



**CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
GENÉTICA MÉDICA**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

“Detección de GBY en pacientes con desórdenes del desarrollo sexual y su riesgo de desarrollar neoplasias de células gonadales”

TESIS

Para obtener el diploma de
Especialista en Genética Médica

**TESISTA: DRA. ROSALBA SEVILLA MONTOYA
TUTOR: M en C ANA CLAUDIA VELAZQUEZ WONG**

Dirección del tutor: Unidad de Investigación de Genética Médica CMN SXXI
Dirección de la aspirante: UIM Genética Humana, CMN SXXI, IMSS.
Teléfono 56 27 69 41, 56 27 69 45,
Fax 55 88 51 74. Correo Electrónico: rosalbasevilla@hotmail.com



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.



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.

| | |
|--|---|
| 1. Datos del alumno (Autor) | 1. Datos del alumno |
| Apellido Paterno: Apellido materno: Nombre Teléfono Universidad Facultad o escuela Carrera: No. de cuenta UNAM: | Sevilla Montoya Rosalba 50.04.46.54 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Médico 507216249 |
| 2. Datos del asesor | 2. Datos del asesor |
| Apellido paterno: Apellido materno: Nombre (s): | Velazquez Wong Ana Claudia |
| 3. Datos de la tesis | 3. Datos de la Tesis |
| Titulo: No. de páginas Año: | DETECCIÓN DE GBY EN PACIENTES CON DESORDENES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL Y SU RIESGO DE DESARROLLAR NEOPLASIAS DE CÉLULAS GONADALES 41 2012 |

Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildósola.
Jefe de Enseñanza
Hospital de Pediatría de la UMAE
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dra. María Antonieta Araujo Solís
Profesor del curso de Genética Médica
Hospital de Pediatría de la UMAE
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dr. Fabio A. Salamanca Gómez
Profesor titular del curso de Genética
Médica Hospital de Pediatría de la
UMAE Centro Médico Nacional Siglo
XXI

Dra. Julia Rocío Herrera Marquez
Profesor del curso de Endocrinología
Pediátrica Hospital de Pediatría de la
UMAE Centro Médico Nacional Siglo
XXI

Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel
Profesor del curso de Genética Médica
Hospital de Pediatría de la UMAE
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dra. Rosalba Sevilla Montoya
Residente de tercer año de Genética
Médica Hospital de Pediatría de la
UMAE Centro Médico Nacional Siglo
XXI



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

Dictamen de Autorizado

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3603

FECHA 04/05/2010

Estimado Ana Claudia Velázquez Wong

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle que, el protocolo de investigación en salud presentado por usted, cuyo título es:

DETECCION DE GBY EN PACIENTES CON TRASTORNOS DE DIFERENCIACIÓN SEXUAL Y SU RIESGO DE DESARROLLAR NEOPLASIAS DE CÉLULAS GONADALES

fue sometido a consideración del Comité Local de Investigación en Salud, quien de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética médica y de investigación vigentes, por lo que el dictamen emitido fue de: **A U T O R I Z A D O**.

Habiéndose asignado el siguiente número de registro institucional

| |
|-----------------|
| No. de Registro |
| R-2010-3603-10 |

Atentamente

Dr(a). HERMILO DE LA CRUZ YÁÑEZ
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud Núm 3603

IMSS

SALUD PARA TODOS LOS MEXICANOS

INDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 20 |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 20 |
| JUSTIFICACIÓN | 20 |
| HIPÓTESIS | 20 |
| OBJETIVOS | 21 |
| DISEÑO DEL ESTUDIO | 21 |
| CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN | 22 |
| VARIABLES DEL ESTUDIO | 22 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 22 |
| RESULTADOS | 24 |
| DISCUSIÓN | 32 |
| CONCLUSIÓN | 35 |
| REFERENCIAS | 37 |
| ANEXOS | 40 |
| HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO | 41 |

**“DETECCIÓN DE GBY EN PACIENTES CON
DESORDENES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL
Y SU RIESGO DE DESARROLLAR NEOPLASIAS
DE CÉLULAS GONADALES”**

Autor: Sevilla Montoya Rosalba, Residente de Genética Médica, CMN SXXI,
IMSS

Tutor: M en C. Ana Claudia Velásquez Wong UIM Genética Humana, CMN
SXXI, IMSS

RESUMEN

Los desórdenes de la diferenciación sexual (DSD), son condiciones congénitas, en donde el desarrollo del sexo cromosómico, gonadal y anatómico, es atípico. Estos pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer originado en las células germinales. Sin embargo, no todos ellos presentan el mismo riesgo, por lo que es importante realizar la detección temprana de secuencias específicas del cromosoma Y, incluyendo GBY, que están relacionadas con la transformación maligna, para poder clasificarlos en riesgo alto, intermedio o bajo de acuerdo a sus características clínicas, citogenéticas y moleculares.

Se estudiaron pacientes con DSD referidos de la consulta de Genética Médica de enero de 2006 hasta julio de 2009. Se les realizó cariotipo en sangre periférica y se buscó intencionadamente la presencia de GBY por medio de la prueba de FISH, en caso de no encontrarse en el cariotipo un cromosoma Y. Se determinó la presencia de gónadas intrabdominales o escrotales por estudios de imagen. Los pacientes se clasificaron de acuerdo a su padecimiento y hallazgos clínicos y de laboratorio, sugiriendo así las maniobras que requiere cada uno de ellos para disminuir su riesgo de desarrollar neoplasias gonadales.

ABSTRACT:

Disorders of sex development (DSD), are a variety of anomalies defined by congenital conditions in which chromosomal, gonadal, or anatomical sex is atypical. Besides issues such as gender assignment, clinical and diagnostic evaluation, surgical and psychosocial management, and sex steroid replacement, the significantly increased risk for developing specific types of malignancies is both clinically and biologically relevant. The presence of a well-defined part of the Y chromosome (known as the GBY region) is a prerequisite for malignant transformation, for which the testis-specific protein on the Y chromosome (TSPY) is a likely candidate gene. Most recently, undifferentiated gonadal tissue (UGT) has been identified as the likely precursor for gonadoblastoma. This latter phenomenon is frequently found in gonads of DSD patients, and may be related to the risk of malignant transformation. It is proposed that a cromosomic evaluation, particularly the search of the GBY region in combination with clinical parameters, is most informative in estimating the risk for germ-cell tumor development in the individual patient, and might in future be used to develop a decision tree for optimal management of patients with DSD.

Key words: Disorders of sex development; gonadoblastoma; GBY region

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES:

La diferenciación sexual en humanos es por definición un dimorfismo sexual que describe las diferencias morfológicas, entre el sexo femenino y el masculino. Anteriormente se consideraba que ésta decisión se tomaba en el momento de la fertilización debido a la existencia de cromosomas sexuales heteromórficos. Sin embargo, actualmente se considera determinación del sexo a la formación del testículo, ya que el resto del dimorfismo sexual depende de la presencia o ausencia testicular.

Clásicamente se han distinguido tres etapas o niveles de diferenciación sexual: el sexo cromosómico, el sexo gonadal y el sexo genital, que quedan determinados durante el periodo fetal (Kofman-Alfaro et al., 1982). Durante la infancia, pero sobre todo durante la pubertad y en el adulto, debemos añadir el sexo fenotípico (caracteres sexuales secundarios), el sexo psicosexual y el sexo social.

El sexo cromosómico queda determinado en el momento de la fertilización del ovocito por el espermatozoide. En condiciones normales, dependiendo de la constitución gonosómica del espermatozoide quedará determinado el sexo cromosómico masculino 46, XY si el espermatozoide lleva el cromosoma Y o el femenino 46,XX cuando el espermatozoide lleva el gonosoma X (Ford et al., 1959).

La constitución genética de los cromosomas sexuales es determinante para la diferenciación masculina o femenina de la gónada primitiva, siendo imprescindible la expresión de un gen del cromosoma Y para la diferenciación testicular, aunque existen otros genes tanto autosómicos como en el cromosoma X que también son necesarios para la diferenciación del testículo fetal.

Se sabe que la determinación del dimorfismo sexual de los genitales internos y externos depende de la secreción y acción de varias hormonas por parte de la gónada fetal masculina, es decir, del testículo.

Se calcula que por lo menos unos 30 genes distintos (localizados en los cromosomas X, Y y en algunos autosomas) intervienen en la regulación de los distintos procesos necesarios para la determinación y diferenciación sexual (McElreavey, et al., 1993).

EMBRIOLOGIA

Durante las primeras seis semanas de vida fetal las estructuras sexuales son idénticas en los dos sexos y consisten en la cresta gonadal o genital que dará lugar al testículo y al ovario; las células germinales penetran en la gónada indiferenciada y darán lugar a espermatocitos y ovocitos y a dos pares de conductos, denominados de Wolff y de Müller. Los primeros darán lugar a los genitales internos masculinos y los segundos a los femeninos, los genitales externos se constituirán a partir del tubérculo genital, los pliegues labioescrotales y uretrales y el seno urogenital (Behringer,1994).

La combinación de genes que actúan como factores de transcripción y factores parácrinos, con vías de señalización intracelular, son la base del desarrollo armónico de cada uno de los órganos que integran al organismo (Céspedes, 2008).

Hacia la quinta semana de vida fetal, cuando la cavidad celómica está completamente formada, el mesonefros forma un pliegue longitudinal dirigido hacia el interior de la cavidad, denominado cresta urogenital. Células procedentes de esta región se diferencian para formar el ribete gonadal, el riñón y la glándula suprarrenal. El esbozo de gónada primitiva se desarrolla en la cara interna del mesonefros, siendo ya aparente hacia la quinta semana de gestación. Se desconocen los genes y sustancias reguladoras de este proceso en la embriogénesis, aunque parece ser de primordial importancia el papel de diversas proteínas de adhesión celular de la matriz extracelular y sus receptores (entre ellas la fibronectina, la laminina, el antígeno H-Y, integrinas, etc.)

Las células germinales proceden de células endodérmicas que migran desde el saco vitelino hasta la cresta gonadal entre la cuarta y quinta semanas. El conjunto de cresta gonadal y células germinales primordiales constituyen la gónada primitiva bipotencial. Las células terminales se multiplican activamente, de forma que si su número inicial es de 700-1.300, hacia la octava semana su número podría ser de 600.000 y hacia la decimosegunda semana alcanzar los 5-7 millones. Cuando la gónada se diferencia en testículo, las células de Sertoli engloban las células germinales en los túbulos seminíferos, pasando a constituir las espermatogonias, terminándose este proceso entre las semanas 6 y 7. Cuando la gónada no se diferencia en testículo, las células germinales permanecen en el parénquima cortical y se denominan oogonias. La ausencia de células germinales impide la diferenciación del ovario, sin embargo no impide la del testículo.

REGULACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN GONADAL

Se ha visto que la diferenciación de la gónada, depende de las señales provenientes de las células de Sertoli. El factor de crecimiento de fibroblastos-p y la molécula de señalización Desert Hedgehog (DHH) son factores derivados de las células de Sertoli y son requeridos para la diferenciación y funcionamiento de las células de Leydig (Clark, et al. 2001, Colvin, et al., 2001; O'Shaughnessy, et al., 2006). Las células de Leydig fetales en el humano son las primeras en aparecer después de la determinación testicular e inician su producción de andrógenos en la 8va semana de gestación (O'Shaughnessy, et al., 2006). Estas células se localizan en el tejido intersticial del testículo, son productoras de SF1, requerido para la esteroidogénesis y de INSL3 (insulin-like-factor-3) un factor necesario para el descenso testicular (Ivell, et al., 2003; Ferlin, et al., 2006).

De manera contraria no es hasta los 3 meses, aproximadamente, cuando comienza a identificarse, en el sexo femenino, la diferenciación de la gónada primitiva en ovario, mientras que a partir de los 45 días aproximadamente (6-7 semanas) comienza a distinguirse en el sexo masculino, la diferenciación en testículo. (Figura 1)

Testículo

En el embrión humano la diferenciación testicular es ya distinguible a partir de los 43-49 días (6-7 semanas), cuando mide de 13 a 20 mm. La organización de la gónada primitiva en el testículo comienza por la individualización de los túbulos seminíferos, derivados de los

cordones epiteliales del epitelio celómico y del blastema gonadal, en cuyo interior se diferencian y multiplican las células de Sertoli que proceden del epitelio celómico de la cresta urogenital, quedando las células germinales englobadas en su interior. Las células germinales derivan de células primitivas endodérmicas, de la capa interna del endodermo del saco vitelino; su proliferación y diferenciación quedan detenidas en esta fase, en el estadio de espermatogonia primitiva. La diferenciación de las células de Leydig en el espacio intertubular, a partir de células mesenquimales de la cresta urogenital, es posterior a la individualización de los túbulos seminíferos y al inicio de la actividad antimülleriana de las células de Sertoli y tiene lugar a partir de la séptima semana.

Hacia la octava semana el testículo y el mesonefros tienen una posición adyacente al riñón. Al degenerar el mesonefros persiste una banda caudal que liga el testículo a la cresta urogenital y que constituirá el gubernaculum. Éste impide el ascenso del testículo en la cavidad abdominal al alargarse el tronco, como ocurre con el riñón, y tira del testículo hacia la pared abdominal anterior provocando una «hernia» de la cavidad celómica, llamada proceso vaginal, a través de la pared abdominal ventral. El ensanchamiento del proceso vaginal conduce a la formación de los conductos inguinales: la abertura a través de la fascia transversal forma el orificio inguinal interno o profundo y la abertura a través de la aponeurosis del músculo oblicuo externo constituye el orificio inguinal externo o superficial. La regulación del proceso de migración o descenso testicular depende como mínimo de factores mecánicos (presión intraabdominal), neurogénicos y hormonales (probablemente tanto el MIF como los andrógenos) (Josso, et al., 1993).

En el caso de los genitales externos se sabe que la enzima 5-alfa-reductasa presente en el seno urogenital causa la biotransformación de la testosterona a dihidrotestosterona, provocando su virilización. El desarrollo del pene y el escroto comienza poco después del desarrollo de los conductos wolffianos. El pliegue genital se alarga y fusiona para formar el pene y la uretra, las tumefacciones se fusionan y forman un escroto bilobular que sirve como receptáculo para los testículos en el momento de descender (Wilson, et al., 1981).

El gen SRY (Sex-determining Region on the Y chromosome), descrito en 1990, se localiza en la región distal del brazo corto del cromosoma Y (Berta, et al., 1990; Gubbay, et al., 1990; Koopman et al., 1990; Sinclair et al., 1990) y actúa sobre las células del epitelio celómico promoviendo su proliferación y en las células de soporte, dirigiendo su diferenciación hacia células de Sertoli.

SOX9 (SRY-related HMG box 9) se identificó en la banda q24 del cromosoma 17 asociado a una rara patología ósea llamada displasia campomélica (DC), la cual se ha asociado en el 75% de los pacientes con reversión sexual XY (Foster et al., 1994). Antes de la diferenciación sexual, la proteína Sox9 se localiza en el citoplasma de células somáticas de la gónada indiferenciada de ambos sexos. En el momento de la determinación testicular, de la diferenciación de células de Sertoli y por tanto de la expresión de la hormona antimülleriana, la proteína Sox9 se localiza en el núcleo de las células de Sertoli del testículo, mientras que en las mujeres este gen se apaga. La duplicación de SOX9 en un individuo XX ocasiona reversión sexual en ausencia de SRY. Durante el desarrollo testicular, SOX9 también reprime al gen WNT4 quien a su vez actúa sobre Dax1 durante el desarrollo ovárico.

Ovario

La diferenciación del ovario comienza algunas semanas después que la del testículo y no es histológicamente aparente hasta los 70 días o casi el tercer mes de vida gestacional, no siendo completa la diferenciación hasta el sexto mes de vida gestacional. La diferenciación comprende tres procesos: la conversión de las células germinales en oocitos, el desarrollo de las células foliculares con la formación de los folículos primarios y la diferenciación de las células esteroideogénicas. Las células germinales primordiales derivan del endodermo del saco vitelino y migran al ribete gonadal; las del epitelio celómico, derivadas del ribete gonadal, se diferencian en células de la granulosa, y las células mesenquimales del ribete gonadal dan lugar a las células del estroma ovárico (Wilson, et al., 1981; Byskov, et al., 1985; Lawrence, et al., 1992).

Se ha identificado algunos genes que intervienen en la diferenciación ovárica, algunos de ellos localizados en el locus Xp21.3, llamado *DAX1* (DSS_ACH critical region on the chromosome, gene 1); que codifica para un miembro inusual de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares; otro gen identificado en 1p35-p31 es *WNT4*, que codifica una proteína de la familia Wnt/Wingless y también ha sido implicado en la diferenciación del ovario, puesto que su mutación permite la activación de la diferenciación de células de Leydig en la gónada femenina, y se trataría por lo tanto de un represor de la diferenciación masculina.

Existen otros genes aún no bien identificados que regulan parte de esta diferenciación ovárica. Recientemente se identificó una mutación en el gen R-spondin1 (*RSPO1*), la cual provoca la reversión sexual en individuos con genotipo XX, quienes en contraste con su fórmula cromosómica, desarrollan un fenotipo masculino. También se sabe que el gen *Rspo1* se expresa en la gónada fetal en los dos sexos al inicio del desarrollo. Sin embargo, coincidiendo con la diferenciación sexual, *Rspo1* incrementa su expresión en los ovarios y la disminuye en los testículos, en proporción inversa al gen *Sox9*, responsable de la diferenciación testicular.

Si bien, no es necesaria la presencia de dos cromosomas X para la diferenciación ovárica, sí parece ser imprescindible para el mantenimiento de la diferenciación del ovario y del proceso de ovogénesis tal como lo demuestra el proceso de involución y atresia que se produce con el cariotipo 45,X (Russell, 2002).

El proceso de meiosis para dar lugar a los ovocitos requiere la presencia de dos cromosomas X activos, mientras que el cromosoma X debe estar inactivado para el proceso de meiosis en la espermatogénesis. Así pues algunos genes en el cromosoma X son necesarios para la diferenciación, el mantenimiento y la oogénesis del ovario (Swain, et al., 1999).

El proceso de meiosis de las células germinales femeninas comienza entre las semanas 10 y 13 de vida fetal, habiéndose completado la primera meiosis de todas las oogonias hacia los 7-8 meses, por lo que al nacer el producto, el ovario contiene oocitos primarios en el último estadio de la profase I, denominado diploteno. Cada oocito rodeado de células de la granulosa forma un folículo primario. La mayor parte de estos folículos permanecen en este estadio hasta la pubertad. Los oocitos sufren un proceso de atresia, de tal forma que de un máximo de 5-7 millones a los 3 meses de vida fetal, quedan unos 2 millones al nacer, continuando el proceso de atresia durante la infancia, hasta quedar sólo unos 100.000 al llegar a la pubertad (Vainio, et al., 1999).

Las células foliculares parecen proceder de las mismas células progenitoras que las de Sertoli en el testículo. El desarrollo folicular comienza en el centro del ovario y consiste en el englobamiento por células foliculares de un oocito secundario y la formación de una lámina basal. El mantenimiento de las células foliculares fetales parece necesitar la presencia de ovocitos, sin los cuales sufren una regresión. La formación de los folículos primordiales alcanza un máximo entre las semanas 20 y 25, periodo durante el cual las concentraciones plasmáticas de FSH de origen fetal hipofisario alcanzan el máximo nivel. La maduración completa de los folículos ováricos precisa la acción de las gonadotrofinas hipofisarias fetales, de forma que el desarrollo folicular es incompleto en los fetos humanos anencefálicos (Jordan, et al., 2001).

En la gónada, la ausencia de *RSPO1* no afecta el desarrollo normal del testículo (los individuos XY con la mutación son fértiles). Los ovarios en cambio, no pueden desarrollarse de acuerdo con su genotipo XX y siguen el camino hacia testículos. Como el gen (*SRY*) no existe en las mujeres, parece evidente que la carencia de *RSPO1* en un momento crítico del desarrollo gonadal, desencadena el programa completo de masculinización a partir de la expresión del *Sox9* en la gónada bipotencial transformándola en testículo. (Chassot, et al., 2008)

Tabla 1: Genes, locus, función y fenotipo de los factores que participan en el desarrollo sexual.

| Gen | Locus | Función | Fenotipo |
|------------|---------------|------------------------------|--|
| SF1 | 9q33 | Fac. de transcripción | Disgenesia gonadal/ Insuf. suprarrenal |
| WT1 | 11p13 | Fac. de transcripción | Síndromes de Denys-Drash y Frasier |
| SRY | Yp11.3 | Fac. de transcripción | Disgenesia Gonadal XY |
| DAX1 | Xp21.3 | Fac. de transcripción | Disgenesia Gonadal XY (duplicación) Hipoplasia adrenal congénita (mutación) |
| SOX9 | 17q24 | Fac. de transcripción | Varón XX (duplicación) Dis. campomélica y reversión sexual XY (mut) |
| DMRT1 | 9p24 | Fac. de transcripción | Disgenesia gonadal XY |
| HIM | 19q13 | Fac. de crecimiento | Persistencia de mullerianos |
| WNT4 | 1p35 | Mol. señalización | Disgenesia gonadal XY (duplicación) |

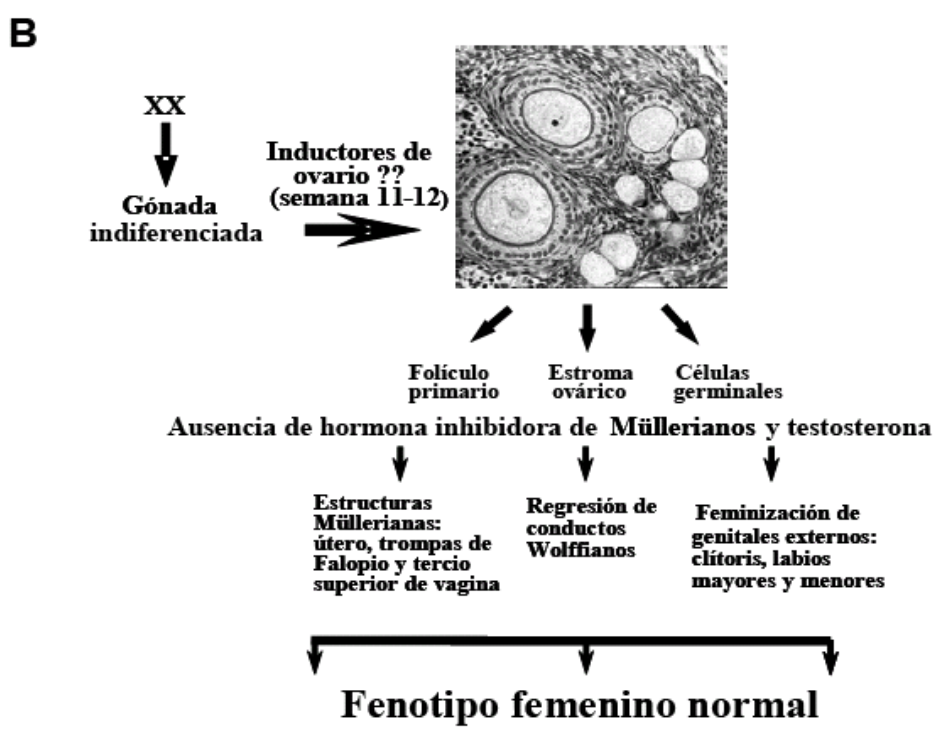
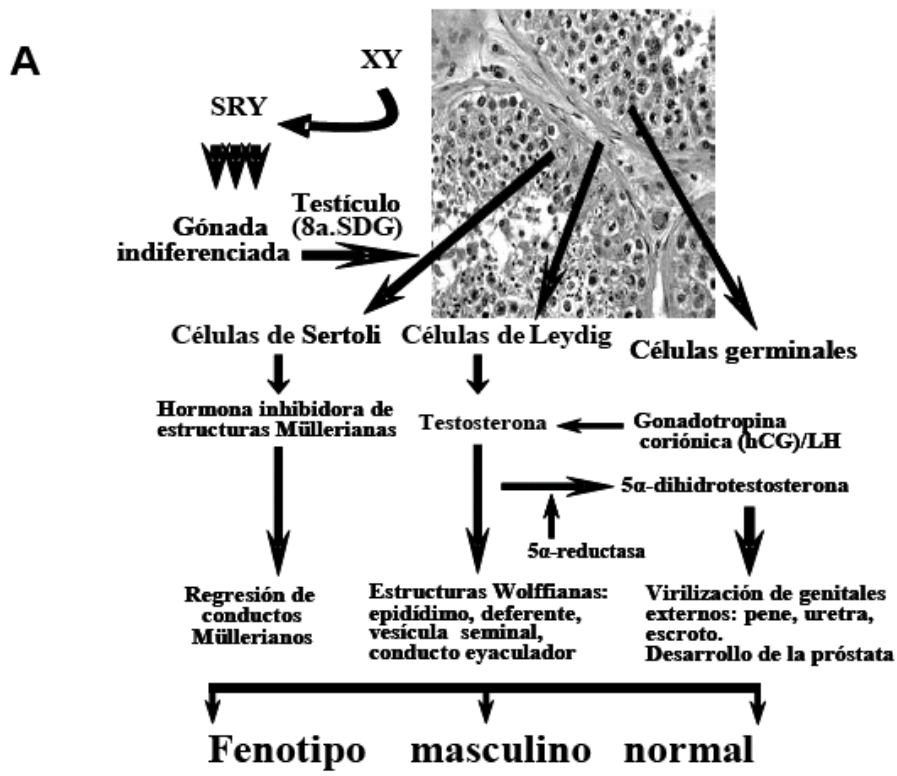


Figura 1: A. Representación esquemática del desarrollo sexual masculino B. Desarrollo sexual femenino.

Tomada de http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq05v29p109_Kofman_02.pdf

DESÓRDENES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

A lo largo de la vía molecular ya explicada, pueden presentarse errores que conducen a alteraciones del desarrollo sexual y que se dividen de acuerdo a las características que presenta.

Los desórdenes de la diferenciación sexual (DSD), comprenden una variedad de condiciones congénitas con desarrollo atípico del sexo cromosómico, gonadal o anatómico. Avances en la identificación de causas genéticas a nivel molecular de estas alteraciones han permitido establecer una nomenclatura que integra los nuevos conocimientos en genética molecular del desarrollo sexual. Los DSD se pueden clasificar en disgenesia gonadal, ya sea mixta ó pura, dependiendo de su complemento cromosómico; siendo pura cuando solo se encuentra una línea celular XX o XY, y mixta cuando se encuentran las dos líneas celulares en un mismo individuo (Hughes, et al., 2006). (Tabla 1 y 2)

| Tabla 1. Modificación de la nomenclatura | |
|--|---|
| Anterior | Actual |
| Intersexo | Alteraciones o desórdenes del desarrollo sexual (DSD) |
| <ul style="list-style-type: none"> Pseudohermafroditismo masculino: Subvirilización, submasculinización XY hombre | 46, XY DSD |
| <ul style="list-style-type: none"> Pseudohermafroditismo femenino: Sobrevirilización, masculinización XX mujer | 46,XX DSD |
| <ul style="list-style-type: none"> Hermafroditismo verdadero | Ovotesticular DSD |
| <ul style="list-style-type: none"> Hombre XX o reversión sexual XX | 46,XX testicular DSD |
| <ul style="list-style-type: none"> Reversión sexual XY | 46,XY Disgenesia gonadal completa |

| Tabla 2. Clasificación de DSD | | |
|---|--|--|
| DSD Sexo cromosómico | A. 45,X: Síndrome de Turner y variantes | |
| | B. 47,XXY: Síndrome de Klinefelter y variantes | |
| | C. 45,X/46,XY: Disgenesia gonadal mixta, DSD ovotesticular | |
| 46,XY DSD | A. Alteraciones en el desarrollo gonadal (testicular) | 1. Disgenesia gonadal completa (Síndrome de Swyer) |
| | | 2. Disgenesia gonadal parcial |
| | | 3. Regresión gonadal |
| | | 4. Ovotesticular DSD |
| | C. Otros: p/ej hipospadias, extrofia cloacal | |
| 46,XX DSD | A. Alteraciones en el desarrollo de la gónada (ovario) | 1. Ovotesticular DSD |
| | | 2. Testicular DSD (p/ej SRY+, dup SOX9) |
| | | 3. Disgenesia gonadal |
| | B. Exceso de andrógenos | 1. Fetal (p/ej def de 21-hidroxilasa, def de 11-hidroxilasa) |
| | | 2. Fetoplacental (def de aromatasa, POR) |
| | | 3. Materna (luteoma, exogenos) |
| | Otros: p/ej extrofia de cloaca, atresia vaginal, MURCS | |
| AMIH: hormona antimülleriana, CASI: Sx de insensibilidad completa a los andrógenos; DSD: Alteraciones del desarrollo sexual; MURCS: Müllerianos, renal, cervicotorácico (Hughes IA et al., Copyright 2002, The Endocrine Society) | | |

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, et al., 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 una alteración del desarrollo sexual donde existe discordancia entre el sexo cromosómico y sexo gonadal. Clínicamente los pacientes son fenotípicamente femeninos,

con amenorrea primaria, alteración del desarrollo puberal y genitales externos infantiles. El útero y las trompas de Falopio están hipoplásicos. Se han identificado mutaciones en el gen SRY entre un 15-20% de los casos (Coutin, et al., 1996). Los tumores de células germinales, principalmente el gonadoblastoma (GB) y el seminoma/disgerminoma, ocurren con frecuencia en este padecimiento. Al grupo de DSD también pertenecen los pacientes 46,XX testicular (varones XX) y los ovotesticulares (hermafroditas verdaderos) (Nistal, et al., 2007).

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/46,XY, siendo el Y normal o anormal. Es importante destacar que la presencia de este cariotipo se asocia con un amplio espectro fenotípico que va desde el Síndrome de Turner clásico y estigmas bilaterales, pasando por la DGM con las características arriba mencionadas hasta individuos masculinos con testículos disgenéticos bilaterales. Estos mosaicos pueden ser generalizados o confinados a la gónada y no se distribuyen homogéneamente (Chemes, et al., 2003), lo que nos podría explicar la alteración gonadal en la mayoría de estos pacientes.

Los DSD están asociados con aberraciones numéricas y estructurales de los cromosomas X y Y, como el síndrome de Turner que es un tipo de disgenesia gonadal, donde con frecuencia encontramos gónadas disgenéticas bilaterales (Pereira, et al. 2008). La monosomía del X representa entre el 50 y el 60% de los cariotipos observados en la disgenesia gonadal (Alvarez-Nava, et al. 2003). Cuando la alteración involucra un rearrreglo en la estructura del cromosoma Y el fenotipo resultante dependerá de: 1) la complejidad del rearrreglo y la presencia del gen SRY, o los genes responsables de baja estatura y espermatogénesis, y 2) la proporción de la línea celular 45,X en los diferentes tejidos. Se ha sugerido una asociación entre microdeleciones en el cromosoma Y y la severidad del fenotipo en 45,X/46,XY (Alvarez-Nava, et al. 2008).

Estos pacientes, además de tener que enfrentar aspectos tan confusos y despectivos como la asignación del género sexual, la evaluación clínica y diagnóstica, el manejo quirúrgico y psicológico, y el reemplazo de esteroides sexuales, tienen un elevado riesgo de desarrollar tipos específicos de neoplasias. Estas neoplasias son tumores de células germinales, y la malignización ocurre principalmente en los pacientes que presentan disgenesia gonadal o hipovirilización (Looijenga, et al. 2007).

Los pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual pueden desarrollar tumores de células germinales en la gónada disgenética; se ha encontrado seminoma; en caso de que el tejido sea similar a testículo o disgerminoma si la gónada es similar a ovario (Russell, et al., 2002).

El desarrollo del tumor invasivo siempre precede a una lesión neoplásica *in situ* conocida como neoplasia de células germinales intratubular no clasificable (ITGNU), comúnmente conocida como carcinoma *in situ* (CIS), y el gonadoblastoma (GB) (Cools, et al., 2006; Looijenga, et al., 2007). Se considera que la contraparte del CIS en la gónada disgenética es el Gonadoblastoma GB.

Las lesiones precursoras de estas neoplasias son el carcinoma *in situ* (CIS)/neoplasia intratubular de células germinales no clasificada (ITGCNU) en tejido testicular, y el gonadoblastoma en aquéllos sin una diferenciación testicular obvia. Más recientemente, el

tejido gonadal no diferenciado se ha identificado como un probable precursor del gonadoblastoma. La disponibilidad de marcadores para las diferentes etapas de desarrollo de las células germinales permite una investigación detallada de las características de las células germinales normales y las pre-malignas.

Varios estudios han documentado la expresión de TSPY; proteína específica de testículo ligada al cromosoma Y; en las formas más comunes de tumores de células germinales de testículo en adultos, los cuales se clasifican como seminomas y no seminomas (Schnieders, et al. 1996; Lau, 1999; Lau, et al. 2003; Honecker, et al. 2006; Cools, et al. 2006). Sin embargo, su valor como un marcador diagnóstico para subtipos de estos cánceres prevalentes entre varones jóvenes entre 15 y 35 años de edad no se ha establecido (Yun Fai, 2009).

GONADOBLASTOMA (GB)

El gonadoblastoma fue descrito detalladamente por Scully en 1953, como un tumor gonadal compuesto de células germinales y derivados de cordones sexuales reorganizado en una granulosa inmadura y células de Sertoli (Scully, 1970). El gonadoblastoma se origina más frecuentemente en gónadas disgenéticas de mujeres XY, pacientes con DSD y pacientes con síndrome de Turner con material residual del cromosoma Y (Scully, 1970; Verp and Simpson, 1987; Mazzanti, et al. 2005; Mancilla, et al. 2003). Estudios recientes han demostrado que secuencias TSPY están presentes en los genomas de estas mujeres XY y pacientes con desórdenes de la diferenciación sexual (DSD) y están expresadas en abundancia en este tipo especial de tumores de células germinales (Lau, et al. 2000; Hildenbrand, et al. 1999; Kersemaekers, et al. 2005), por lo que se sostiene la candidatura de TSPY como el gen para GBY.

La asociación de GB con disgerminoma se ve en un 50% de los casos, y el 10% de los casos con otras neoplasias malignas (Kariminejad, et al., 1972).

Para explicar por qué las gónadas de los pacientes con DSD pueden desarrollar neoplasias de células germinales se ha propuesto una hipótesis que sugiere que la presencia de una región del cromosoma Y, muy bien definida, conocida como la región GBY, es un requisito para la malignización. Dentro de esta región se encuentra la proteína específica de testículo TSPY, ligada al cromosoma Y, considerado un probable gen candidato, que se sugiere que participa en la regulación de la proliferación celular de las células germinales y en dirigir a las células espermatogoniales para entrar a la meiosis (Schnieders, et al. 1996; Li, et al. 2007). También se ha reportado que la expresión de TSPY está estrechamente asociada con el inicio y desarrollo del gonadoblastoma (Li, et al. 2007); así como con el cáncer de próstata (Vijayakumar, et al. 2006). GBY es el único locus oncogénico en el cromosoma masculino Y (Page, 1987; Salo, et al. 1995; Tsuchiya, et al. 1995).

Se ha sugerido que esta región tiene una función fisiológica normal en la proliferación y/o diferenciación de las células germinales en la embriogénesis, pero podría predisponer a las células germinales inmaduras, en un ambiente ovárico disfuncional o en los testículos disgenéticos, a la tumorogénesis (Page, 1987; Salo, et al. 1995; Tsuchiya, et al. 1995; Lau, 1999).

Se ha observado por muchos años que el GB casi exclusivamente se origina a partir de una gónada disgenética de pacientes con DSD con la región GBY positiva.

La presencia de la región GBY aunado a la localización intraabdominal de gónadas disgenéticas se ha relacionado con un cambio del medio ambiente normal de las gónadas, reflejándose esto en una elevación en la presencia de neoplasias gonadales.

Por todo lo anterior, los pacientes con DSD pueden clasificarse según el riesgo que tengan de desarrollar neoplasias de las células germinales en pacientes de riesgo elevado, riesgo intermedio, riesgo bajo y riesgo desconocido, basándonos en los hallazgos clínicos y moleculares.

Los pacientes con riesgo elevado de desarrollar estas neoplasias son los pacientes con disgenesia gonadal que presenten la región GBY en su genoma y gónadas intraabdominales, pacientes con insensibilidad parcial a andrógenos sin gónadas escrotales, y pacientes con síndrome de Denys-Drash y Fraiser.

Los pacientes con riesgo intermedio son los que tienen GBY y síndrome de Turner, y los que cursan con deficiencia de 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa, los que tienen disgenesia gonadal que incluye al cromosoma Y, y los que presentan insensibilidad parcial a andrógenos con gónadas escrotales.

Los pacientes con riesgo bajo son aquéllos con insensibilidad completa a andrógenos, pacientes con ovotestes y las pacientes con Turner sin evidencias del cromosoma Y. Los pacientes con riesgo desconocido, debido al número limitado de estudios que existen al respecto, son los que cursan con deficiencia de 5 alfa reductasa e hipoplasia de células de Leydig.

EPIDEMIOLOGÍA

Los desórdenes del desarrollo sexual en conjunto se presentan en 1 de cada 1000 RN vivos. Dentro de los errores del sexo genético, la Disgenesia Gonadal Mixta ocupa el segundo lugar en cuanto a frecuencia de casos que se presentan en México. Los errores del sexo gonadal, como el denominado en la nomenclatura anterior; Hermafroditismo Verdadero ocupa el 4º lugar en cuanto a frecuencia. Las alteraciones del tipo del sexo fenotípico, como el anteriormente llamado Pseudo Hermafroditismo Femenino, específicamente la Hiperplasia Suprarrenal Congénita ocupa el 1er lugar en cuanto a índice de frecuencia, y el Pseudo Hermafroditismo Masculino el 3er lugar. (Koofman, 2002)

TÉCNICAS DE CITOGÉNÉTICA MOLECULAR: FISH

Una de las técnicas utilizadas para la detección de la región pericentromérica donde se localiza GBY es a través de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), (Tsuchiya, 1995).

Desde finales de 1980, las tecnologías de clonaje y el aumento en la sensibilidad de los anticuerpos, facilitaron el rápido desarrollo de las metodologías basadas en hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), permitiendo así el estudio de las células interfásicas y posibilitando una caracterización más precisa de regiones cromosómicas.

En esta técnica los cromosomas enteros o porciones de estos son marcados con sondas fluorescentes que reconocen secuencias específicas en cromosomas metafásicos o núcleos

celulares fijados. Hoy en día, las técnicas de FISH se encuentran en pleno auge tanto en el campo de la investigación básica como en el diagnóstico clínico.

En la actualidad hay un gran número de sondas comerciales disponibles, siendo las de importancia para este estudio las sondas locus específico, mismas que hibridan con una secuencia única de ADN, es decir, son específicas para un locus determinado. En función de su diana, tienen un tamaño de 1-10 Kb (plásmidos) o son vectores más largos 80 Kb-1Mb (Bacterial artificial chromosomes – BACs, Yeast artificial chromosomes-YACs).

Las sondas de secuencia única permiten detectar reordenamientos estructurales de genes o de regiones cromosómicas concretas e identificar deleciones y duplicaciones submicroscópicas de hasta 3 Mb. No obstante, su aplicación requiere conocer a priori la región que se desea estudiar.

La prueba de FISH representa una herramienta valiosa complementaria al cariotipo para la detección temprana de secuencias específicas del cromosoma Y en pacientes con DSD, una vez que se identifica la presencia o ausencia de estas secuencias relacionadas con el desarrollo de tumores de células germinales, se pueden correlacionar con los datos clínicos de imagen y laboratorio para poder sugerir maniobras de manejo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque no existe un tratamiento estándar para los pacientes con DSD, es muy importante detectar tempranamente en ellos, la presencia de la región cromosómica GBY, lo que nos podrá dar una pauta para identificar a aquéllos posibles pacientes con riesgo de desarrollar algún tipo de neoplasia de células germinales. Actualmente existen muy pocos estudios enfocados a este importante problema de salud. Esta información permitirá brindar a los pacientes con DSD un asesoramiento genético adecuado con la finalidad de mejorar su calidad de vida y prevenir el desarrollo de enfermedades.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la proporción de GBY + en pacientes con desórdenes del desarrollo sexual?

JUSTIFICACIÓN

Las gónadas disgenéticas de los pacientes con DSD son potencialmente propensas a desarrollar tumores, como el gonadoblastoma y los tumores de componente seminomatoso y no seminomatoso, relacionados con la presencia de la región GBY+. Sin embargo, aún no se han esclarecido completamente los mecanismos fisiopatológicos que dan origen a estos procesos neoplásicos. Debido a esto, es necesario, identificar a los pacientes con DSD que presenten la región cromosómica GBY con el objetivo de prevenir complicaciones en su estado de salud y dar pautas para su manejo.

HIPÓTESIS GENERAL

Los pacientes con algunas formas específicas de trastornos de diferenciación sexual (DSD), tienen un riesgo aumentado de desarrollar algún tipo de neoplasia de células gonadales. La región GBY se ha relacionado con un riesgo alto de desarrollar neoplasias gonadales. Su

detección temprana por medio de la técnica de FISH, aunado a los hallazgos clínicos puede auxiliar en la determinación del manejo de estos pacientes. La proporción de pacientes con DSD que tienen la región GBY+ se ha reportado como del 23%.

HIPÓTESIS ALTERNA (H1):

La proporción de pacientes con la región GBY+ en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI es diferente de 23%

HIPÓTESIS NULA (H0):

La proporción de pacientes con la región GBY+ en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI es igual a 23%

OBJETIVO GENERAL

- Establecer la proporción de GBY+ en pacientes con DSD.
- Localizar a los pacientes con riesgo alto de desarrollar neoplasia de células gonadales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar el número de pacientes con DSD que tienen la región GBY+

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Por la manipulación de la variable independiente: Observacional

Por la captación de la información: prospectivo

Por la medición del fenómeno en el tiempo: transversal

Por la dirección del análisis: transversal

Población y tamaño de muestra

Se estudiarán al menos 50 niños diagnosticados clínicamente con DSD que acudan a la consulta de Genética del Hospital de Pediatría, del CMN SXXI desde enero de 2006 a julio de 2009. Los pacientes serán diagnosticados como DSD por criterios clínicos de los servicios de Genética y Endocrinología, así como los respectivos estudios hormonales, de laboratorio y de imagenología.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Inclusión

Pacientes estudiados en el hospital de Pediatría del CMN SXXI con el diagnóstico establecido por el servicio de genética de trastorno de diferenciación sexual (DSD) desde enero de 2006 a julio del 2009.

Pacientes que cuenten con US pélvico y abdominal

Pacientes valorados por el servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, con valoración hormonal.

Exclusión y eliminación

Pacientes con hipospadias o clitoromegalia secundarias a teratogénesis por uso de tratamiento hormonal durante la gestación.

Pacientes con estudios de citogenética molecular que no den resultados concluyentes.

Pacientes con estudios clínicos y de gabinete incompletos

Pacientes que voluntariamente deseen retirarse del estudio.

Pacientes que abandonen el estudio.

VARIABLES DEL ESTUDIO

a) Variable independiente

DSD:

Definición conceptual: alteraciones del desarrollo sexual, comprenden una variedad de condiciones congénitas con desarrollo atípico del sexo cromosómico, gonadal o anatómico

Definición operativa: pacientes de la consulta de Genética médica con algún desorden de la diferenciación sexual.

b) Variable dependiente

Presencia de GBY:

Definición conceptual: Identificación de una región codificante para TSPY ubicada en Yp11

Definición operacional: Detección por citogenética convencional la región GBY o por medio de FISH de señal luminosa para la sondas: SRY (LSI SRY, Yp11.3), Y cen (locus DYZ3, DNA alfa satélite Yp11.1-q11.1) (Abbott/Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) y TSPY(Ypter-p11.2) (Kreatech Diagnostics).

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en el servicio de Genética Médica y en el laboratorio de citogenética de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría, CMN SXXI; IMSS.

Estudio Clínico

Para el estudio clínico de los pacientes se realizó una historia clínica genética haciendo énfasis en los siguientes aspectos:

Consanguinidad y endogamia de los padres

Antecedentes de familiares afectados o recién nacidos fallecidos en las primeras semanas de vida por causas no claras. Existencia de mujeres con amenorrea primaria, esterilidad o virilización

Historia gestacional:

Exposición a medicamentos (principalmente aquellos con efecto androgenizante)

Exposición a contaminantes ambientales

Interrogar si la madre sufrió algún grado de virilización

Exploración física:

Rasgos dismórficos

Hiperpigmentación, en especial en genitales y areolas mamarias
Estado de hidratación
Genitales externos
Simetría
Forma y tamaño del falo
Posición del meato urinario
Presencia y posición de las gónadas
Rugosidad de los pliegues labio-escrotales

Se revisaron los US genital y pélvico, así como los estudios de imagen con los que se contaba, para determinar la ubicación anatómica de las gónadas o estrías gonadales.

Se revisó el perfil hormonal de los pacientes y la valoración por los servicios de Endocrinología, Urología y Cirugía.

Se revisaron los hallazgos de laparoscopia o exploración quirúrgica en caso de contar con ellos.

Se capturaron los datos en hojas de recolección.

Técnica de citogenética clásica para obtención de cromosomas con bandas GTG

A cada paciente se le tomará una muestra de sangre periférica y se procesará por técnicas de citogenética clásica para la obtención de laminillas con cromosomas metafásicos. En una porción de laminillas se realizará un cariotipo con bandas GTG. En otra laminilla se realizará la prueba de FISH.

Siembra y cosecha de linfocitos de sangre periférica

Se tomarán 2 ml de sangre periférica heparinizada a cada paciente, y se agregarán en tubos cónicos estériles que contengan 5 ml de medio de cultivo PB-MAX (Gibco). Se colocarán los tubos cónicos en una incubadora a 37°C por 72 horas para permitir la división celular. Una vez transcurrido este tiempo, se agregarán 120 ml de colchicina (0.2mg/ml) por 25 minutos a 37°C, después se centrifugarán los tubos por 10 minutos a 3,500 rpm. Se decantará el sobrenadante y se agregarán 10 ml de solución hipotónica (KCl 0.075M) agitando vigorosamente y se dejará incubando por 40 minutos en la solución hipotónica. Transcurrido este tiempo, se realizará una prefijación con 1 ml de solución fijadora Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) y se centrifugará a 3,500 rpm durante 10 minutos. Se decantará el sobrenadante y el botón celular se lavará con solución fijadora otras dos veces, o hasta que la pastilla celular se vea limpia. Finalmente se resuspenderá el botón en 1 ml de solución fijadora y se prepararán laminillas con la solución de cromosomas metafásicos, dejando caer de 6 a 8 gotas en cada laminilla previamente limpia y desengrasada.

Bandas GTG

Las laminillas maduras a 37°C por al menos 3 días serán teñidas con la técnica de bandas GTG (Bandas G con Tripsina-Giemsa)(Shaffer et al, ISCN, 2009). Brevemente, las laminillas se colocarán en una solución de tripsina 0.05% por 5 a 10 minutos. Se enjuagarán rápidamente con buffer PBS (Dulbecco) y luego se pasarán a una solución con el colorante Giemsa por 4 minutos. Se volverán a enjuagar las laminillas con agua destilada y se dejarán secar al aire. Las laminillas podrán ser examinadas sin necesidad de montarlas con resina para ver la calidad de la tinción. Posteriormente se montarán con resina y se colocará un cubreobjetos, para realizar el subsecuente análisis microscópico.

Prueba de FISH

La prueba de FISH se realizará de la siguiente manera: las laminillas con cromosomas metafásicos serán deshidratadas en una serie de etanoles al 70%, 85% y 100%. Éstas se dejarán secar al aire. La mezcla de sondas de DNA que se utilizarán consistirá de tres sondas específicas para diferentes secuencias del cromosoma Y: SRY (LSI SRY, Yp11.3), Y cen (locus DYZ3, DNA alfa satélite Yp11.1-q11.1) (Abbott/Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) y TSPY(Ypter-p11.2) (Kreatech Diagnostics).

Se tomaron 10 µl de la mezcla de sondas y se agregará a cada laminilla; éstas se colocarán en una placa de calentamiento a 75°C para permitir la desnaturalización simultánea del DNA de la sonda y de los cromosomas. Posteriormente, las laminillas serán incubadas en una cámara húmeda a 37°C por al menos 16 horas para permitir la hibridación de las sondas con el DNA en estudio. Después de la hibridación, las laminillas se lavarán por 2 minutos en 0.4XSSC a 75°C y 2 minutos con 2XSSC a temperatura ambiente. Por último se dará un lavado adicional de 5 minutos a temperatura ambiente en 4XSSC/0.5% Tween 20. Finalmente las laminillas serán montadas con medio Vectashield (Vector Laboratories, USA) que contendrá 1.25ng/ml de DAPI como contratinción. Las laminillas serán analizadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss, equipado con un grupo de filtros para DAPI, FITC y rojo Texas, además del filtro de triple banda. Se observarán al menos 100 metafases de cada paciente y los resultados serán interpretados por dos observadores independientes. Las imágenes serán capturadas con el sistema computarizado Isys de Metasystems (Carl Zeiss).

RESULTADO

Se recolectaron las muestras de 100 pacientes estudiados en el hospital de Pediatría del CMN SXXI, tanto casos aislados como estudios familiares, con el diagnóstico establecido por el servicio de genética de desorden de la diferenciación sexual (DSD) desde enero de 2006 a julio del 2009, que contaban con US pélvico y/o abdominal, valorados por el servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI.

| # | Edad | Dx | Gónadas | Estrias gonadales | GBY | Cariotipo | FISH |
|----|---------|-------|------------------------|-------------------|-----|-----------------|----------------|
| 1 | 30 años | ICAA | Intrabdominales | No | + | 46,XY | |
| 2 | 2 años | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 3 | 7 meses | DG-XY | Escrotales | No | + | 46,XY | |
| 4 | 24 años | IPAA | Intrabdominal/Escrotal | No | + | 46,XY | |
| 5 | 0 años | IPAA | Inguinales | No | + | 46,XY | |
| 6 | 1 año | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 7 | 2 meses | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 8 | 2 años | DG-XY | Intrabdominal/Escrotal | No | + | 46,XYq- | 46,XY |
| 9 | 1 mes | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 10 | 3 años | OT | Intrabdominales | No | - | 46,XX | 46,XX |
| 11 | 9 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 12 | 1 año | DG-XY | Escrotal/Intrabdominal | No | + | 46,XY | |
| 13 | 16 años | DGM | Intrabdominales | Si | - | 45,X/46,X,+mar | 45,X/46,X,r(Y) |
| 14 | 1 año | DG-XY | Intrabdominal/Escrotal | No | + | 46,XY | |
| 15 | 6 meses | DG-XY | Escrotal/Inguinal | No | + | 46,XY | |
| 16 | 16 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 17 | 5 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 18 | 14 años | DG-XY | Inguinal/Inguinal | No | + | 46,XY | |
| 19 | 4 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 20 | 9 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X/46,X,i(Xq) | |

| | | | | | | | |
|----|----------|------------|------------------------|----|---|------------------------|----------------------|
| 21 | 0 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 22 | 10 meses | DG-XY | Inguinal/Inguinal | No | + | 46,XY | |
| 23 | 10 años | DGM | Intrabdominales | Si | - | 45,X/46,X,i(Xq)/46,XX | |
| 24 | 2 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 25 | 2 meses | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 26 | 0 meses | ICAA | Intrabdominales | No | + | 46,XY | |
| 27 | 11 meses | DG-XY | Intrabdominales | Si | + | 45,XY,t(13;14) | |
| 28 | 1 mes | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 29 | 2 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 30 | 11 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 31 | 11 años | Rokitansky | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 32 | 1 mes | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 33 | 7 meses | ICAA | Inguinales | No | + | 46,XY | |
| 34 | 2 meses | Cloaca | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 35 | 1 año | DGM | Intrabdominales | Si | - | 45,X/46,XX | |
| 36 | 17 años | T | Intrabdominales | Si | - | 46,X,i(Xq) | |
| 37 | 3 meses | HSC | Intrabdominales | Si | - | 46,XX | |
| 38 | 4 meses | Def 5-alfa | Intrabdominales | No | + | 46,XY | |
| 39 | 5 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 40 | 1 año | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 41 | 25 años | ICAA | Intrabdominal/Inguinal | No | + | 46,XYqh+ | |
| 42 | 36 años | ICAA | Inguinales | No | + | 46,XY | |
| 43 | 2 años | DGM | Intrabdominales | Si | + | 45,X,16qh+/46,XY,16qh+ | |
| 44 | 16 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 45 | 16 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 46 | 9 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 47 | 0 meses | Def 5-alfa | Intrabdominales | No | + | 46,XY | |
| 48 | 1 año | Varon XX | Intrabdominales | Si | - | 46,XX | 46,XX. SRY- |
| 49 | 14 años | ICAA | Intrabdominal/Inguinal | No | + | 46,XY | 46,XY |
| 50 | 4 años | T | Intrabdominal | Si | - | 45,X | |
| 51 | 11 años | IPAA | Escrotales | No | + | 46,XY | |
| 52 | 11 años | T | Intrabdominales | No | - | 46,X,i(X) | |
| 53 | 9 años | DGM | Intrabdominal/Escrotal | No | + | 45,X/46,X,i(X) | |
| 54 | 0 meses | IPAA | Escrotal/Inguinal | No | + | 46,XY | 46,XY |
| 55 | 17 años | DGM | Intrabdominales | Si | - | 45,X/46,X,i(Xq) | |
| 56 | 4 meses | IPAA | Escrotales | No | + | 46,XY | |
| 57 | 3 meses | DCamp | Inguinales | No | + | 46,XY | 46,XY |
| 58 | 4 meses | IPAA | Escrotal/Inguinal | No | + | 46,XY | 46,XY |
| 59 | 1 año | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 60 | 2 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 61 | 13 años | T | Intrabdominales | Si | - | 46,X,+mar | 46,X,r(X) |
| 62 | 5 años | ICAA | Intrabdominal/Escrotal | No | + | 46,XY | |
| 63 | 1 año | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX,9qh+ | |
| 64 | 4 meses | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 65 | 2 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 66 | 12 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | |
| 67 | 7 años | DGM | Intrabdominales | Si | - | 45,X/46,X,Xdel(p22) | |
| 68 | 2 meses | T | Intrabdominales | No | - | 46,X,+mar | 46,X,r(X) |
| 69 | 1 año | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 70 | 0 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 71 | 0 meses | DGP | Escrotales | No | + | 46,XY | |
| 72 | 4 años | OT | Intrabdominales | No | + | 45,X/46,XY/46,XX | 45,X/46,XY/ 46,XX |
| 73 | 0 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | 46,XX |
| 74 | 0 meses | DGM | Intrabdominales | Si | - | 46,XX | 45,X/46,XX |
| 75 | 10 años | DGM | Intrabdominales | Si | - | 45,X/46,X,i(Xq) | 45,X/46,XX |
| 76 | 4 años | Def 5-alfa | Inguinales | No | + | 46,XYqh+ | 46,XY |
| 77 | 13 años | DG-XX | Intrabdominales | No | - | 46,XX | 46,XX |
| 78 | 19 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 79 | 11 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 80 | 2 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 81 | 2 meses | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |

| | | | | | | | |
|-----|---------|-------|------------------------|----|---|------------|------------|
| 82 | 12 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X/46,XX |
| 83 | 1 año | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 84 | 2 años | DG-XY | Intrabdominales | Si | - | 46,XY | |
| 85 | 0 meses | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X/46,XX |
| 86 | 0 meses | IPAA | Inguinal/Intrabdominal | No | + | 46,XY | |
| 87 | 11 años | DGM | Intrabdominales | Si | - | 45,X/46,XX | |
| 88 | 43 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 89 | 6 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X/46,XX |
| 90 | 0 meses | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 91 | 13 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X/46,XX |
| 92 | 2 meses | HSC | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 93 | 7 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 94 | 7 meses | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X/46XX |
| 95 | 8 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 96 | 11 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 97 | 8 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 98 | 8 años | DG-XX | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |
| 99 | 14 años | T | Intrabdominales | Si | - | 45,X | 45,X |
| 100 | 17 años | DG-XX | Intrabdominales | No | - | 46,XX | |

DGM: Disgenesia gonadal mixta

HSC: Hiperplasia suprarrenal congénita

ICAA: Insensibilidad completa a la acción de andrógenos

IPAA: Insensibilidad parcial a la acción de andrógenos

T: Síndrome de Turner

OT: Disgenesia gonadal ovotesticular

Def 5-alfa: Deficiencia de 5 alfa reductasa

DG-XX: Disgenesia gonadal XX

DG-XY: Disgenesia gonadal XY

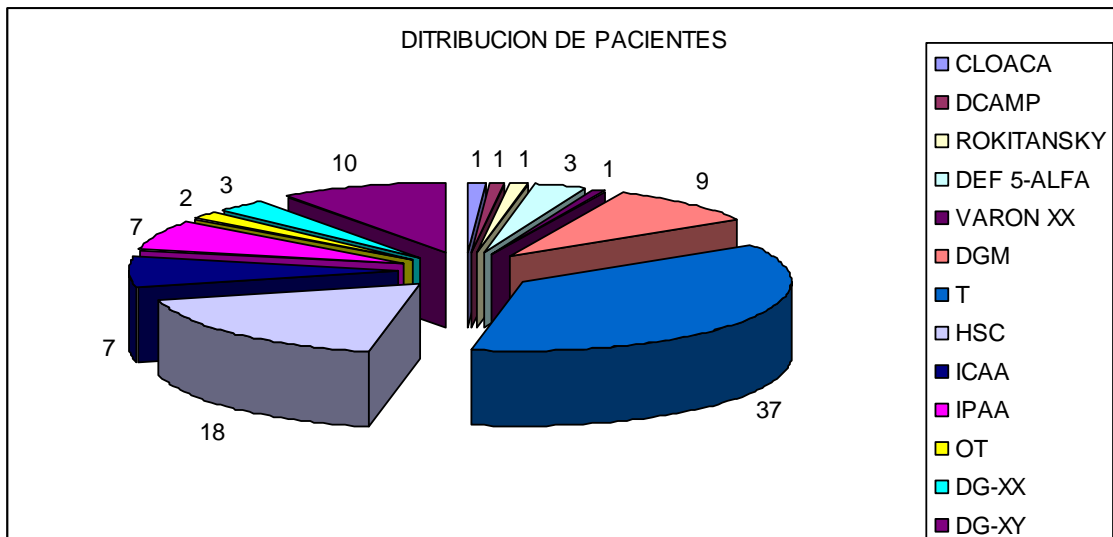


Tabla de frecuencias de acuerdo al diagnóstico establecido en sesión de desórdenes de la diferenciación sexual

De acuerdo a lo reportado en otras literaturas la mayoría de nuestros pacientes pertenecen al grupo de la disgenesia gonadal encontrada en el Síndrome de Turner (T), seguida de la hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) y encontrando casos aislados de persistencia de cloaca, displasia campomélica (DCAMP), varón XX, Síndrome de Rokitansky-Mayer-Kuster-Hauser. En los casos aislados se llevaron a cabo estudios complementarios para su complementación diagnóstica. En el varón XX, actualmente definido como una DSD XX, se realizó un FISH para SRY reportándose negativo, lo que confiere mal pronóstico para el paciente.

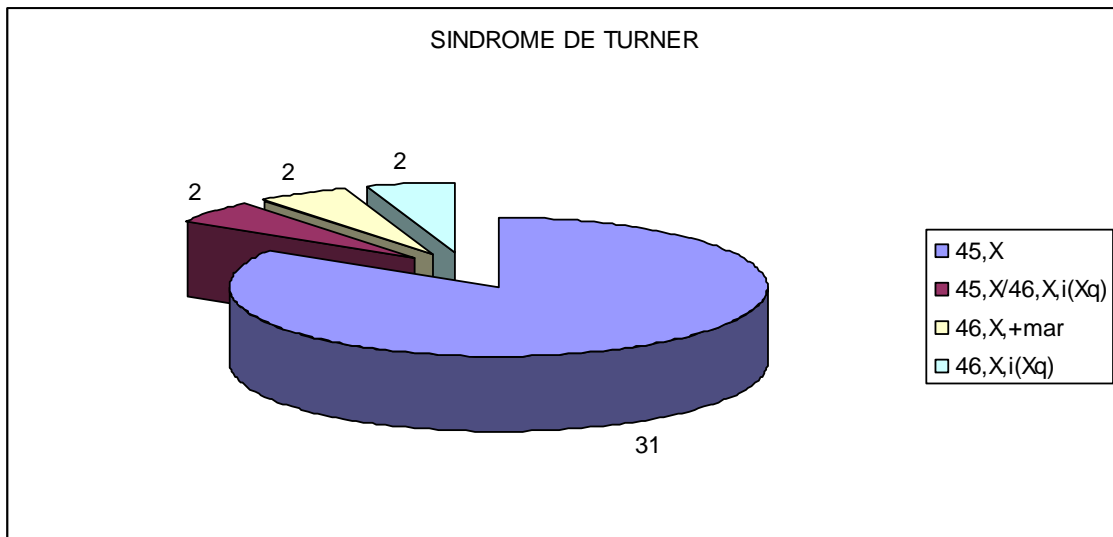
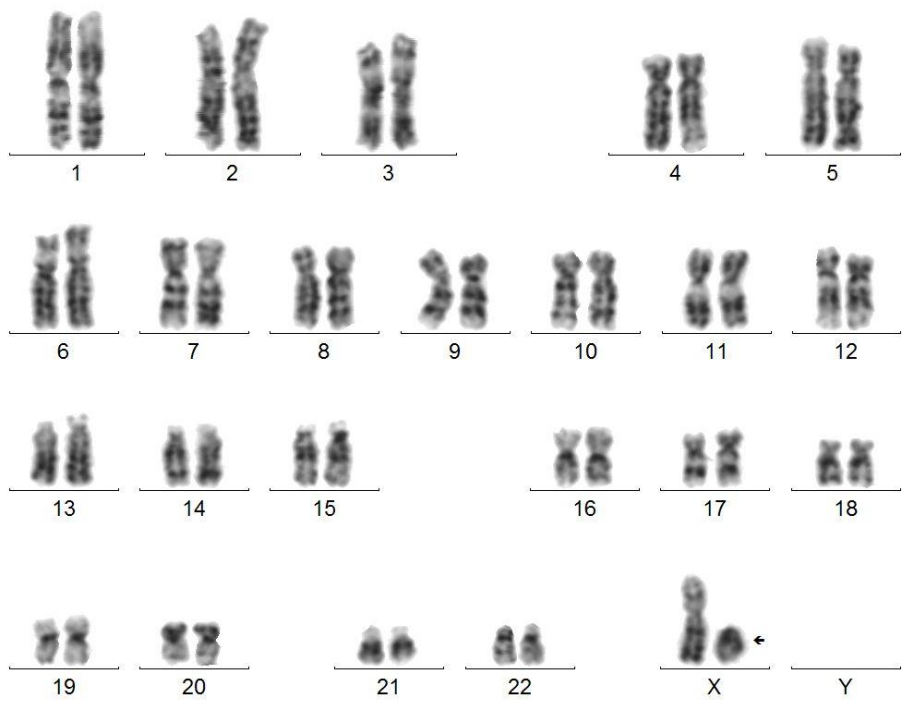


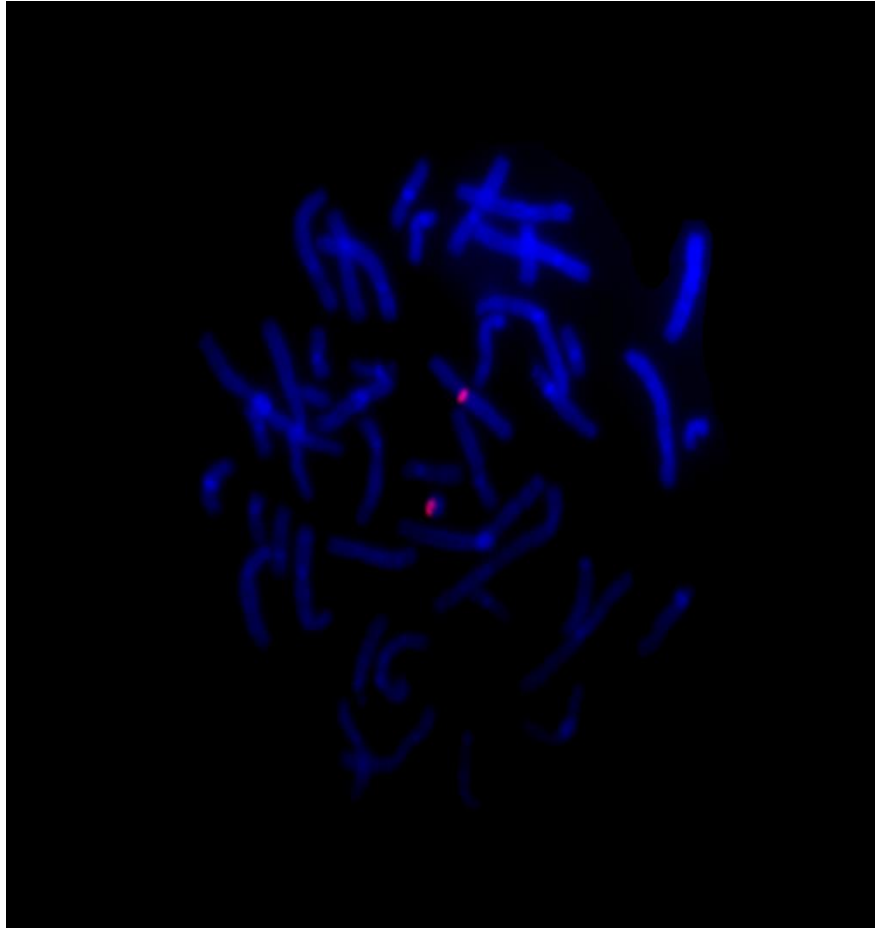
Tabla de cariotipos en las pacientes diagnosticadas con Síndrome de Turner

De las 31 pacientes en las que se detectó una sola línea celular 45,X, en 13 no se detectó otra línea celular o la región GBY+, solo una paciente que ya contaba con el estudio realizado de manera externa tenía la presencia de dicha región y se le realizó una gonadectomía profiláctica durante la realización de este protocolo.

En las 2 pacientes en las que se detectaron cromosomas marcadores se realizó la búsqueda de GBY a través de la técnica de FISH, siendo esta negativa para ambas y encontrando un anillo del cromosoma X.



Cariotipo de sangre periférica, con bandas GTG: 46,X,+mar



*FISH sobre cromosomas metafásicos en paciente con un cromosoma marcador, se incluyó sonda que abarca la región GBY (DYZ3) y centrómero del cromosoma X (DXZ1):
46,X,r(X).ish(DXZ1x2)(DYZ3x0)*

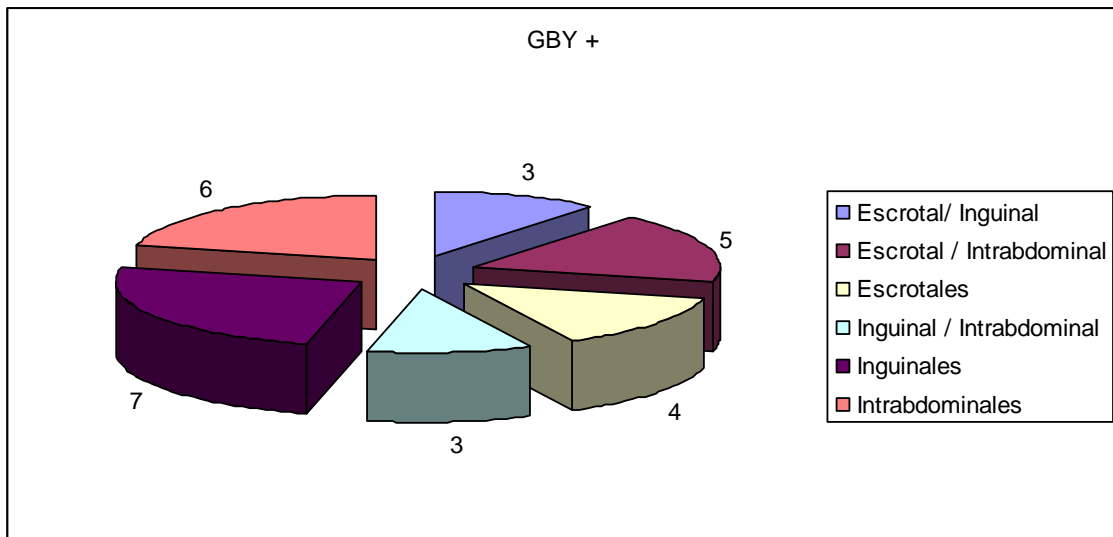


Tabla de ubicación de las gónadas en pacientes con GBY+

El grupo de mayor riesgo de malignización son aquellos que tienen gónadas intrabdominales con GBY +, que en este estudio fueron 6, que corresponden a pacientes con insensibilidad completa a la acción de andrógenos, con DGM y una paciente con síndrome de Turner y una línea con región GBY +. Cuatro de ellos ya fueron gonadectomizados y dos están en vigilancia continua.

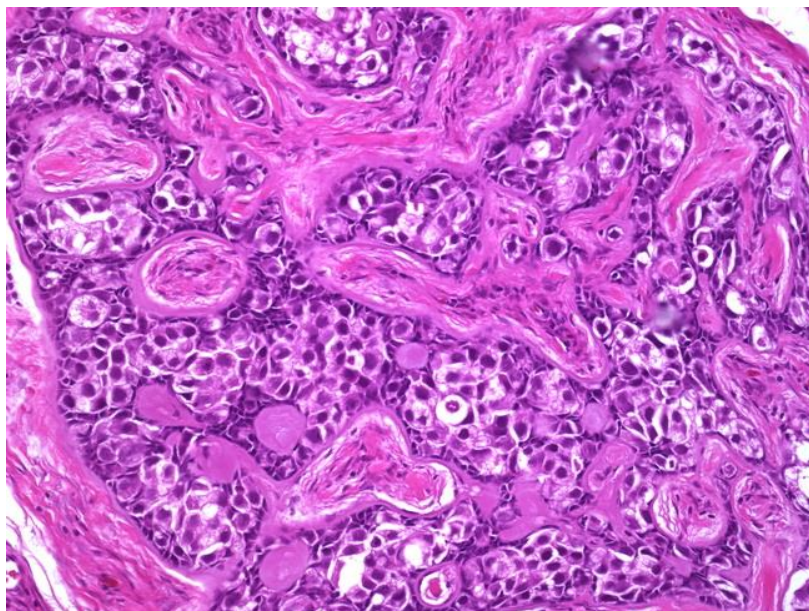


Imagen de Gonadoblastoma que muestra membrana hialinizada alrededor de nidos celulares. (Web Pathology.com)

DISCUSIÓN

Los desórdenes de la diferenciación sexual son entidades que requieren de un abordaje multidisciplinario, además de diversas intervenciones para su adecuado seguimiento. El riesgo que se tiene de desarrollar una neoplasia de células gonadales está relacionado con la presencia de la región GBY, gónadas intrabdominales y la etiología del desorden de la diferenciación sexual.

La identificación de estas secuencias del cromosoma Y son una necesidad, principalmente en pacientes con estrías gonadales como lo son las pacientes con Síndrome de Turner, ya que en estas pacientes puede darse un tratamiento de su talla baja con hormona de crecimiento, que en presencia de gónadas disgenéticas y la región GBY puede incrementar el riesgo de dichas neoplasias. Las 31 pacientes de este estudio con diagnóstico de Síndrome de Turner, tuvieron estudio de búsqueda de una segunda línea celular con presencia de la región GBY. En 2 casos en los que se encontró un cromosoma marcador se realizó FISH, detectándose anillos del cromosoma X. Sólo una paciente 14 años con este diagnóstico, tuvo una segunda línea celular 46,XY y se le realizó durante este protocolo una gonadectomía profiláctica, esta paciente pertenece al grupo de alto riesgo de desarrollar neoplasia debido a que presenta estrías gonadales intrabdominales y región GBY+.

Es importante mencionar que no todos los pacientes requieren gonadectomías profilácticas al momento del diagnóstico, a pesar de tener la región GBY +. Tal es el caso de las pacientes con insensibilidad completa a la acción de

andrógenos, ya que la formación testicular en estas pacientes es normal y el problema entre el sexo cromosómico y el fenotípico se encuentra a nivel del receptor de andrógenos. En este estudio se encontraron 7 pacientes con este diagnóstico, de las cuales 5 se habían sometido durante su infancia a aparentes hernioplastias, donde se asume que se realizaron gonadectomías ya que no se encontraba tejido testicular residual durante su estudio. De las dos pacientes restantes con insensibilidad completa a andrógenos, una continúa en vigilancia en el servicio de Endocrinología ya que se ha demostrado que los testículos en estas pacientes durante la pubertad pueden contribuir con el desarrollo de telarca espontánea, reduciendo la necesidad de altas dosis de estrógenos para su desarrollo mamario. La otra paciente se sometió a gonadectomía a los 4 años de edad por tener una gónada palpable en labio mayor, esta paciente se presentó en la Clínica de Diferenciación sexual y se determinó que el impacto psicológico negativo para la paciente era mayor al beneficio de conservar la gónada. En este último caso la genealogía indicó la necesidad de realizar un estudio familiar encontrando dos tías maternas con el antecedente de infertilidad y con un cariotipo 46,XY. Se ofreció asesoramiento familiar y fueron canalizadas al servicio de Genética del Hospital General de México para su manejo y seguimiento.

El paciente con disgenesia gonadal testicular XX con diferenciación fenotípica masculina, clasificado en la nomenclatura anterior como varón XX se sometió a un estudio complementario con la sonda LSI SRY, Yp11.3 (Abbot/Vysis Inc.) para la región SRY, anteriormente conocida como factor determinante testicular. Esta región se encuentra presente en el 80% de los varones XX y se cree que por medio de una recombinación homóloga anómala durante la gametogénesis paterna en la región PAR 1, se transloca el gen SRY del cromosoma Y al cromosoma X, que al momento de formar un feto con este X alterado y un X normal, se dirige la diferenciación sexual hacia un fenotipo masculino, a pesar

del cariotipo 46,XX. Esto puede explicarse por estudios recientes que han dado importancia al gen *RSPO1* como un determinante de la diferenciación ovárica y su doble dosis génica como causa suficiente para permitir una diferenciación fenotípica femenina, encontrando pacientes que a pesar de no tener la región *SRY* tienen una diferenciación masculina, lo que lleva a pensar que alguna mutación del gen *RSPO1* sea la causa de su diferenciación sexual masculina; esto se ha asociado a una hiperqueratosis palmoplantar, que hasta el momento no ha desarrollado el paciente. Este paciente contribuye a esta teoría al no encontrarse el llamado factor determinante testicular y sin embargo, tener formación testicular. En este caso en particular la ausencia de *SRY* confiere un mal pronóstico reproductivo en el paciente, además de déficit de talla final.

En el caso de los pacientes con deficiencia de 5-alfa reductasa, el diagnóstico se realizó de manera clínica por no contar con la determinación de dihidrotestosterona, sin embargo, se eliminaron los diagnósticos diferenciales por medio de la clínica. Los pocos estudios de pacientes con esta patología, hasta el momento, sugieren que no tienen riesgo de neoplasias, sin embargo, como todos los pacientes con DSD requieren vigilancia.

En el caso de la paciente con Síndrome de Rokitansky-Mayer-Kuster-Hauser, se realizó ultrasonido renal, por la asociación de hasta el 30% de malformaciones renales y Müllerianas, placa de columna cervical y torácica para descartar malformaciones vertebrales, todos estos con resultados normales. Esta paciente no tiene un riesgo incrementado de neoplasia de células gonadales, pero pertenece al grupo de desórdenes de la diferenciación sexual por las alteraciones Müllerianas y vaginales.

CONCLUSIÓN

El porcentaje de GBY + (28%) encontrado en nuestra población es similar al reportado en la literatura, a pesar de que el grupo estudiado es únicamente una selección de pacientes que son referidos a una unidad de alta especialidad para su manejo.

Como grupo nos da una idea de la proporción de pacientes que tenemos con desórdenes de la diferenciación sexual, siendo el grupo más grande el de Disgenesia gonadal pura, con un cariotipo 45,X.

Al individualizar y realizar la detección de la región GBY en estos pacientes se puede determinar el riesgo que tiene cada uno para desarrollar algún tipo de neoplasia de células germinales y sugerir un manejo de acuerdo a esto, así como brindar un adecuado asesoramiento genético.

Ya que no todos los pacientes con desórdenes de la diferenciación sexual tienen el mismo riesgo de desarrollar neoplasias; el uso de sondas para regiones específicas, nos permiten ubicar a los pacientes en un grupo de riesgo; de acuerdo a la presencia o ausencia de la región GBY; esto aunado al estudio clínico de una gónada disgenética intrabdominal resulta en una probabilidad mayor de formar neoplasias y por tanto, es en estos pacientes en los que se sugiere realizar gonadectomía.

La búsqueda de la región GBY por medio de la técnica de FISH es una tecnología tanto disponible como necesaria, ya que nos permite después de identificar por medio de la clínica y estudios de citogenética convencional a los pacientes con alto riesgo de desarrollar algún tipo de neoplasia de células gonadales y así

ubicar el momento oportuno para realizar los procedimientos necesarios para su manejo.

Por lo tanto la realización de gonadectomía profiláctica puede apoyarse de estas técnicas moleculares para determinar el momento más adecuado para llevarla a cabo dependiendo de la etiología del DSD, la ubicación de las gónadas y la presencia o ausencia de la región GBY.

REFERENCIAS:

1. Alvarez Nava, F., Soto, M., Martínez, M. C., Prieto, M. et al. *FISH and PCR analices in three patients with 45,X/46,X,idic(Y)karyotype: clinical and pathologic spectrum*. Ann Genet 2003; 46:443-448
2. Alvarez Nava, F., H., Soto, M., Pineda, L. et al. *High incidence of Y.chromosome microdeletions in gonadal tissues from patients with 45,X/46,XY gonadal dysgenesis*. Fertil Steril. 2008;89:458-460
3. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. *Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development*. Cell.1994; 79(3):415-25
4. Berta, P. et al. *Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor* Nature, 1990; 348, 448-450
5. Byskov AG, Hoyer PE, Westergaar L. *Origin and differentiation of the endocrine cells of the ovary*. J Reprod Fétil. 1985 Sep;75(1):299-306
6. Céspedes C., Chahin S., Coll M., *Trastornos de la diferenciación sexual: enfoque práctico*. CCAP. 2008; Vol 7 Número 2: 45-51
7. Chassot AA, Gregoire EP, Magliano M, Lavery R, Chaboissier MC. *Genetics of Ovarian Differentiation: Rspo1, a Major Player*. Sex Dev. 2008;2:219-227
8. Chemes H, Muzulin PM, Venara MC, Mulhmann M del C, Martínez M, Gamboni M. *Early manifestations of testicular dysgenesis in children: pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumour development*. APMIS.2003;111(1):12-23.
9. Cools M, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LH. *Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers*. Endocr Rev. 2006;27(5):468-484
10. Clark AM, Garland KK, Russell LD. *Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules*. Biol Reprod. 2001; 63(6):1825-38
11. Colvin JS, Green RP, Schmanhl J, Capel B, Ornitz DM. *Male to female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9*. Cell. 2001; 104(6):875-89
12. Coutin AS, Hamy A, Fondevilla M, Savigny B, Paineau J, Visset J. *Pure 46XY gonadal dysgenesis*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 1996;25(8):792-796
13. Ferlin A, Arredi B, Zuccarello D, Garolla A, Selice R, Foresta C. *Paracrine and endocrine roles of insulin-like factor 3*. J Endocrinol Invest. 2006; 29(7):657-664
14. Ford Ce, Jones Kw, Polani Pe, De Almeida Jc, Briggs Jh. *A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome)*. Lancet. 1959; 1(7075):711-713
15. Foster JW, Domínguez-Steglich MA, Guiolo S, Kowk G, et al. *Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene*. Nature. 1994; 372(6506):525-530
16. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, et al. *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. 1990; 346(6281):245-250
17. Hildenbrand R, Schroder W, Brude E, et al. *Detection of TSPY protein in a unilateral microscopic gonadoblastoma of a Turner mosaic patient with a Y-derived marker chromosome*. J Pathol 1999;189:623 - 6
18. Honecker F, Stoop H, Mayer F, et al. *Germ cell lineage differentiation in non-seminomatous germ cell tumours*. J Pathol 2006;208:395- 400.

19. Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA; LWPES Consensus Group; ESPE Consensus Group. *Consensus statement on management of intersex disorders*. Arch Dis Child. 2006;91(7):554-563
20. Ivell R, Hartung S. *The molecular basis of cryptorchidism*. Mol Hum Reprod. 2003; 9(4):175-181
21. Josso, N., Lamarre, I., Picard, J-Y. *Anti-Müllerian hormone in early human development*. Early. Hum. Dev. 1993;33:91-99.
22. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR, Vilain E. *Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans*. Am J Hum Genet. 2001;68(5):1102-1109
23. Kariminejad MH, Movlavi MA, Nasserghodssi MA, Ghafoorzadeh D, Behjatnia Y. *Gonadoblastoma associated with mixed gonadal dysgenesis*. Am J Obstet Gynecol. 1972;113(3):410-414.
24. Kersemaekers AM, Honecker F, Stoop H, et al. *Identification of germ cells at risk for neoplastic transformation in gonadoblastoma: an immunohistochemical study for OCT3/4 and TSPY*. Hum Pathol 2005;36:512- 21.
25. Kofman-Alfaro S, Queipo G. *Diferenciación sexual normal y patológica* http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq05v29p109_Kofman_02.pdf
26. Kofman-Alfaro .S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. *Sexual differentiation. I. Biological basis of sexual dimorphism*. Rev Invest Clin. 1982;34 (4):349-359
27. Koopman, P. et al. *Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation*. Nature 1990; 348, 450–452
28. Lau, Y.F. *Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY gene*. Am J Hum Genet 1999;64:921- 7
29. Lau, Y.F., Chou P, Lezzoni J, Alonzo J, Komuves L. *Expression of a candidate gene for the gonadoblastoma locus in gonadoblastoma and testicular seminoma*. Cytogenet Cell Genet 2000;91:160- 4.
30. Lau, Y.F., 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- 60.
31. Lawrence WD, Whitaker D, Sugimura H, Cunha GR, Dickersin GR, Robboy SJ. *An ultrastructural study of the developing urogenital tract in early human fetuses*. Am J Obstet Gynecol. 1992 Jul; 167(1):185-193
32. Le Caignec C, Baron S, McElreavey K, Joubert M, Rival JM, Mechinaud F, David A. *46,XY gonadal dysgenesis: evidence for autosomal dominant transmission in a large kindred*. Am J Med Genet A. 2003;116A(1):37-43
33. Li, Y., Tabatabai, Z. L., Lee, T. L., Hatakeyama, S., Ohyama, C., and Chan, W. Y. *The Y-encoded TSPY protein: a significant marker potentially plays a role in the pathogenesis of testicular germ cell tumors*. Human Pathology 2007; 38, 1470–1481
34. Li, Y., E. Vilain, F. Conte, E. Rajpert-De Meyts, Y. F. Lau. *Testis-specific protein Y-encoded gene is expressed in early and late stages of gonadoblastoma and testicular carcinoma in situ*. Urol Oncol 2007; 25:141-146
35. Looijenga, L. J., Hersmus, R., Oosterhuis, J. W., Cools, M., Drop, S. L. S., Wolffenbuttel, K. P. *Tumor risk in disorders of sex development (DSD)* Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2007; Vol. 21, No. 3, pp. 480–495
36. Mancilla EE, Poggi H, Repetto G, et al. *Y chromosome sequences in Turner's syndrome: association with virilization and gonadoblastoma*. J Pediatr Endocrinol Metab 2003;16:1157- 63

37. Mazzanti L, Cicognani A, Baldazzi L, et al. *Gonadoblastoma in Turner syndrome and Y-chromosome-derived material*. Am J Med Genet A 2005;135:150- 4.
38. McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. *A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development*. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(8):3368-3372
39. Nistal M, Garcia-Fernández E, Mariño-Enríquez A, Serrano A, Regadera J, González-Peramato P. *Diagnostic value of the gonadal biopsy in the disorders of sex development*. Actas Urol Esp.2007 Oct;31(9):1056-1075
40. O'Shaughnessy, et al., 2006 *The foetal Leydig cell – differentiation, function and regulation*. Internat Jour Androlog 2006; 29:1, 90-95
41. Page DC. *Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads*. Development 1987;101(Suppl):151 - 5.
42. Pereira, SRF., Pereira, A.C.N., Souza, M.T.V.L. y M.R.B.P. Ramos. *FISH, PCR and cytogenetic characterization in a girl with ambiguous genitalia and karyotype mos46,X,iso(Y)(qter→p11.3::p11.3→qter)(80)/45,X(17)/46,X+mar(3)*. Gen Mol Res. 2008; 7(4):1089-1096
43. Russell P, Robboy SJ, Anderson MC. Germ cell tumors of the ovaries. *Pathology of the female reproductive tract*. London, Churchill Livingstone. 2002, pp 641-690
44. Salo P, Kaariainen H, Petrovic V, Peltomaki P, Page DC, de la Chapelle A. *Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome*. Genes Chromosomes Cancer.1995;14:210- 4.
45. Scully RE. *Gonadoblastoma. A review of 74 cases*. Cancer 1970;25:1340- 56.
46. Schnieders F, Dork T, Arnemann J, Vogel T, Werner M, Schmidtke J. *Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues*. Hum Mol Genet 1996;5:1801- 7.
47. Sinclair, A. H. et al. *A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif*. 1990; Nature 346, 240–244
48. Swain A, Novell-Badge R. *Mammalian sex determination: a molecular drama*. Genes Dev. 1999; 1;13(7):755-767
49. Tsuchiya K, Reijo R, Page DC, Distechi CM. *Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome*. Am J Hum Genet.1995;57:1400- 7.
50. Vainio, S.; Heikkila, M.; Kispert, A.; Chin, N. & McMahon, A.P. *Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling*. Nature. 1999; 397:405-409
51. Verp MS, Simpson JL. *Abnormal sexual differentiation and neoplasia*. Cancer Genet Cytogenet 1987;25:191- 218.
52. Vijayakumar S, Hall DC, Reveles XT, Troyer DA, Thompson IM, Garcia D, Xiang R, Leach RJ, Johnson-Pais TL, Naylor SL. *Detection of recurrent copy number at Yp11.2 involving TSPY gene cluster in prostate cancer using array-based comparative genomic hybridization*. Cancer Res. 2006; Apr 15;66(8):4055-64
53. Wilson JD, George FW, Griffin JE. *The hormonal control of sexual development*. Science. 1981 Mar 20;211(4488):1278-1284
54. Yun-Fai CL, Yunmin L. *The human and mouse sex-determining SRY genes repress the Rspol/B-catenin signaling*. J. Genet.Genomics 2009; 36; 193-202

ANEXOS

ASPECTOS PSICOLOGICOS:

Existen un sin número de casos, que desde el punto de vista médico y quirúrgico, son un éxito terapéutico, pero desde el punto de vista psicológico, la desadaptación social y emocional es tal, que pone en evidencia el enorme abismo que en ocasiones existe entre la cura (médica) y la rehabilitación (psicológica). Esto basado en los siguientes argumentos (Téllez AL, 2007):

La sexualidad de un individuo está determinada tanto por el sexo, de orden biológico, que engloba los cromosomas, gónadas, y aparato genital; como por el género, de orden puramente psicológico, que designa sentimientos, actitudes, tendencias, roles.

El género, a diferencia del sexo que es innato, es adquirido.

La identidad sexual de un individuo se establece a partir de la identidad biológica, pero deriva de manera primordial de las experiencias con la familia, principalmente de los padres en los primeros años de vida, y todo lo que es la sociedad y la cultura.

La asignación genérica, la crianza y la educación, son determinantes en el establecimiento de la identidad sexual. Así como la duda en los padres respecto a la identidad sexual de sus hijos, afecta el desarrollo de la misma, también de manera determinante en ellos.

La necesidad de dar seguimiento psicológico a los pacientes, así como de realizar investigación clínica, que nos orientara en su manejo.

Todos los pacientes y sus familias, cuando fue posible, fueron evaluados y valorados por el servicio de Psicogenética para el mejor manejo de la patología, como un evento familiar.

RECURSOS MATERIALES, HUMANOS Y FINANCIEROS

Humanos:

Técnicos del laboratorio de Citogenética de la Unidad de Investigación en Genética Humana del CMN SXXI, IMSS

Biólogo especialista en técnicas de citogenética molecular de la Unidad de Investigación en Genética Humana del CMN SXXI, IMSS

Médicos especialistas en genética del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS.

Médicos especialistas en endocrinología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS

Médicos especialistas en imagenología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS

Médicos especialistas en urología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS

Médicos especialistas en patología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS

Psicóloga especialista en enfermedades genéticas del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS

Materiales y financieros fueron obtenidos de la Unidad de Investigación en Genética Humana del CMN SXXI, IMSS



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, DF a _____ de _____ de 2010

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado, “Detección de GBY+ en pacientes con desórdenes del desarrollo sexual” registrado ante el Comité Local de Investigación con el número R-2010-3603-10.

El objetivo del estudio es determinar la incidencia de la región GBY en pacientes con desórdenes del desarrollo de la diferenciación sexual .

Se me ha explicado que mi participación consistirá en permitir la toma de una muestra de sangre para realizar cariotipo y una hibridación in situ con fluorescencia, con un volumen aproximado de 5 ml por punción.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio que son los siguientes: dificultad para la obtención de la muestra de sangre con necesidad de más de una punción.

El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna, así como responder cualquier pregunta acerca y aclarar cualquier duda que le planteo acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el instituto.

El investigador responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

M en C. Ana Claudia Velazquez Wong
Matrícula

Nombre, firma y matrícula del investigador responsable
UIGM del Hospital de Pediatría del CMNSXXI
01(55) Ext. y

Testigos
