de leucocitos de sangre periférica de un sujeto masculino control utilizando los mismos iniciadores del carril 2-3. **carril 8** control negativo en ausencia de DNA.

Amplificación del gen SRY en tejido gonadal embebido en parafina

El análisis por PCR realizado en el DNA obtenido de la porción testicular del ovotestis de la paciente 1, mostró amplificación de dos fragmentos sobrepuestos de 432 y 421pb correspondientes a la caja HMG y a la región 3' del ORF de SRY. Con la finalidad de amplificar hacia la región 5' de la caja se utilizaron diferentes combinaciones de iniciadores, sin embargo no fue posible amplificar las secuencias localizadas en esta región (Figura 7 a-d). La figura 8 muestra de manera esquemática los iniciadores utilizados, el asterisco señala la región del gen que no fue posible amplificar, mientras que el control positivo amplificó todos los fragmentos esperados. El estudio en la mucosa oral de este paciente fue negativo para este gen.

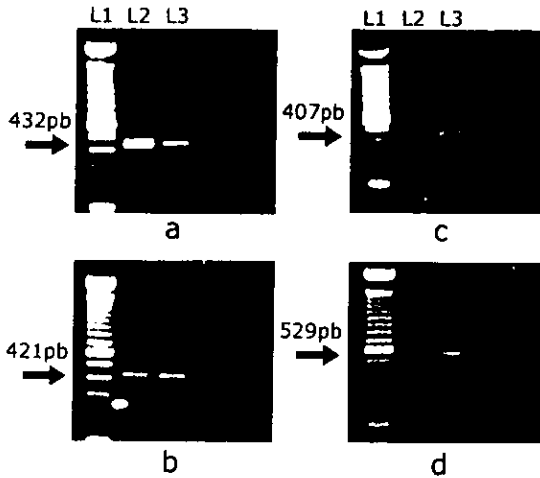


Figura 7: Análisis por PCR del gen SRY de la paciente 1: a-d Carril 1 marcador de peso molecular (escala de 100pb) carril 2 DNA de la porción testicular del ovotestis. carril 3 DNA de tejido testicular normal (a) amplificación de 432pb (región 3' del ORF y una parte de la caja HMG), (b) amplificación de 421pb (corresponde al total de la caja HMG) (c y d) fragmento 407 y 529pb (región 5' del gen SRY)

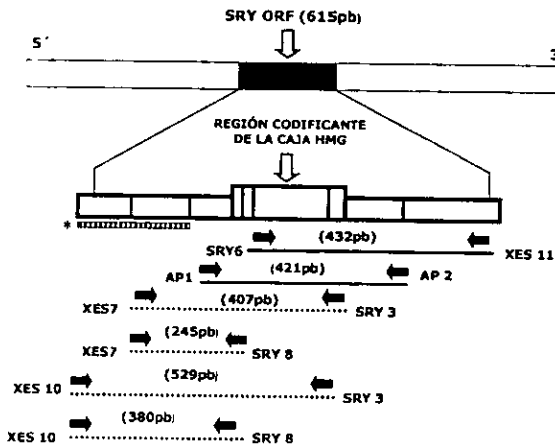


Figura 8: Representación esquemática del gen SRY en el paciente 1 indicando el nombre la dirección y la posición relativa de los iniciadores utilizados en el estudio.

Las líneas negras indican los fragmentos amplificados, mientras que las líneas punteadas corresponden a la región del gen que no pudo ser amplificada.

En la paciente 2 el estudio molecular de ovotestis utilizando los iniciadores XES10-SRY8 y SRY6-XES11 (Figura 9 a-b), lograron amplificar dos fragmentos yuxtapuestos que abarcaron en su totalidad al marco abierto de lectura del gen SRY (Figura 10). Los fragmentos obtenidos coincidieron con el tamaño esperado al compararlos con los marcadores de peso molecular y con los controles positivos.

Los resultados obtenidos en los pacientes 1 y 2 muestran la presencia del gen SRY confinado a la porción testicular del ovotestis y al ovotestis respectivamente.

El análisis de este gen, en el ovotestis de los pacientes 3 y 4 no mostró amplificación, lo que descarta la presencia de SRY en las gónadas (Figura 11).

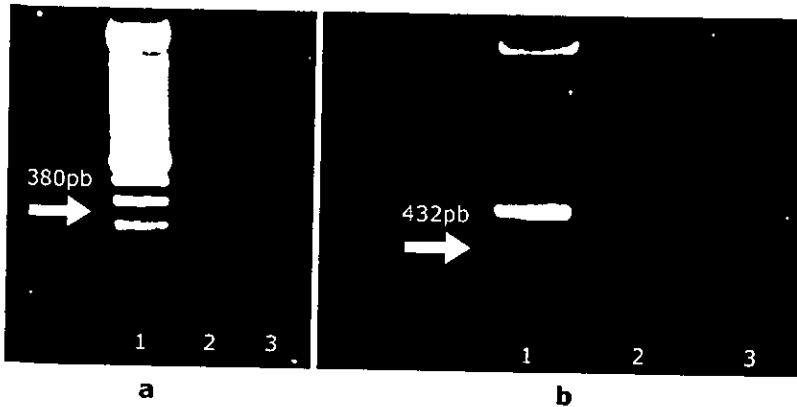


Figura 9: PCR del gen SRY en DNA de ovotestis de la paciente 2, carril 1 marcador de peso molecular (escala de 100pb) **carril 2** DNA de ovotestis, **carril 3** DNA de testículo control, **(a)** amplificación de 380pb (XES10 y SRY8) que corresponde de la región 5' y una parte de la región que codifica la caja HMG. **(b)** amplificación de 432pb (SRY6 y XES11.) que corresponde a una parte de la región que codifica la caja HMG hacia la región 3'.

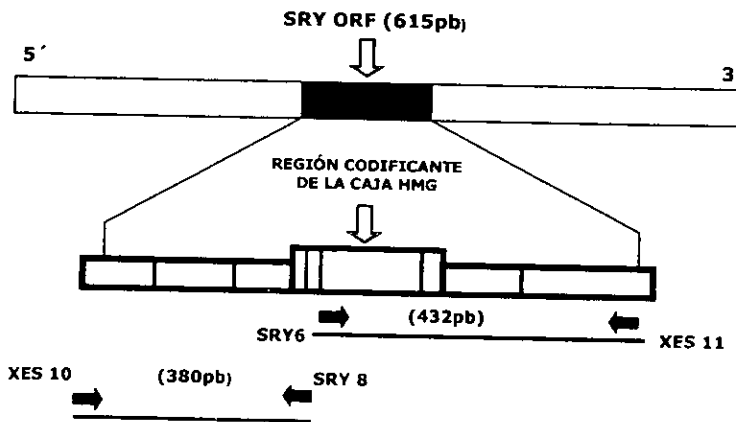


Figura 10: Representación esquemática del gen SRY del paciente 2 indicando el nombre, la dirección y la posición relativa de los iniciadores utilizados. Las líneas negras indican los fragmentos amplificados.



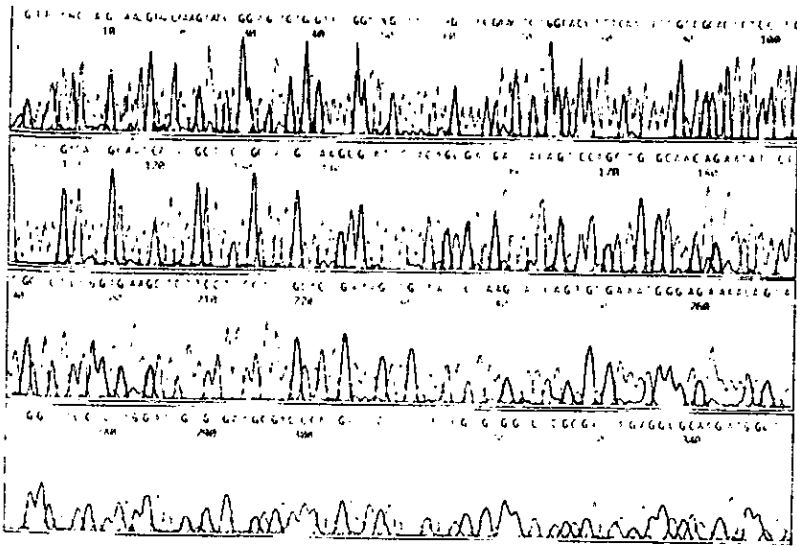
Figura 11: : PCR del ORF del gen SRY en DNA de ovotestis de la paciente 3, carril 1 marcador de peso molecular (escalera de 100pb), **carril 2** producto de 380 pb utilizando XES10 y SRY8 como iniciadores **carril 3** producto de 421 pb utilizando AP1 y AP2, **carril 4** producto de 432 pb utilizando SRY6 y XES11. **Carril 5-7** DNA de testículo normal, **carril 8** control negativo en ausencia de DNA.

Amplificación de otras secuencias específicas del cromosoma Y.

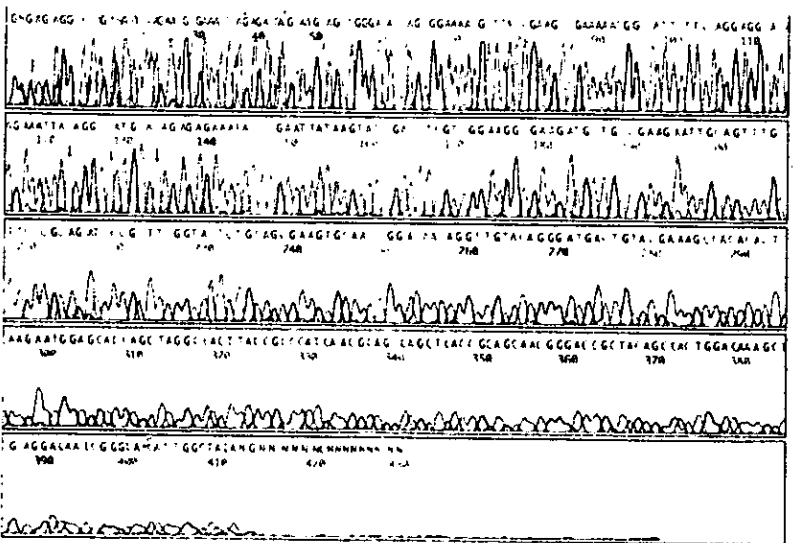
Para descartar la presencia de un mosaico con Y íntegro se amplificaron tres regiones de este cromosoma: PABY, centrómero y Yqh. En los pacientes 1 y 2 no se logró amplificar ninguna de estas tres regiones en sangre periférica, ni en las gónadas estudiadas.

Secuenciación del gen SRY.

La purificación de los fragmentos amplificados de la paciente 2 fue adecuada y se obtuvo una concentración de DNA suficiente para utilizarse como templado en la reacción de secuencia. La secuenciación no mostró ningún cambio en la secuencia de SRY en este paciente. (Figura 12).



a



b

Figura 12: Secuenciación automatizada de los productos del gen SRY amplificadas por PCR. **(a)** utilizando SRY8 como iniciador. **(b)** utilizando SR6 como iniciador.

DISCUSIÓN

El HV constituye una de las anomalías de la diferenciación sexual más interesantes ya que en un mismo sujeto se desarrollan tanto tejido testicular como ovárico, estos pacientes ofrecen un excelente modelo para identificar alteraciones genéticas específicas que originan el desarrollo de ambos tipos de gónadas.

Este estudio analizó la presencia e integridad del gen SRY en 4 pacientes con hermafroditismo verdadero y cariotipo 46,XX en sangre periférica.

El hermafroditismo verdadero es considerado un síndrome de reversión sexual, es una condición clínica y genéticamente heterogénea donde en un mismo individuo coexiste tejido testicular y ovárico. El 60% de los pacientes tienen cariotipo 46,XX mientras que en el resto existe la presencia de líneas celulares con cromosoma Y^(82,83), lo que puede explicar la formación de testículo. Sin embargo en los pacientes HV 46,XX el mecanismo de formación gónadal aun no se conoce⁽⁸⁴⁾.

Las manifestaciones clínicas de nuestros pacientes concuerdan con lo descrito en la literatura, todos fueron evaluados durante la infancia y el motivo de consulta fue ambigüedad genital. En la literatura se reporta que la gónada que se encuentra con mayor frecuencia es el ovotestis, lo que concordó con los hallazgos histológicos en nuestras pacientes⁽⁷¹⁾.

Únicamente en 10% de los pacientes con HV y cariotipo 46,XX se ha descrito la presencia del gen SRY en sangre periférica^(84,85). El análisis

del gen SRY en el DNA de linfocitos de sangre periférica de los 4 pacientes estudiados no mostró amplificación de este gen. En la paciente 1 también se amplificó DNA del epitelio bucal donde SRY tampoco pudo ser identificado.

Estos hallazgos descartan la presencia de SRY en sangre periférica y en la mucosa oral de la paciente 1. En los HV donde no se han identificado secuencias del gen SRY se han propuesto diversos mecanismos etiopatogénicos, como son mutaciones que conllevan a ganancia de función en genes autosómicos o ligados al X implicados en los procesos de diferenciación testicular^(99,100). Un mecanismo alternativo para la formación del ovotestis en estos pacientes es el descrito por los grupos de Hadjiathanasiou⁽⁸⁶⁾ y el de Inoue⁽⁸⁷⁾, donde el análisis de SRY en gónadas de pacientes HV 46,XX revelaron mosaicos gonadales ocultos con la presencia de SRY, sin embargo solo estos dos casos han sido reportados en la literatura.

El análisis del gen SRY en DNA de las gónadas embebidas en parafina de los pacientes 1 y 2 mostró la presencia de secuencias de este gen confinadas a gónada: en la paciente 1 se encontró una delección del extremo 5' del ORF de SRY mientras que en la paciente 2 las secuencias analizadas de este gen se encontraron intactas.

Con base a estos hallazgos se puede sugerir que la presencia de material genético del Y en las gónadas de estos pacientes HV pudo ser

responsable de la diferenciación testicular. Debido a que en los estudios descritos anteriormente^(86,87) no se analizaron otras secuencias del cromosoma Y, nuestro grupo de trabajo consideró pertinente analizar diferentes regiones de este cromosoma. No se observó amplificación de PABY, cent Y y Yqh en DNA sangre periférica y en DNA el tejido gonadal, descartando la presencia de un cromosoma Y completo en las células gonadales de nuestros pacientes. Por último, la falta de amplificación de SRY en los pacientes 3 y 4 demuestra que estas secuencias no siempre se encuentran en las gónadas de pacientes HV.

Los hallazgos en la paciente 1 pueden explicarse por la ocurrencia de diferentes mecanismos consecutivos. Primero, durante la meiosis paterna existió una recombinación ilegítima entre el cromosoma X y el cromosoma Y en donde se perdió de forma parcial la región 5' del gen SRY, segundo lugar la paciente recibió el gen SRY deletado y translocado en el cromosoma X paterno y por último la presencia temprana de SRY en la gónada fue suficiente para diferenciar de forma parcial al testículo, produciéndose un mosaico transitorio con pérdida posterior de SRY en la mayoría de los tejidos. Por último, una probable explicación para la formación del tejido ovárico en la paciente pudo ser consecuencia del mecanismo de inactivación preferencial del X, en donde las líneas celulares que conservaron actividad parcial de SRY indujeron la formación de tejido testicular, mientras que la inactivación

de la delección con las de SRY explican la formación de tejido ovárico. La delección parcial encontrada en la paciente sugiere algunos puntos interesantes acerca de la función y regulación de este gen; el hecho que la región HMG⁽⁴⁵⁾ este conservada en los mamíferos sugiere que la sola presencia de esta región es suficiente para inducir desarrollo testicular, sin embargo la existencia de pacientes con disgenesia gonadal 46,XY y mutaciones fuera del dominio HMG^(41,101,102) muestran que regiones adyacentes también son necesarias para la función correcta de SRY.

Aunque los elementos de regulación de SRY aún no están bien caracterizados, existen estudios que sugieren que la región 5' puede ser responsable de su regulación⁽⁴¹⁾. En ratones transgénicos se ha demostrado que la expresión de SRY debe ser cuantitativa y sensible a dosis, ya que en ratones que presentan delecciones del cromosoma Y entre el centrómero y SRY, la expresión del gen es menor. Lo que correlaciona con la reversión sexual que presentan estos animales⁽⁴⁴⁾. La pérdida de esta región en la paciente pudo haber ocasionado alteraciones en la correcta expresión del gen con la consiguiente falla al inducir el desarrollo testicular. La descripción de un paciente con disgenesia gonadal 46,XY, reversión sexual y mutaciones en la región 3' del ORF⁽⁴¹⁾ sugiere que esta región también se encuentra implicada en la regulación del gen. Recientemente se describió en ratones que la presencia de repetidos CAG en la región 3' es necesaria para la correcta

diferenciación testicular⁽⁹⁸⁾. En el caso de nuestra paciente la presencia conservada de esta región podría sugerir una regulación parcial del gen SRY.

En el análisis de la secuencia de SRY confinado a tejido gonadal de la paciente 2, donde no se encontró ninguna alteración, su estructura, sugiere nuevamente que la existencia de un mosaico en la gónada pudiendo ser responsable de la formación del testículo y que la expresión temprana de SRY sería suficiente para inducir e iniciar la diferenciación testicular^(86,87). La presencia de SRY en otras líneas celulares no debe ser descartada, sin embargo aunque se conoce que SRY se expresa en otros tejidos, no se le ha implicado ninguna función, por lo que no pareciera relevante en el fenotipo⁽⁹⁵⁾.

Los estudios de Eicher y Washburn⁽⁹⁶⁾, sugieren una hipótesis para la formación del ovotestis, estos autores proponen que para el desarrollo de la gónada XY, existe una estrecha ventana de tiempo en donde debe ocurrir la diferenciación hacia testículo y de esta forma reprimir el desarrollo ovárico^(62,38,103). Esto implica que Sry debe expresarse y actuar antes que los genes promotores del desarrollo de la gónada femenina. Otra probable explicación a la formación del ovotestis en nuestras pacientes pudo haber sido consecuencia de una expresión tardía o débil de SRY en el tiempo, modificando el momento en que la gónada tiene que diferenciarse a testículo^(94,96,97). Estudios recientes

realizados en cultivos de órganos utilizando gónadas XY para inducir diferenciación masculina en las gónadas XX, sugieren que esta inducción solo puede ocurrir antes de que se de la expresión de Sry⁽⁶⁶⁾, apoyando la idea de que la vía testicular debe de iniciarse durante una ventana muy específica de tiempo durante el desarrollo⁽⁹⁵⁾. Actualmente SRY es considerado como un determinante morfogenético que además de una correcta expresión tiene que expresarse en las células indicadas. Esto inducirá modificaciones histológicas en la gónada en desarrollo, tales como: proliferación celular⁽⁶⁶⁾, movilización y reclutamiento de células mioides y endoteliales hacia la gónada^(67,68) además de incrementar la vasculatura gonadal. Por ello, la expresión fuera de tiempo o fuera del sitio indicado, puede ocasionar alteraciones en cualquiera de estos cambios ocurridos durante el desarrollo de la gónada.

Por su complejidad, la gonadogénesis continua siendo un tema de investigación y por las características histológicas y genéticas de los pacientes con HV, éste es considerado un modelo biológico interesante para responder algunas de las preguntas acerca de la etiopatogenia de esta enfermedad, así como del desarrollo del tejido gonadal.

El presente estudio mostró la existencia de secuencias del gen SRY en gónadas de pacientes con hermafroditismo verdadero y cariotipo 46,XX, indicando que existe un subgrupo de casos que carecen del gen SRY en leucocitos y otros tejidos, y que de forma interesante presentan

secuencias de este gen en las gónadas. Estos hallazgos sugieren un modelo alternativo que explica la formación de tejido testicular y que puede ser resultado de la presencia de un mosaico con de SRY, o de una expresión transitoria de este gen en un momento inadecuado, induciendo una diferenciación parcial de la gónada hacia testículo y perdiéndose posteriormente de algunos tejidos. Como ya se mencionó el sitio de expresión es crítico para su función, por lo que es interesante en un futuro cercano estudiar las diferentes estirpes celulares de las gónadas positivas para este gen en HV y compararlas con las gónadas de pacientes HV que presentan líneas con cromosoma Y. Estos aspectos contribuirán a ampliar el conocimiento de esta enfermedad así como aportar datos a los mecanismos de gonadogénesis normal.

REFERENCIAS

1. Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. 1982 Diferenciación sexual. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Inv Clin.* 34:349-359.
2. Muller U. The human Y chromosome. 1994. *Molecular Genetics of Sex Determination*. Stephen S Wachtel (Ed). Academic Press, 205-224.
3. Ford C, Jones K, Polani P . 1959. Sex chromosome anomaly in a case of gonadal sex dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet.* 213:711-714
4. Swain A, Lovell-Badge R. 1999. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes dev.* 13 (7): 720-755.
5. 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.
6. 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.
7. Kriedberg J, Sariola H, Loring J, Maeda M, Pelletier J. 1993. Wt-1 is required for early kidney development, *Cell.* 174: 679-691.
8. Reddy J, Licht J. 1996. The WT1 Wilms tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochem. Biophys. Acta.* 1287: 1-28.
9. Shwalot W, Behringer R. 1995. Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature.* 374:425-430.
10. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S. 1997: Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development.* 124: 1653-1664.

11. Molkenkin J, Lin O, Olsen E. 1997. Requirement of transcription factor GATA 4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes and Dev.* 11: 1061-1072.
12. Kathah-Fuki Y, Nakahara N, Higashinakawa T. 1998. Male to female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature.* 393: 688-692.
13. Raymond C, Shamu M. 1998. Evidence for evolutionary conservation of Sry-determining gene. *Nature.* 391: 691-695.
14. 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.
15. 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.
16. Kent J, Wheatley SC, Sinclair AH. 1996. A male specific role for SOX9 in vertebrates sex determination. *Development.* 122: 2813-22.
17. Da Silva SM, Hacker A, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14: 62-68.
18. Swain A, Narvaez P, Burgoyne G, Lovell-Badge R. 1998. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature.* 391:761-767.
19. Vaino S, Heikkila M, Zamboni L. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. *Nature.* 397: 405-409.

20. Parker K. 1998. The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 140: 59-63.
21. Hatano H, Takakus M, Morohashi K. 1994. Sex dependent expression of transcript factor Ad4B4, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* 120: 2787-2792.
22. Ikeda Y, Lala D, Luo X, Parker K. 1994. Development expression of mouse steroidogenic factor 1 as essential regulator if the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol.* 8: 654-662.
23. Ingraham H, Lala D, Ikeda Y, Parker K. 1994. The nuclear factor 1 acts at multiple level of the reproductive axis. *Genes and Dev.* 8: 2302-2312.
24. Luo X, Ikeda Y and Parker K. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 73: 481-490.
25. Sadovsky Y, Crawford P. 1995. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P 450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci* 92: 10939-10943.
26. Larsson S, Charkieu K, Hastie N. 1995. Subnuclear localization of Wt1 in splicing and transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell.* 81: 391-340.
27. Nachtigal M, Hirokawa D, Ingraham H. 1998. Wilms tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell.* 93:445-454.
28. Pelletier J, Scahling A, Housman D. 1991 Expression of the Wilms tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes and Dev.* 5: 1345-1356.

29. Barbaux S, Niaudet P, Mc Elreavey. 1997. Donor splice- site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat. Genet.* 17: 467-470.
30. Karl J, Capel B. 1998. Sertoli cells of the mouse testis originate from the celomic epithelium. *Dev. Biol.* 203:323-333.
31. Bel S, Core M, Van Lohuizen M. 1998. Genetic interactions and dosage effects of polycomb genes in mice. *Development.* 125: 3543-3551.
32. Dolle P, Brown M, Dubole D. 1991. Hox-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes and Dev.* 5: 1767-1776.
33. Molkentin J, Lin O, Olsen E. 1997. Requirement of transcription factor GATA 4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes and Dev.* 11: 1061-1072.
34. Welshons W, Russel L. 1959. The Y chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 45: 560-66.
35. Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson DS, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1992. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7953-59.
36. Lovell-Badge R, Robertson E. 1990. XY female mice resulting from a heritable mutation in the murine primary testis determining gene, *Tdy*. *Development* 109: 635-46.
37. Jeske Y, Greenfield A, Koopman P. 1995. Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat. Genet.* 10: 480-82.
38. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1995. Expression of Sry: The mouse sex determining gene. *Development.* 121:1603-14.
39. Clepet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell-Badge R, Goodfellow P. 1993. The human SRY transcript. *Hum. Mol. Genet.* 2: 2007- 12

40. Capel B. 1998. SEX IN THE 90s: SRY and the switch to male pathway. *Ann Rev. Physiol.* 60:497-523.
41. McElreavy K, Viliain E, Fencher P. 1996. Loss of sequences 3' to the testis-determining gene SRY, including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination and germ-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 8590-94.
42. Eicher E, Shown E. 1995. Sex reversal in C57BL/6J-Y^{POS} corrected by a SRY transgene. *Phylos Trans R.Soc. Ser. B.* 350: 263-69.
43. Lovell-Badge R. 1992. Sex determining gene expression during embryogenesis *Phylos Trans R.Soc. Ser. B.* 335: 159-64.
44. Lovell-Badge R, Robertson E. 1990. XY female mice resulting from a heritable mutation in the murine pathway testis determining gene, Tdy. *Deveolopment.* 109: 635-46.
45. Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Dmith M J, Frischauf A, Lovell Badge R, Goodfellow P. 1990. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 77: 240.44.
46. Cameron F, Sinclair A. 1997. Mutations in SRY and SOX9: testis determining genes. *Hum. Mutat.* 9:388-95.
47. Dubin R, Ostrer H. 1994. Sry is a transcriptional activator. *Mol Endocrinol.* 8: 1182-92.
48. Goodwin G, Sanders C, Johons E. 1973. A new group of chormatin-associated proteins with a high content of acidic and basic aminoacids. *Eur. J. Biochem.* 38: 14-19.

49. Ferrari S, Harley V, Pontiggia A, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1992. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.* 44:4497-506.
50. Pontiggia A, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1994. Sex reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J.* 6115-24.
51. Grosschedl R, Giese K. 1994. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoproteins structures. *Trends Genet.* 10: 94: 100.
52. Werner M, Huth JR, Groonenborn AM. 1995. Molecular basis of man 46,XY-sex reversal revealed from the three dimensional solution structure of the human SRY DNA complexes. *Cell* 81: 705-14.
53. Collingnon J, Sockanathen S. 1996. A comparison of the properties of Sox-3 with SRY and two related gene.,Sox1 and Sox-2. *Development* 122: 509-20.
54. Foster J, Domiguez-Steglich M, Weller P. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutation in a SRY. Related gene. *Nature* 372: 525-29.
55. Wagner T, Wirth J, Meyer J. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY. Related gene. SOX-9. *Cell* 79: 1111-20.
56. Da Silva S, Hacker A, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. 1996. Sox-9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation mammals and birds. *Nat. Genet* 14:62-68.
57. Graves J. 1999. Interactions between SRY and SOX genes in mammalian sex determination. *Bio Essays.* 20: 264-69

58. Bardoni B, Zanaria E, Guroli S. 1994. A dosage sensitive locus al chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet.* 7: 497- 501.
59. Muscatelli F, Meringer T. 1994 Mutations in the DAX1 gene give rise both X-linked adrenal hypoplasia congenital and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature.* 372: 672-76.
60. Schmahl J, Eicher E, Capel B. 2000 SRY induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development.* 127:65-73.
61. Karl J, Capel B. 1998. Sertoli cells of the mouse testis originate from the celomic epithelium. *Dev. Biol.* 203: 323-33.
62. Palmer S, Burgoyne P. 1991^a. In situ analysis of fetal prepuberal and adult XX↔XY chimeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly but not exclusively XY. *Development.* 112: 265-68.
63. Koopman P, Gubbay J, Goodfellow P, Lovell- Badge R. Expression of a candidate sex determining gene during mouse testis differentiation. *Nature.* 348: 450-52.
64. Hacker A, Capel B, Goofellow P, Lovell-Badge R. 1995. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development.* 121:1603-614.
65. Kozopas K, Samas C. 1998. Dwnt-2 a *Drosophila* Wnt gene required for the development of the male reproductive tract, specific sexually dimorphic cell fate. *Genes Dev.* 12: 115-65.
66. Tilman K, Capel B. 1999. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development.* 126:2883-2890.
67. Martineau J, Norquist K, Tilman C, Lovell-Badge R, Capel B. 1997. Male specific cell migration in to the developing gonad. *Curr. Biol.* 7: 958-68.

68. Mayerhofer A, Lahar G, Seid K. 1996. The neural cell adhesion molecule (NCAM) provides clues to the development of testicular Leydig cells. *J. Androl.* 17: 223-230.
69. Teixeira J, Donahoe P. 1996. Molecular biology of MIS and its receptor. *J. Androl.* 17: 336-341.
70. Merchant Larios H, Moreno Mendoza N. 1998. Mesonephric stromal cells differentiate in to Leydig cells in the mouse fetal testis. *Exp. Cell. Res.* 244: 230-38.
71. Grumbach M, Conte F. Disorders of sex differentiation. In: Wilson J, Foster D. eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 8^a. ed. Philadelphia. Saunders. 1992:853-951.
72. Ginsburg M, Snow M, Mc Laren A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development.* 100: 521-28.
73. Gomperts M. Wylie C. 1994. Primordial germ cell migration. *Ciba Found, Symp.* 182: 121-34.
74. Mc Laren A. 1995. Germ cells and germ cell sex. *Phil, Trans R. Soc. Lond.B* 322:3-9.
75. Mc Laren A, Southee D. 1997. Entry of mouse's embryonic germ cells in to meiosis. *Dev. Biol.* 87:107-113.
76. Zhao G, Dend K. 1996. The gene encoding bone morphogenic protein 8 B is regulated for the initiation and maintenance of spermatogenetic in the mouse. *Genes Dev.* 18:1657-69.
77. Bitgood M, Mc Mahon A. 1996. Sertoli Cell signaling by deserthedgehog regulates the male germ line. *Curr. Biol.* 6:298-304.

78. Barends W, Helmond M, Post M. 1994. A novel member of the transmembranal serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development*.120: 189:198.
79. Pérez-Palacios G, Pérez A. 1990. Integración endócrina de la unidad petoplacentaria y patología del testículo fetal. En: Malacara J y cols. Eds. 4ª. Ed. *Fundamentos de Endocrinología Clínica*. México. La presna Médica Mexicana. 455-470.
80. Imperato-Mcginley J, Gautier T.1994. Male pseudohermaphroditism due to primary 5 α -reductase deficiency in man. En: Martínez-Mora. Ed. *Intersexual States: disorders of sex differentiation*. Barcelona Doyma. 231-240.
81. Huhtaniemi I.1994. Fetal testis-a very special endocrine organ. *Eur J. Endocrinol*. 130:25-31.
82. Berkovitz GD, Rock JA, UrbanMD, Migeon CJ. 1982 True hermaphroditism. *Johns Hopkins Med J*. 151:290-297.
83. Van Niekerk WA, Retief AE. 1981 The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet*. 58:117-122.
84. Torres L, López M, Méndez JP, Canto P, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson RP, Kofman-Alfaro S. 1996 Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Med Genet*. 63:348-355.
85. McElreavey K, Rappaport R, Vilain E, Abbas N, Richaud F, Lortat-Jacob S, Berger R, Le Conait M, Boucekkine C, Kucheria K, Temtamy S, Nihoul-Féketé C, Brauner R, Fellous M. 1992 A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY. *Hum Genet*. 90:121-125.

86. Hadjiathanasiou CG, Brauner R, Lortat-Jacob S, Nivot S, Jaubert F, Fellous M, Nihoul-Féketé C, Rappaport R.1994. True hermaphroditism: Genetic variants and clinical management. *J Pediatr.* 125:738-744.
87. 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.
88. Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR.1995. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *BioTechniques.* 18:768-770, 772 -773.
89. Buffone G, Darlinton J .1985. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem:*31:164-65.
90. Kempter B, Grossbader. 1992. A quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG.* 8:226-30
91. Cuevas-Covarrubias s, Maya Nuñez G, Kofman-Alfaro S. 1998. Modified quick method for DNA extraction from leukocytes. *Comunicación personal.*
92. Rudbeck L, Dissing. 1998. Rapid, Simple Alkaline Extraction of Human Genomic DNA from Whole Blood, Buccal Epithelial Cells, Semen and Forensic Stains for PCR. *Bio Techniques.* 25:588-92
93. Sanger F, Nicklen S,Coulson A. 1997. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-67USA.
94. Clepet C, Schafer A, Sinclair A, Lovell-Badge. 1993. The human SRY transcript. *Hum Mol Genet.* 2:2007-12.
95. Schafer A. Goodfellow P. 1996: Sex determination in humans. *BioEssays.*18:955-63.

96. Eicher E. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. *Ann Rev. Genet.* 20:327-60
97. Palmer S, Burgoyne P. 1991b. The *Mus musculus demesticuls Tdy* allele acts later than the *Mus musculus musculus* allele: a basis for XY sex reversal in C57B1/6-Y^{pos}
98. Bowles J, Cooper L, Koopman O. 1999. Sry Requires a CAG repeat domain for male sex determination in *Mus musculus*. *Nat Genet.* 22:406-08.
99. Eicher E. 1988. Autosomal genes involved in mammalian primary sex determination. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B* 350:263-69
100. Slaney F, Chalmeras J, Affara N. 1988. An autosomal or X linked mutations results in true hermaphrodites and 46,XX males in the same family. *J Med Genet.* 63: 348-355.
101. McElreavey K, Vilain E, Abbas N. 1992b. XY sex reversal associated with deletion 5' to the SRY "HMG box" in the testis-determining region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 3368-72.
102. Capel B, Raspberry C, Lovell-Badge R. 1993. Deletion of Y chromosomal sequences located outside the testis determining region can influence *Sry* expression and cause XY female sex reversal. *Nat. Genet.* 5: 301:307.
103. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2^o Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. E5.