

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

**“Estudio molecular de la regulación transcripcional en
los genes *SF1*, *WT1*, *GATA4* y *ZPFM2* en pacientes con
alteraciones en el desarrollo gonadal”**

TESIS

QUE COMO UNO DE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

PRESENTA

JAVIER PÉREZ DURÁN

DIRECTORES DE TESIS

DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA
DRA. ETHEL AWILDA GARCÍA LATORRE

MÉXICO, D.F. ENERO DEL 2009



Este trabajo fue apoyado por:

- División de Investigación del Hospital General de México
- CONACYT; número de proyecto 8680-M

DGAPA; proyecto IN205608

TÍTULO

**“Polimorfismos asociados a la regulación transcripcional
en los genes *SF1*, *WT1*, *GATA4* y *ZPFM2* en anomalías del
desarrollo gonadal”**

CONTENIDO

	Pág
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	v
ABSTRAC	vi
I.INTRODUCCIÓN:	
Diferenciación sexual	1
Etapa cromosómica	2
Etapa gonadal	2
Determinación sexual	6
Etapa fenotípica	9
Alteraciones en el desarrollo sexual	11
Disgenesis gonadal completa	16
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	21
II.MATERIAL Y MÉTODOS	22

III.RESULTADOS	38
IV.DISCUSIÓN	49
V.CONCLUSIONES	56
VI.PERSPECTIVAS	57
VII.REFERENCIA	58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A. Adenina.

Arg. Arginina.

C. Citocina.

CGP. Células germinales primordiales.

DAX. Del inglés; DSS_AHC critical región on the X chomosome, gene 1.

DGC. Disgenesia gonadal completa.

dpc. Días post coito.

dpo. Días pos ovulación.

DSD. Del inglés; disorders of sex development.

FDT. Factor determinante testicular.

G. Guanina.

GATA 4. Del inglés; GATA-Binding protein 4.

HAM. Hormona antimuleriana.

PCR. Reacción en Cadena de la polimerasa.

Ser. Serina.

SF1. Del inglés; steroidogenic factor.

SNP's. Del inglés; Single nucleotic polimorfic.

SOX. Del inglés; SRY-type HMG BOX.

SRY. Del inglés; Sex determining Region on Y.

t. Testosterona.

T. Timina.

Try. Triptófano.

UTR. Del inglés. Regiones no traducidas.

WNT4. Del inglés; Wingles-Type MMTV Iintegration site family, member 4.

WT1. Del inglés; Gen supresor del tumor de Wilms.

ZFPM2. Del inglés; Zinc finger protein, multitype 2.

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Modificación de la nomenclatura de las alteraciones de la diferenciación sexual (DSD).	12
TABLA 2. Clasificación de DSD.	13
TABLA 3. <i>Genes involucrados en alteraciones del desarrollo sexual: 46,XY.</i>	15
TABLA 4. Polimorfismos en estudio presentes en las regiones promotoras de los genes SF1, GATA4 y WT1.	29
TABLA 5. SNPs presentes en intrones y en las regiones no traducidas 3' y 5' del gen <i>GATA4</i> .	34-35
TABLA 6. SNPs presentes en intrones y en las regiones no traducidas 3' y 5' del gen <i>WT1</i> .	36
TABLA 7. SNPs presentes en regiones intrónicas y en regiones no traducidas 3' y 5' del gen <i>ZFPM2</i> .	37
TABLA 8. Probabilidades de las frecuencias alélicas, observadas y esperadas, de los polimorfismos -1437C-G , -704C-G , -241 A-G del gen <i>GATA4</i> .	39
TABLA 9. Distribución de los genotipos presentes en la región del promotor en el gen <i>GATA4</i> .	40
TABLA 10. Probabilidades de las frecuencias alélicas, observadas y esperadas, de los polimorfismos -473 C-G , -742 A-C del gen <i>WT1</i> .	41
TABLA 11. Distribución de los genotipos presentes en la región promotora del gen <i>SF1</i> .	41
TABLA 12. Distribución de los genotipos presentes en la región promotora del gen <i>WT1</i> .	42

TABLA 13.	<i>Análisis estadístico, de los SNPs del gen WT1 presentes en los casos y los controles, con la prueba F Fisher exacta.</i>	44
TABLA 14.	<i>Análisis estadístico de los SNPs del gen GATA4 presentes en los casos y los controles, con la prueba F Fisher exacta.</i>	45
TABLA 15.	<i>Análisis estadístico de los SNPs del gen ZFPM2 presentes en los casos y los controles, con la prueba F Fisher exacta.</i>	47
TABLA 16.	SNPs con diferencia estadística significativa entre controles mexicanos y pacientes con disgenesias gonadales completas.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema general del estudio.	23
Figura 2. Electroferograma de una parte de la secuencia del gen SRY en un paciente con DGC 1.	38
Figura 3. Electroferograma de una parte de la secuencia del gen SRY en un paciente con DGC 2.	38
Figura 4 Acción del complejo GATA4 /ZFPM2 (Fog2) en la expresión de SRY y SOX9.	55

RESUMEN

El desarrollo testicular en el humano depende de la expresión temprana del gen determinante testicular SRY y de su homólogo SOX9. Los mecanismos moleculares que conducen a la determinación testicular aún están en estudio. Las mujeres XY presentan fenotipo femenino con cariotipo 46, XY y estrías bilaterales. Mutaciones en SRY, conducen a la falla de desarrollo testicular, sin embargo, alteraciones en este gen se presentan únicamente en 15 % de los pacientes, en el resto de los casos se desconoce la causa. Estudios en ratones transgénicos *Wt1* (+/-) y *Sf1* (+/-) B6XY^{AKR} muestran que la reducción en la expresión de los genes *Wt1*, *Sf*, *GATA4* y *ZFPM2* disminuye la transcripción de SRY lo que conduce a reversión sexual. El estudio de polimorfismos funcionales en genes río arriba de SRY (*SF1*, *WT1* y *GATA4*) podrían explicar la falta de desarrollo testicular en estos casos. El objetivo del presente trabajo es identificar SNPs funcionales en los genes *SF1*, *WT1*, *GATA4* y *ZFPM2* en pacientes con disgenesia gonadal completa 46,XY sin mutación en el gen SRY.

Se incluyeron 11 pacientes con DGP 46 XY. 1) Se amplificó y secuenció el marco abierto de lectura del gen SRY de los pacientes. 2) Se estudiaron los SNPs previamente descritos en regiones promotoras de los genes antes mencionados. El análisis de los polimorfismos se realizó mediante PCR en tiempo real usando sondas TaqMan. 3) Se realizó un estudio global de los SNPs presentes en intrones, exones y UTR de los genes *fog2*, *GATA4* y *WT1* mediante la técnica de microarreglo (500K SNPs de Affymetrix).

De los 11 pacientes (18%) Dos presentaron mutación en gen SRY por lo que fueron descartados del estudio de genotipificación. El estudio de los polimorfismos de las regiones promotoras de los genes en estudio pone de manifiesto que no existe diferencia significativa entre los casos y controles.

Se encontraron tres polimorfismos en el intrón cinco del gen *ZFPM2* (rs6469015, rs9643020, rs1442326) y un SNP en el intrón 10 del gen *GATA4* (rs2409811) que presentan diferencias estadísticas significativas entre las muestras de los casos y los controles.

Los polimorfismos que difieren significativamente entre los casos y los controles pueden estar relacionados con la etiología de las disgenesias gonadales XY.

Palabras clave: SNPs, Disgenesia gonadal completa, SRY.

ABSTRAC

Testicular development in the human being depends on the early expression of the testicular SRY gene and its homologue SOX9. The molecular mechanisms that lead to testicular determination are still under study. XY women have a female phenotype with a 46,XY karyotype and bilateral streaks. Mutations on *SRY* lead to the failure of testicular development, however alterations in this gene are only present in 15% of the patients, and in the rest of the patients the cause is unknown. Studies in transgenic *Wt1* (+/-) y *Sf1* (+/-) B6XY^{AKR} mice show that a reduction in the expression of the *Wt1*, *Sf*, *GATA4* and *ZFPM2* genes decreases the transcription of leading to sexual reversion. The study of functional polymorphisms in *SRY* upstream genes (*SF1*, *WT1* y *GATA4*) could explain the lack of testicular development in these cases. The purpose of this study is to identify functional SNPs in the *SF1*, *WT1*, *GATA4* and *ZFPM2* genes in patients with complete gonadal dysgenesis 46, XY without mutation in the SRY gene.

Eleven patients with DGP 46 XY were included. 1) The patients SRY gene opened lecture frame was sequenced and amplified. 2) The previously described SNPs in the mentioned genes promoting region were studied. The polymorphisms analyses was done by real time PCR using TaqMan probes. 3) A global study was done on the SNPs present in exons, introns and UTRs of the *fog2*, *GATA4* and *WT1* genes by a microarray technique (500 SNPs Affymetrix).

From the 11 patients, two (18%) had mutations in the SRY gene and were excluded from the genotyping study. The polymorphism study of the promoting regions of our study genes establishes that there is no significant difference between the cases and the controls.

Three polymorphisms were found on the fifth intron of gene *ZFPM2* (rs6469015, rs9643020, rs1442326) and a SNP on intron 10 of the *GATA4* (rs2409811) that have statistically significant differences between the control and the case samples.

The polymorphisms that differ significantly between cases and controls can be related to the etiology of XY gonadal dysgenesis.

1. INTRODUCCIÓN

DIFERENCIACIÓN SEXUAL

El dimorfismo sexual es consecuencia de una serie de eventos que se presenta en las etapas tempranas de la vida, requiere un alto grado de precisión en los mecanismos que lo regulan. La determinación sexual en mamíferos se basa en el control de la cascada génica que se presenta en las gónadas; éstas participan directamente para establecer el fenotipo sexual, a través de la producción de hormonas. Las alteraciones en el mecanismo molecular en la formación de las gónadas se relacionan con distintos tipos de reversiones sexuales, se pueden presentar en: la formación del primordio gonadal, la determinación sexual, o en el desarrollo del testículo u ovario. El estudio del proceso de diferenciación sexual en humanos se divide en tres etapas: cromosómica, gonadal y fenotípica (Sinclair, 1998; Kofman y Cols., 1982).

Aunque la vía molecular de la diferenciación sexual todavía no se conoce por completo, se sabe que los genes participantes en esta vía, se agrupan en tres clases de acuerdo con su estructura o el tiempo en que ejercen su función (Swain y Badge, 1999).

El primer grupo le constituyen factores de transcripción, los cuales participan desde las primeras etapas de la diferenciación en la cresta genital hasta los procesos finales durante la diferenciación de las distintas estirpes celulares. En este grupo se encuentran genes como **SF1** (Luo y Cols., 1994; Daggett y Cols., 2000), **WT1** (Kriedberg y Cols., 1993; Reddy y Cols., 1996), **GATA4** (Tevosian y Cols., 2002) **LIM1** (Shwalot y Behringer, 1995), **Emx2** (Miyamoto y Cols., 1997) y **DMTR1** (Raymond y Shamu, 1998).

En el segundo grupo se encuentran los genes **determinantes de testículo**, éstos pertenecen a la familia SOX (**SRY-type HMG BOX**), entre ellos se encuentra el gen **SRY**; Sex determining Region on

Y-chromosome (Berta y Cols., 1990; Gubbay y Cols., 1990) y **SOX9** (Kent y Cols., 1996; Da Silva y Cols., 1996), cuya función específica es determinar y promover el desarrollo testicular.

El tercer grupo está constituido por los genes que inicialmente se describieron como promotores del **desarrollo del ovárico**, éstos son **DAX1 Y WNT4** (Swain y Cols., 1998; Vaino y Cols., 1999).

Etapas Cromosómica

La etapa cromosómica se inicia al momento de la fertilización, cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X o un cromosoma Y fertiliza a un óvulo que aporta un cromosoma X. De esta manera se establece el dimorfismo sexual que caracteriza a los mamíferos, en los cuales la hembra presenta un complejo cromosómico sexual XX y en 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 del individuo (Muller, 1994).

ETAPA GONADAL

El desarrollo temprano de la cresta urogenital hacia gónada indiferenciada y posteriormente hacia gónada funcional, marca el inicio de la etapa gonadal, ésta depende de la expresión e interacción de genes que actúan sobre las diferentes estirpes celulares que la integran (Capel, 2000; Bouma y Cols., 2004).

Gónada bipotencial. El desarrollo gonadal se inicia con el establecimiento del primordio gonadal o gónada indiferenciada. En humanos, en la cuarta semana del desarrollo, se observa una estructura común en hembras y machos llamada cresta urogenital que se localiza en la superficie ventromedial del mesonefros, y se origina a partir de células mesenquimales somáticas de éste y de la migración de las células epiteliales de la superficie celómica de la cresta gonadal (Park, 2005). Este primordio se mantiene en estado indiferenciado hasta la semana siete. Durante el estado

indiferenciado, prolifera el epitelio de la cresta genital que rodea a las células germinales, lo que forma los cordones sexuales de ambos sexos.

La gónada indiferenciada la forman dos linajes celulares, las células germinales y las células somáticas (McLaren, 2000); las células germinales primordiales (CGPs) son de origen extragonadal (Merchant, 1976). Los estudios en el ratón han demostrado que las CGPs derivan del ectodermo embrionario y se han detectado en el endodermo del saco vitelino y el mesodermo de la alantoides entre los días 10^o y 12^{vo} migran a través del intestino posterior y el mesenterio dorsal hasta colonizar las crestas genitales (Ginsburg y Cols., 1990; Martineau y Cols., 1997). Se ha descrito que proteínas de la matriz extracelular que se expresan a lo largo del mesenterio dorsal y del intestino posterior guían a las CGPs hacia la cresta gonadal y pueden ser distinguidas por la expresión de marcadores de células madre como la fosfatasa alcalina (PLAP), OCT3/4 y c-Kit.

Respecto al componente somático gonadal encontramos distintas estirpes celulares cuyos orígenes también son diferentes. Al menos tres tipos de células somáticas participan en la diferenciación de la gónada: a) las células de soporte (células de Sertoli en varones o células de la granulosa en las mujeres) que derivan del epitelio celómico de la cresta gonadal; b) las células esteroideogénicas (células de Leydig en el varón y de la teca en la mujer) que derivan de células mesenquimatosas; c) células del tejido conectivo (que incluyen células miodes, peritubulares y endoteliales formadoras de vasos sanguíneos) y; d) las células germinales primordiales (CGP), que originan los gametos.

Genes que participan en el establecimiento de la gónada indiferenciada

LIM1

Mutaciones en este gen producen anomalías en las gónadas de ratones, en humanos aún no se han relacionado mutaciones del gen con alteraciones en el desarrollo gonadal, sin embargo este gen codifica e interactúa con proteínas que son críticas en la formación de la cresta urogenital en esta especie (Kobayashi y Cols., 2004, Tsang y Cols., 2000).

***Sf1* (Factor esteroideogénico 1)**

Es un miembro de la subfamilia de receptores nucleares huérfanos. El gen *Sf1* se localiza en el cromosoma 9p33 (Luo y Cols., 1994). *Sf1* tiene un dominio de unión al DNA compuesto por dos dedos de zinc, altamente conservados entre los mamíferos, cuya función es regular la expresión de genes que participan en el desarrollo sexual y suprarrenal (MacLaughlin y Cols., 2004; Nachtigal y Cols., 1998). Cuenta con un segundo dominio (carboxilo terminal), que es similar al que se encuentra en el subgrupo de receptores nucleares e interactúa con monómeros de secuencias específicas (AGGTCA) de DNA. Cuenta también con dos regiones conservadas que participan en la activación transcripcional, 1) región rica en prolina y 2) una de tipo AF-2. *SF1* se identificó por primera vez como un activador de genes implicados en la biosíntesis de esteroides en diferentes células esteroideogénicas (Ikeda y Cols., 1994), razón por la cual se le dio el nombre de factor esteroideogénico 1. Posteriormente se determinó que *Sf1* se expresa en el desarrollo de la cresta urogenital, el hipotálamo, la glándula pituitaria y las etapas en etapas que preceden a la diferenciación sexual, durante y aún después. *SF1* se detecta en las células de Leydig de Sertoli en las células testiculares. Esto indica un papel fundamental en el desarrollo del eje hipotálamo-pituitaria-gónada.

En el modelo murino las alteraciones en el gen *SF1* muestran ausencia del desarrollo suprarrenal y de las gónadas, además presentan obesidad y alteraciones en la región ventromedial de la glándula pituitaria y del hipotálamo.

Las gónadas de embriones de ratones mutantes para el gen *SF1* no se desarrollan más allá de las primeras etapas. Las crestas genitales comienzan a formarse y son colonizadas por las células germinales; por lo tanto *SF1*, no participa en el desarrollo inicial de la gónada a lo largo del sistema urogenital, más bien parece necesario para la diferenciación, crecimiento y conservación de las

células presentes en etapas tempranas en la gónada indiferenciada. El desarrollo gonadal en los mutantes de *SF1* se detiene entre los días 11 – 11.5 dpc y se degeneran a través de la apoptosis (Luo y Cols., 1994). Los ratones con complemento cromosómico XY presentan reversión sexual, desarrollan útero, oviducto y la parte superior de la vagina a partir de los ductos mulerianos.

***WT1* (Gen supresor del tumor de Wilms)**

Es un gen autosómico se ubica en el cromosoma 11 en la región p13, se asocia al síndrome de WAGR (Tumor de Wilms, aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental) (Scott y Cols., 2005; Le Caignec y Cols., 2007). El gen *WT1* codifica para un factor de transcripción con cuatro regiones de unión al DNA, con dedo de cinc carboxilo-terminal y una región reguladora terminal amino, rica en prolina/glutamina. Los genes *WT1* en el ratón y en el hombre están compuestos por 10 exones y generan cuatro isoformas principales de RNA (Reddy y Cols., 1996), existen dos sitios de inicio de la traducción y modificaciones postraduccionales que generan isoformas; hay por lo tanto 16 formas posibles de la proteína y de manera general existen varios dominios funcionales en ella. Las distintas isoformas de *WT1* difieren en las afinidades de unión al DNA, pero además se localizan diferencialmente dentro del núcleo, dependiendo de la presencia o ausencia de un procesamiento alternativo que introduce tres aminoácidos (lisina-treonina-serina, KTS) entre los dedos de zinc 3 y 4 que origina las isoformas *Wt1* –KTS y *Wt1*+KTS(Bickmore y Cols., 1992).

Estudios “in vivo” e “in vitro” con algunas formas de *WT1* demuestran que al interactuar con otros genes puede regular la transcripción de diferentes maneras ya sea como activador o como represor (Reddy y Cols., 1996; Lee y Harber, 2001).

Además de mediar la supresión de tumores, *WT1* tiene una función esencial en la diferenciación del tracto urogenital. Este gen se expresa en etapas tempranas del desarrollo de la cresta urogenital y ocasiona un patrón de expresión específico en los riñones y gónadas durante el desarrollo. En el testículo y en el ovario, la expresión se restringe a las células de Sertoli y de la granulosa

respectivamente (Hirose y Cols., 1999). En el ratón, el gen *Wt1* se expresa a los 9dpc en la cresta genital indiferenciada de machos y hembras; mientras que la expresión en las gónadas maduras ocurre en las células somáticas de ambos sexos (Pelletier y Cols., 1991). La eliminación del gen *Wt1* en ratones conduce a la ausencia de gónadas y riñones en ratones tanto machos como hembras, lo que evidencia el papel fundamental del gen en el desarrollo de estos órganos (Buckler y Cols., 1991; Kreidberg y Cols, 1993; Grumbach y Cols., 1998).

Determinación sexual

La gónada primitiva se transforma en testículo por acción del gen determinante testicular (FDT) conocido como SRY, que se ubica en el cromosoma Y; en ausencia de este gen, la gónada primitiva evoluciona hacia ovario de manera pasiva (Sinclair y Cols., 1990).

Complemento cromosómico 46 XY.

Aun cuando el esquema molecular que caracteriza a la determinación sexual en mamíferos no ha sido dilucidado totalmente se puede mencionar a los genes SRY y Sox9 como los fundamentales para el inicio de la determinación testicular y a DAX-1, *WT1*, *SF1*, *GATA4* y *ZFPM2*, como principales responsables de conducir la morfogénesis y la diferenciación testicular (David, 2004; Hanley y Cols., 2000).

En los embriones XY, los cordones sexuales de la gónada indiferenciada proliferan hasta la octava semana. Los cordones testiculares, pierden contacto con la superficie del epitelio celómico y comienzan a separarse por una reorganización de tejido conectivo característico del testículo. En ésta se observa migración de células mioideas y endoteliales a partir del mesonefros hacia la gónada, lo que formará la túnica albugínea (Martineau y Cols., 1997; Capel y Cols., 1999; Tilmann y Cols., 1999). Las células tipo epitelial que conforman los cordones testiculares se denominan células pre-Sertoli y cuando empiezan a producir y secretar hormona inhibidora de los conductos

Müllerianos (HIM) se llaman células de Sertoli. Además de los cambios morfológicos, las células de Sertoli constituyen una fuente parácrina temprana de factores de crecimiento y diferenciación de otras células del testículo como las de Leydig. La producción de la hormona anti-Mülleriana (AMH) es el primer producto hormonal del testículo fetal y es necesaria para la regresión de los conductos Müllerianos, primordio de los genitales femeninos internos (Petersen y Cols., 2001). De acuerdo con Scherer (2002) las células de Sertoli son necesarias en la espermatogénesis debido a que proporcionan nutrientes y factores de crecimiento para el desarrollo de las células germinales (Petersen y Cols., 2006).

SOX9

El gen SOX9 participa en la determinación sexual, se ubica en el cromosoma 17 (17q24.3-q25.1) Las mutaciones en sox9 se asocian a pacientes con displasia campomélica (Grumbach y Cols., 1998), la enfermedad que se caracteriza por malformaciones esqueléticas asociadas a reversión sexual 46,XY(Mac Laughlin y Cols., 2004).

Pertenece a la familia de los genes SOX (SRY-type HMG BOX), son factores de transcripción de proteínas de dominio HGM relacionados con el factor determinante de testículo SRY con afinidad a las secuencias AACAAAT y AACAAAG al igual que SRY y otras proteínas SOX (Koopman, 1999; Harley y Cols., 2003).

Estudios de expresión en ratones muestran que Sox9 está presente en bajos niveles, en las crestas genitales de ambos sexos alrededor de los 11.5dpc, dicha expresión se inhibe en la gónada femenina y aumenta en la gónada masculina, implicando a las células de Sertoli como el sitio de expresión. Por lo tanto este gen juega un papel importante en la determinación sexual, inmediatamente después de la expresión de Sry (Da Silva M y Cols., 1998; Kent y Cols., 1996).

GATA4

El gen *GATA 4* es un factor de transcripción, se ubica en el cromosoma 8 en la banda p23.1-p22, es uno de los miembros de la familia “GATA-BINDING PROTEIN”, en los vertebrados adultos *GATA4* se expresa en corazón, epitelio intestinal, y gónadas. Durante el desarrollo fetal la expresión se localiza en el mesodermo y se implica en la regulación de la función y desarrollo gonadal, el gen se expresa en células somáticas en testículo y ovario, *GATA4*, *GATA1* y *GATA6* se expresan durante el desarrollo testicular y es fundamental la expresión de *GATA4* durante la determinación sexual ya que participa en la expresión correcta de *SRY* (Tevosian y Cols., 2002), posteriormente se expresa en las células de sertoli y leydig (Arceci y Cols.,1993, Ketola y Cols., 2002; Viger y cols., 1998).

GATA4 presenta un patrón de expresión en la gónada, sin embargo, actúa en varios niveles del desarrollo gonadal, además que por sí solo puede ser responsable de la regulación de la hormona antimuleriana. De manera similar a *SF1*, *Sox9* y *Wt1*, la función de *GATA4* es suprimida por *Dax1*(Chan y Cols. 2002).

DAX1

El gen *Dax1* se ubica en el cromosoma X, pertenece a la familia de receptores hormonales nucleares, codifica para un miembro huérfano del cual se desconoce el ligando, por lo cual se sugiere que *DAX1* regula la expresión génica mediante interacciones proteína – proteína (Mac Laughlin y cols., 2004).

En el ratón la expresión de *Dax1* en la gónada coincide con la de *Sry* en el 11.5 dpc, continua en el ovario pero en el testículo no se observa expresión después del inicio del desarrollo de los cordones, aproximadamente en el 12.0 dpc (Swain y Lovell-Badge, 1999).

La acción de *SRY* durante la diferenciación testicular reprime la expresión de *DAX1*; por lo tanto, la duplicación de *DAX1* en individuos 46,XY conduce a reversión sexual (Root, 1999; Hiort, 2000). En

un principio se creía que DAX1 era un gen determinante del ovario (Bardoni y cols.,1994); sin embargo se observó que la inactivación dirigida de DAX1 en ratones no afecta el desarrollo ovárico, pero bloquea la espermatogénesis en los machos. Por lo tanto, se concluyó que Dax1 es un gen antitestículo y no un gen determinante de ovario, además participa en la espermatogénesis (Swain y Cols., 1998).

WNT-4

Es un miembro de la familia Wnt, el patrón de expresión durante la embriogénesis sugiere que actúa localmente a través de señales celulares y es necesario para la diferenciación femenina correcta. La inactivación de este gen conduce a la masculinización en la gónadas, la expresión de algunas enzimas esteroideogénicas y enzimas características de las células de Leyding, así mismo se ha demostrado que Wnt4 estimula la expresión de Dax1 (Oréal y cols.,2000; Biason-Lauber y Konrad, 2008).

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la sensibilidad a dosis de ciertos genes como Sox 9, Dax1 y WNT4.

Etapas fenotípicas

En la tercera etapa, la formación de los fenotipos masculino o femenino es consecuencia de la acción ejercida por las hormonas sintetizadas en el tejido fetal o por la ausencia de síntesis de éstas por parte del ovario. El mecanismo que lleva a cabo este dimorfismo en los mamíferos fue descrito originalmente por Jost (Jost y Cols, 1973), quien demostró que al diferenciarse la gónada primitiva a testículo, su producción hormonal induce el desarrollo del fenotipo masculino; en cambio, si la diferenciación gonadal es hacia ovario, con la producción hormonal propia de este órgano, el fenotipo será femenino. La extirpación temprana de las gónadas fetales en ambos sexos también induce un fenotipo femenino (Grumbach y Cols, 1998).

El desarrollo del fenotipo masculino es secundario a la formación de la gónada (testículo), la cual produce principalmente dos sustancias; la primera tiene un carácter inhibitor, por lo que se presenta una involución de los conductos Mülerianos, proceso que se observa entre la sexta y octava semana de gestación y concluye en la décimo primera. Dicha involución esta mediada por la hormona inhibidora de estructuras Mülllerianas (HIM) que es una glicoproteína secretada por las células de Sertoli del testículo fetal (Behringer Cols., 1994). La acción de la hormona antimülleriana se realiza a través de un receptor transmembranal, localizado en las células mesenquimatosas adyacentes a los conductos müllerianos. (Baarends y Cols., 1994).

Inmediatamente después de iniciada la síntesis de la HIM, las células intersticiales del testículo fetal se citodiferencian en células de Leydig, que servirán como sustrato anatómico para la síntesis y secreción de testosterona (T) (Federman, 2006).

La testosterona ejerce su efecto virilizante sobre los conductos Wolffianos, que se diferencian a epidídimo, vasos eferentes, vesícula seminal y conducto eyaculador.

La testosterona es precursor de una tercera hormona fetal virilizante, la dihidrotestosterona (DHT), ésta se forma en las células blanco por la acción de la 5 α reductasa tipo II extragonadal y es el mediador intracelular de la gran mayoría de las acciones de los andrógenos, esta hormona es la única responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata (Mendez y Cols., 1995; Makridakis y Cols., 2005). Al actuar sobre el tubérculo genital se desarrolla el pene, los pliegues genitales se alargan y al fusionarse forman la porción membranar de la uretra masculina, mientras que los engrosamientos labioescrotales, localizados a ambos lados del orificio uretral forman el escroto, donde se alojarán los testículos hacia el tercer trimestre de la gestación cuando terminen su descenso.

En la circulación, la testosterona se une a dos proteínas: a la globulina transportadora de testosterona y a la albúmina. El paso de la testosterona hacia las células no es dependiente de

energía y probablemente está dado por un fenómeno de difusión pasiva. Tanto la T como la DHT se unen a una proteína receptor, conocida como el Receptor de Andrógenos (RA), localizada en el citoplasma de las células blanco. Al unirse con el andrógeno el complejo hormona receptor es translocado al núcleo donde se une a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta a la hormona (Federman, 2006; Vincent G, 1999).

ALTERACIONES DEL DESARROLLO SEXUAL

Las alteraciones en el desarrollo sexual también conocidas como desórdenes intersexuales (DSD: disorders of sex development, de acuerdo a la definición y clasificación del “Consensus Statement on Management of Intersex Disorders”) ocurren en uno de 4500 nacidos vivos. Estos padecimientos comprenden una gran variedad de anomalías definidas por condiciones congénitas en donde el sexo fenotípico, gonadal o cromosómico es atípico (Hughe y Cols., 2006). 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 (tablas 1 y 2).

Tabla 1. Modificación de la nomenclatura.

Anterior	Actual
Intersexo	Alteraciones o desordenes del desarrollo sexual (DSD)
Pseudohermafroditismo masculino Baja virilización de un varón XY Baja masculinización de un varón XY	DSD 46,XY
Pseudohermafroditismo femenino Sobrevirilización de una mujer XX Masculinización de una mujer XX	DSD 46,XX
Hermafrodita verdadero	Ovotesticular DSD
Varón XX o reversión XX	46,XX testicular DSD
Reversión sexual XY	Disgenesia gonadal completa 46,XY

(Tomado de Hughes IA et al., 2006; Copyright 2002, The Endocrine Society).

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)	
	(D) 46,XX/46,XY (quimera, DSD ovotesticular)	
DSD 46,XY	(A) Alteraciones en el desarrollo gonadal (testicular).	1. Disgenesia gonadal completa (síndrome de Swyer)
		2. Disgenesia gonadal parcial
		3. Regresión gonadal
		4. Ovotesticular DSD
(B) Alteración en la síntesis o acción de los andrógenos.	1. Defectos en la biosíntesis de Andrógenos (por ejemplo, deficiencia de 17- hidroxisteroide dehidrogenasa, deficiencia de 5-alfa reductasa, mutaciones StAR).	
	2. Defectos en la acción de los andrógenos (por ejemplo, CAIS, PAIS)	
	3. Defectos en el receptor de LH (por ejem, Hipoplasia de las células de Leydig, aplasia)	
	4. Alteraciones de AMH y sus receptores (Síndrome de persistencia de los conductos Mülllerianos)	
(C) Otros (por ejm: varias hipospadias, extrofia cloacal)		
DSD 46,XX	(A) Alteraciones en el desarrollo de la gónada (ovario)	1. Ovotesticular DSD
		2. Testicular DSD (por ejm, SRY+, dup SOX9)
		3. Disgenesia gonadal.
	(B) Exceso de andrógenos	1. Fetal (por ejm, deficiencia de 21-hidroxilasa, deficiencia de 11-hidroxilasa)
2. Fetoplacental (deficiencia de aromatasa, POR)		
3. Maternal (luteoma, exogenos, etc)		
(C) Otros (por ejm: extrofia de cloaca, atresia vaginal, MURCS, y otros síndromes)		
<p>Aún cuando la consideración del cariotipo es útil para la clasificación, la referencia del cariotipo debe ser evitada. De forma ideal se considera un sistema basado en la descripción de términos (por ejem; síndrome de insensibilidad a los andrógenos) debe ser usado mientras sea posible. AMH, hormona antimülleriana; CAIS, síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos; DSD, alteraciones del desarrollo sexual; MURCS, Mülllerianos, renal, cervicotorácico. (Tomado de Hughes IA et al., 2006; Copyright 2002, The Endocrine Society).</p>		

(Tomado de Hughes IA et al., 2006; Copyright 2002, The Endocrine Society).

En humanos existe gran variedad de genes que participan en la masculinización del feto XY, en consecuencia la ausencia o modificación de cualquiera de estos genes causan alteraciones en la diferenciación sexual. Varios casos de DSD reportados tempranamente en humanos XY han sido atribuidos a mutaciones en genes que participan en la vía de diferenciación testicular, por ejemplo: una mutación que involucre la sustitución de un par de bases en el dominio de unión al DNA de *SF1*, incluso en un estado heterocigoto, causa feminización en individuos XY (Ozisk y Cols., 2002). De forma similar la ausencia de función de *WT1*, el cual de forma normal codifica para varios

factores de transcripción, causa falla en el desarrollo de la gónada y el riñón en homocigotos y reversión sexual XY en heterocigotos (Villain y Cols., 2002).

Mutaciones en el marco abierto de lectura de SRY causa disgenesias gonadales XY (Scherer, 2002). También duplicaciones o mutaciones en el gen SOX9 causa DSD XY y defectos en el esqueleto (Morais da Silva y Cols., 1996; Huang y Cols., 1999; Hsiao y Cols., 2006). La eliminación de un pequeño segmento de un alelo del cromosoma 9 origina un hemicigoto para el locus DMRT1, la cual causa falla en el desarrollo testicular y feminización de una variedad de tejidos no gonadales (Ottolenghi Cols., 2000; Vilain, 2002; Zarkower D, 2001). Fallas en la regulación de DAX1 o WNT4 (debidos a la duplicación del gen DAX1 ó a una mutación en el locus de WNT4) también causan reversión sexual en individuos XY (Zanaria y Cols., 1994; Jordan y Cols., 2001; Sanlaville y Cols., 2004). Cada vez son más los reportes sobre mutaciones en genes específicos involucrados en el desarrollo sexual que pueden ocasionar alteraciones en individuos XY y XX y que muestran una gran variedad de fenotipos, dependiendo del estado específico en el cual se alteró la diferenciación sexual.

En pacientes, con formas específicas de alteraciones en el desarrollo sexual, se incrementa el riesgo para desarrollar cánceres originados en la línea germinal; dentro de este grupo de tumores varias entidades se han identificado y caracterizado por la edad de aparición, histología, comportamiento clínico y constitución genómica (Oosterhuis y Looijenga, 2005).

Tabla 3. Genes conocidos involucrados en alteraciones del desarrollo sexual: 46,XY.

Gen	Proteína	OMIM	Locus	Herencia	Gónada	Estructuras Mullerianas	Genitales Externos	Características asociadas/variantes de fenotipos
46,XY DSD								
Alteraciones de la gonada (testículo) desarrollo: alteraciones de genes aislados								
WT1	FT	607102	11p13	AD	Testículo disgenético	±	Femenino o ambiguo	Tumor de Wilms, anomalidades renales, tumores gonadales (síndromes WAGR, Denys-Drash, y Frasier)
SF1 (NR5A1)	Receptor Nuclear FT	184757	9q33	AD/AR	Testículo disgenético	±	Femenino o ambiguo	Fenotipos severos incluyendo falla adrenal primaria; fenotipos intermedios tienen disgenesia gonadal parcial aislada.
SRY	FT	480000	Yp11.3	Y	Testículo disgenético o ovotestes	±	Femenino o ambiguo	
SOX9	FT	608160	17q24-25	AD	Testículo disgenético o ovotestes	±	Femenino o ambiguo	Displasia Campomelia (rearrreglos 17q24, fenotipo intermedio de milder phenotype than point mutations)
DHH	Molécula de señalización	605423	12q13.1	AR	Testículo disgenético	+.	Femenino o ambiguo	Fenotipo severo de un paciente incluye neuropatía minifascicular, otros pacientes disgenesia gonadal aislada.
ATRX	Helicase (remodelación de cromatina?)	300032	Xq13.3	X	Testículo disgenético	¾	Femenino, ambiguo o masculino	a-Thalassaemia, retraso mental
ARX	FT	300382	Xp22.13	X	Testículo disgenético	¾	Ambiguo	lissencephaly ligada-X, epilepsia, inestabilidad de la temperatura
Disorders of gonadal (testicular) development: chromosomal changes involving key candidate genes								
DMRT1	FT	602424	9p24.3	Delección Monosómica	Testículo disgenético	±	Femenino o ambiguo	Retraso Mental
DAX1 (NR0B1)	Receptor Nuclear FT	300018	Xp21.3	dupXp21	Testículo disgenético u ovario	±	Femenino o ambiguo	
WNT4	Molécula de señalización	603490	1p35	dup1p35	Testículo disgenético	+.	Ambiguo	Retraso Mental
Disorders of hormone synthesis or action								
LHGCR	Receptor de proteína G	152790	2p21	AR	Testículo	¾	Femenino, ambiguo o masculino	Hipoplasia de células de Leydig
DHCR7	Enzima	602858	11q12-13	AR	Testículo	¾	Variable	Síndrome Smith-Lemli-Opitz: facies toscas, sindactilia del segundo- tercer dedo del pie, retraso del crecimiento y en el desarrollo, anomalidades cardíacas y viscerales.
STAR	Proteína Mitochondrial de membrana	600617	8p11.2	AR	Testículo	¾	Femenino	Hiperplasia adrenal lipoide congénita (falla adrenal primaria), falla en la pubertad
CYP11A1	Enzima	118485	15q23-24	AR	Testículo		Femenino o ambiguo	Hiperplasia adrenal congénita (falla adrenal primaria), falla en la pubertad
HSD3B2	Enzima	201810	1p13.1	AR	Testículo	¾	Ambiguo	CAH, falla adrenal primaria, androgenismo parcial debido a ↑DHEA
CYP17	Enzima	202110	10q24.3	AR	Testículo	¾	Femenino, ambiguo o micropene	CAH, hipertensión debido a ↑corticosterona y 11-deoxycorticosterona (excepto en deficiencia 17,20-lyase)
POR (P450 oxidoreductasa)	Enzima CYP donador de electrones	124015	7q11.2	AR	Testículo	¾	Masculino o ambiguo	Características mezcladas de deficiencia a 21-hydroxylase, 17α-hydroxylase/17,20-lyase, and aromatasa; algunas veces asociado con craneosinostosis Antley Bixler
HSD17B3	Enzima	605573	9q22	AR	Testículo	¾	Femenino o ambiguo	Androgenización parcial a la pubertad, ↑androstenedione:relación / testosterona
SRD5A2	Enzima	607306	2p23	AR	Testículo	¾	Ambiguo o micropene	Androgenización parcial a la pubertad, ↑testosterona: relación/DHT ,
AMH	Molécula de señalización	600957	19p13.3-13.2	AR	Testículo	+.	Masculino normal	Síndrome de persistencia de los conductos mullerianos
AMH Receptor	Receptor transmembrana Serine-threonine kinase	600956	12q13	AR	Testículo	+.	Masculino normal	(PMDS). Genitales externos masculinos, criptorquidismo bilateral.
Receptor de Androgénos	Receptor nuclear FT	313700	Xq11-12	X	Testículo	¾	Femenino, ambiguo, micropene o masculino normal	Espectro fenotípico del síndrome de insensibilidad completa a los andrógenos (genitales externos femeninos) y a la insensibilidad parcial (ambiguos) a genitales masculinos normales/infertilidad
AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo; CAH, Hiperplasia adrenal congénita; FT, factor de transcripción; X, recesivo ligado-X; Y, recesivo ligado-Y.								

(Tomado de Hughes IA et al., 2006; Copyright 2002, The Endocrine Society).

DISGENESIA GONADAL COMPLETA 46, XY.

Los errores en los mecanismos moleculares, al momento de la formación de la gónada conducen a diversas patologías conocidas como síndromes de reversión sexual; dentro de éstas se encuentra la **disgenesia gonadal**. Es un desorden de la determinación y diferenciación sexual que incluye dos formas: completa (pura) y parcial.

Los pacientes con cariotipo 46, XY y disgenesia gonadal completa tienen fenotipo femenino, desarrollo genital femenino, estrías fibrosas bilaterales, desarrollan estructuras mullerianas y en etapas puberales presentan talla normal, ausencia de caracteres secundarios y amenorrea primaria (MacLaughlin y Cols, 2003). Esta patología es un modelo biológico, en él se han podido estudiar las interacciones génicas, en las que se destaca la participación del gen determinante testicular (SRY) ya que mutaciones en éste conducen a la disgenesia gonadal completa 46, XY (DGC). Sin embargo la mutaciones en el SRY sólo se presentan en alrededor del 15 % de las DGC por lo que no se puede explicar el origen de la patología en el resto de los pacientes (Scherer y Cols, 1998).

La mayoría de las mutaciones del gen SRY se han identificado en mujeres XY y se localizan en la caja HMG, sin embargo también se han descrito mutaciones fuera de la caja HMG, las cuales se cree actúan alterando la expresión del SRY (Grumbach y cols., 1998).

En el 80 % de los casos la etiología de las *DGC* 46, XY se desconoce, lo que sugiere que mutaciones en genes blanco o activados por SRY podrían ser causa de la reversión sexual. Se cree que los genes que determinan la expresión correcta de SRY proveen un ambiente gonadal adecuado para que el gen se exprese en el momento apropiado: algo similar ocurriría en los genes que actúan “río abajo” de SRY los cuales originan a las estructuras testiculares apropiadas, pero como hay especificidad de unión de la proteína SRY, aún no es posible determinar cuáles son los genes activados por *SRY*. En los últimos años fue posible reconocer que mutaciones en genes responsables de síndromes genéticos bien definidos tales como *WT1*, *SOX9* y *SF1*, resultan en reversión sexual 46 XY. Por lo

tanto estos datos muestran la heterogeneidad genética de la reversión sexual XY y permiten reconocer la participación y la jerarquía de cada uno de estos genes en la cascada de diferenciación sexual (López y Cols.1998, Roberts y Cols., 1999).

Otra de las causas asociadas a la reversión sexual en mujeres 46,XY sin alteraciones en el gen *SRY* es la presencia de duplicaciones de Xp21 (Bardoni y Cols., 1994). En esta región se clonó e identificó un gen al que denominaron *DAX1*, (Zanaria y Cols., 1994), Las duplicaciones de *DAX1* explican la reversión sexual en humanos, sin embargo en el modelo murino los ratones XY con copias extras de *DAX1* sólo presentan retraso en el desarrollo a nivel testicular, sin reversión sexual, Swain y Cols (1998). Este grupo de trabajo realizó un estudio de ratones transgénicos con copias extra de *DAX1* y alelos débiles de *Sry* que resultaron en reversión sexual completa, lo que sugiere que *DAX1* podría ser antagónico respecto al efecto de *Sry*.

Las duplicaciones en el gen *Wnt4* son otra causa de reversión sexual 46, XY; se ha demostrado en modelos "in vitro" que *WNT4* regula la expresión de *Dax1* de manera positiva, en el 2001 se describió un paciente 46 XY con reversión sexual el cual presentaba una duplicación de la región 1P31-p35 la cual incluye al gen *WNT4*.

El desarrollo de tumores en las disgenesias gonadales completas es de importancia médica, ya que se ha descrito una incidencia del 20 al 30% de los casos, las neoplasias más comunes son el gonadoblastoma y el disgerminoma e incluso el carcinoma embrionario es frecuente (Behtash y Cols., 2007).

Varones, XX

En este síndrome, los individuos se caracterizan por presentar testículos bilaterales, cariotipo 46,XX y fenotipo masculino. Aunque en la literatura se han reportado casos familiares con dos o más varones XX o familias donde existen tanto individuos con HV como varones XX, la mayoría de los casos son esporádicos. El estudio molecular en del gen *SRY* en estos pacientes ha mostrado que en

los casos esporádicos el 90% de los pacientes son SRY positivos explicando el desarrollo testicular. Sin embargo en los casos familiares este gen no se ha identificado, son negativos a SRY y se propone que existen otros genes o mecanismos de acción involucrados en la determinación gonadal.

Hermafroditismo Verdadero

El hermafroditismo verdadero (HV) se caracteriza por el desarrollo de tejido testicular y ovárico en un mismo sujeto [Berkovitz y cols, 1982]. Ambos tipos de tejido pueden coexistir en una sola gónada denominada ovotestis o de manera separada. En la mayoría de los casos la porción ovárica del ovotestis es funcional y en la vida adulta puede presentarse incluso ovulación. Clínicamente existe ambigüedad genital y desarrollo variable de estructuras müllerianas y wolffianas en la mayor parte de los casos el útero está presente [Berkovitz y Cols., 1982].

El HV es una anomalía genéticamente heterogénea: 60% de los casos son 46,XX, 33% presenta mosaicismos con una segunda línea celular que presenta un cromosoma Y normal o anormal, el 7% restante es presenta un cariotipo 46,XY (Krob y Cols., 1994).

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha logrado un progreso considerable en el reconocimiento de los determinantes genéticos que conducen a la definición de los fenotipos femenino y masculino en mamíferos. A pesar de estos avances, la mayoría de los genes ya identificados sólo se han podido estudiar en algunos organismos y aún se desconoce del mecanismo de acción, la estructura, las proteínas para las que codifican y las interacciones celulares necesarias para que el desarrollo sexual se lleve a cabo normalmente. El estudio de pacientes con anomalías del desarrollo gonadal ha permitido dilucidar varios de los eventos y mecanismos que suceden durante el desarrollo gonadal en humanos. Con el advenimiento de los estudios genómicos y el análisis masivo de genes, ha sido posible continuar con el estudio de muchos aspectos, hasta ahora desconocidos, en el desarrollo de nuestra especie. La disgenesia gonadal pura 46, XY es un modelo adecuado para abordar alteraciones del desarrollo testicular, ya que únicamente en 15 % de los casos se conoce la etiología. Los ratones transgénicos que portan un alelo débil para el locus SRY muestran alteraciones en el desarrollo gonadal, por lo que el estudio de polimorfismos funcionales en genes "río arriba" de SRY (*SF1*, *WT1* y *GATA4 ZFPM2*) podría explicar la falta de desarrollo testicular normal en estos casos.

HIPÓTESIS

La presencia de SNPs funcionales en los genes *SF1*, *WT1*, *GATA4* y *ZFPM2* participa en la etiopatogenia de las disgenesias gonadales completas 46, XY alterando el desarrollo testicular en etapas tempranas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Identificar SNPs funcionales en genes que participan en el desarrollo gonadal (*SF1*, *WT1* y *GATA4* y fog 2) en pacientes con disgenesia gonadal completa 46 XY.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Secuenciar el gen *SRY* de los pacientes con *DGC*, para identificar probables mutaciones en dicho gen.
- Identificar los polimorfismos descritos en las regiones adyacentes 5´ de los genes *WT1*, *SF1*, *GATA4*.
- Determinar las frecuencias alélicas de los SNPs presentes en las regiones promotoras de los genes *WT1*, *SF1* y *GATA4* mediante el uso de sondas TaqMan con PCR tiempo real.
- Determinar las frecuencias alélicas de los SNPs presentes en UTR, intrones y exones de los genes *WT1*, *SF1* y *GATA4* mediante microarreglos de polimorfismos.
- Analizar los resultados obtenidos para identificar probables polimorfismos funcionales, en las regiones mencionadas y su correlación con la regulación transcripcional de dichos genes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Universo de estudio

Se incluyeron a 11 casos con diagnóstico de Disgenesia Gonadal Pura y cariotipo 46, XY (DG46XY)

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con diagnóstico de disgenesia gonadal completa con fenotipo femenino.
2. Presencia de estrías bilaterales fibrosas.
3. Cariotipo 46, XY.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con duplicación en el gen DAX 1 ó WNT-4.
2. Pacientes con presencia de tejido testicular
3. Pacientes que no deseen colaborar en el estudio.

Criterios de exclusión para el estudio de tipificación génica

1. Pacientes con disgenesia gonadal completa con mutación en el gen SRY.
2. Pacientes con duplicación en los genes DAX 1 o WNT-4.
3. Pacientes que no deseen colaborar en el estudio.

Descripción general del estudio

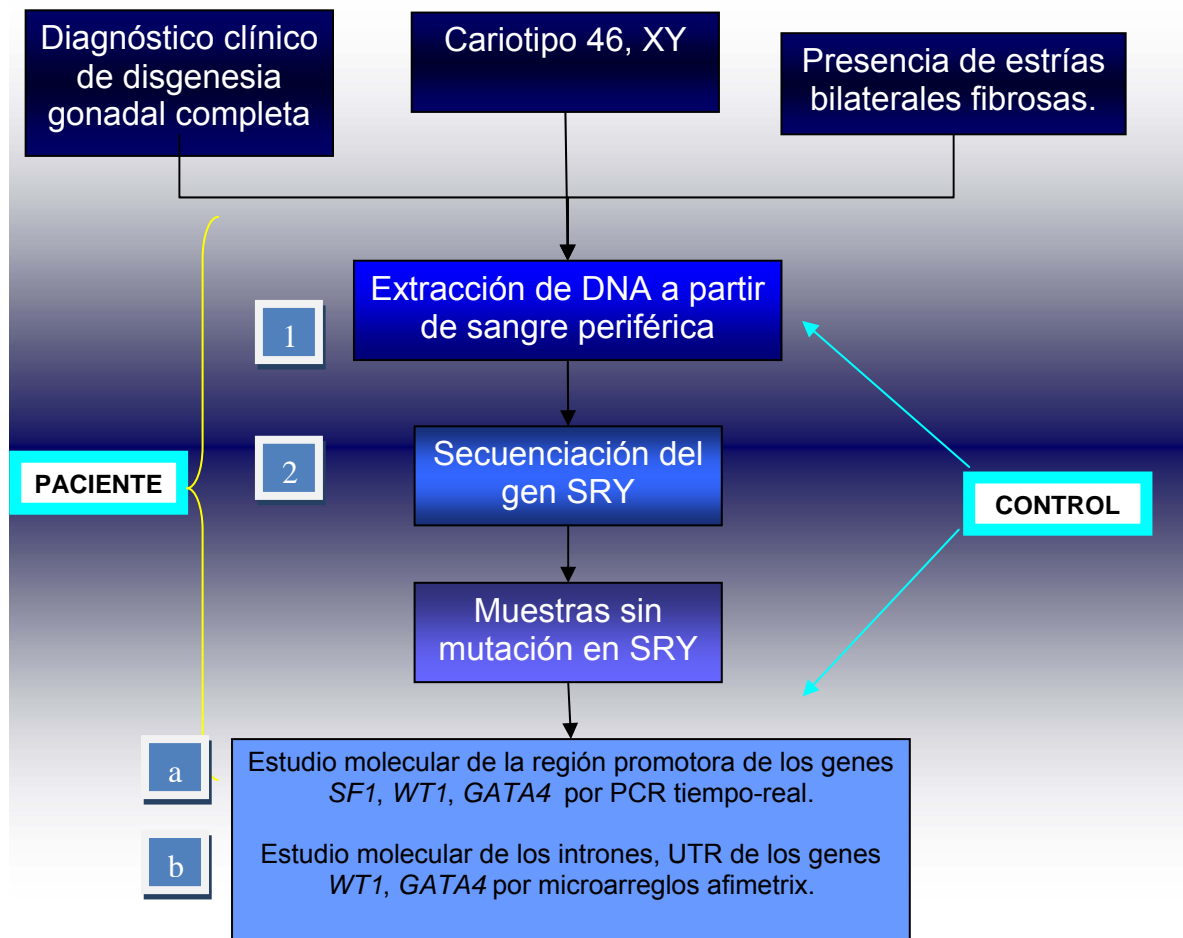


Figura 1. Esquema general del estudio.

1. Extracción de DNA

El DNA genómico, tanto de los pacientes como de los controles sanos, se obtuvo siguiendo la técnica de extracción por sales modificada y estandarizada en el laboratorio. Para lo cual se siguieron los pasos siguientes: se extrajeron 3 mL de sangre periférica de cada sujeto, se colocó en tubos vacutainer que contenían 0.05 ml de Na₂EDTA como anticoagulante. Con el fin de lisar los eritrocitos, la sangre se colocó en tubos cónicos y se mezcló con un volumen igual de buffer de lisis TTS (trisHCL/tritón X-100/sacarosa). La mezcla se homogenizó y se transfirió a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 1.5 minutos a una velocidad de 9,221g, posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 1 mL de TTS para centrifugar de nuevo en las mismas condiciones. Este último paso se repitió hasta obtener un botón libre de eritrocitos. El paquete de leucocitos se resuspendió en 570 µL de NaCl 50 mM y se adicionaron 50 µl de SDS al 10% con la finalidad de lisar las membranas leucocitarias. La mezcla se agitó por unos minutos y se agregaron 200 µl de NaCl₂ 5 M para precipitar las proteínas, se agitó nuevamente y se dejó en reposo. El botón de leucocitos se centrifugó a 9,221g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril. El DNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C, el precipitado 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 resuspendió en un volumen de 200 a 400 µl de agua estéril destilada y desionizada. Se obtuvieron alícuotas del DNA y se almacenaron a -20°C hasta que se utilizaron.

Análisis de la concentración, pureza y calidad del DNA

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

El grado de pureza se obtuvo mediante la relación de densidades ópticas obtenida con las lecturas 260/280 nm y se consideró como optima una relación 1.8-2.0.

Para determinar la calidad de las muestras se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio al 0.0002%.

2. ANÁLISIS MOLECULAR

Se amplificó y se obtuvo la secuencia del marco abierto del gen de *SRY* de los pacientes con disgenesia gonadal completa.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (**PCR**):

La amplificación del marco abierto de lectura se realizó por PCR utilizando un par de oligonucleótidos con las siguientes secuencias:

XES10- Sentido 5'GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG- 3'

XES11- Antisentido 5'GTA GCC AAT GTT ACC CGA TTG TC- 3'

Los oligonucleótidos se adquirieron en una casa comercial (GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES) y se pusieron a una concentración final de 100 mM.

El par de oligonucleotidos amplificó un producto de 820 pb del único exón de este gen. En todos los casos se preparó una reacción estándar de 50 µL, de acuerdo con las concentraciones descritas por Sambrook y *Cols.*,(1989). Esta contenía una concentración de DNA de entre 200 Y 400 ng, solución amortiguadora de amplificación 10X (Tris- HCl, KCl) a una concentración final 1 X, mezcla de los

cuatro desoxiribonucleotidos trifosfatados (dNTPs) a una concentración final de 100 μ M, oligonucleotidos iniciadores a concentraciones finales especificas 0.2 μ M, .51 U de Taq Gold[®] (Applied Biosystems, ROCHE), 1.5 de mM de MgCl₂ y agua destilada desionizada.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Gen Amp PCR System 9700 de Perkin Elmer). El programa de amplificación fue el siguiente:

94 ° C ----- 10 min.
94 ° C -----1 min. }
68 ° C -----1 min. } 30 ciclos
72 ° C-----2 min. }
72 ° C-----10 min.

Electroforesis

Los productos de amplificación de cada reacción se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % se tiñeron con bromuro de etidio al 0.0002 % en todos los casos se incluyo un marcador de tamaño molecular, un control positivo, y un control negativo que consistió en una reacción sin DNA. La reacción se realizó en una cámara de electroforesis y se utilizó como amortiguador buffer TAE 1X, con un voltaje aproximado de 90 voltios por 30 minutos.

Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR a partir del gel de agarosa se realizó por medio del *Kit* Marligen extracción rápida de DNA en gel.

Se cortó la banda del gel con el producto amplificado y se colocó en un tubo ependorf de 1.5 mL se pesó y se adicionaron 3 volúmenes de la solución L1.

Se incubó a 55 ° C por 15 minutos y se agitó por 3 min. Al término de la incubación se transfirió el producto a una columna y se centrifugó por 1 minuto a 9, 221 g.

Se eliminó el filtrado y se adicionaron 500 µL de la solución L1 se incubó por un minuto y se centrifugaron durante un minuto a 9, 221 g.

Posteriormente se agregó 700 µL del reactivo L2 y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 9, 221 g. por último, se le adicionaron 50 µL de la solución PE, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se recuperó al filtrado que se utilizó como templado.

Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR se realizó con un estuche para secuencia de DNA (BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit). El procedimiento se basa en el método de Sanger y Cols. Como cebadores para las reacciones de secuenciación se emplearon los mismos que para las amplificaciones pero a una concentración de 0,10mol/µl.

La Reacción de secuenciación contenía la siguiente mezcla de reactivos.

- 1-3 µl del producto de PCR purificado
- Terminator big Dye= 2 µl
- Primer (3,2 pmoles) = 1 µl
- H₂O hasta llevar la reacción a 6 µl

El programa utilizado fue el siguiente:

Programa de PCR de secuencia

96 ° C	1 minuto	
96 ° C	30 segundos	
50 ° C	15 segundos	25 ciclos
60 ° C	3 minutos	

PASO POR COLUMNA

Se realizó la purificación de los productos resultantes de la reacción de secuenciación, mediante las columnas de CENTRISEP, con la finalidad de eliminar los terminadores marcados que no se utilizaron en la reacción y así evitar el reflejo inespecífico de fluorescencia.

El kit de CENTRISEP contiene tres componentes:

- Tubos eppendorf: tubos de recolección de muestras. Capacidad de 1,5 mL.
- Tubos de lavado: largos cilíndricos acabados en un cono. Capacidad de 2 mL.
- Columnas CENTRISEP: tubos cónicos largos con capuchón en ambos extremos. Contienen el gel seco responsable de la purificación.

Para la preparación de las columnas, se agregaron 800 µl de agua destilada y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Se colocaron en tubos de 2 ml y se centrifugan a 3,000 rpm durante 3 minutos para eliminar el exceso de agua. La columna se colocó en tubos de 500 µl, y se agregó el producto de PCR (obtenido del paso anterior) sin tocar el sephadex y se centrifugó a 3,000 rpm por 3 minutos. Se procedió a secar el producto con desecador o ventilación y se resuspendió en 20 µl de TSR (Template Supresión Reagent).

Secuenciación automatizada

Para la secuenciación del producto de DNA secuencia específica, éste se desnaturalizó incubándose a 95 ° C por 5 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo.

El análisis de la secuencia se llevó a cabo empleando el secuenciador ABI 377 (ABI, Perkin-Elmer®), las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia extraída del GenBank.

Análisis de polimorfismos por PCR tiempo real

Los pacientes sin mutaciones en el gen SRY se incluyeron en el estudio de análisis de polimorfismos utilizando el sistema TaqMan (Tabla1).

Para determinar la frecuencia alélica de los polimorfismos de interés, se utilizaron 100 controles.

Tabla 4. Polimorfismos en estudio, presentes en las regiones promotoras de los genes SF1, GATA4 y WT1.

SF1		GATA4		WT1	
Polimorfismo	Posición	Polimorfismo	Posición	Polimorfismo	Posición
rs7869797	-473 C-A	rs7003677	-1437C-G	rs5030133	+107 C-T
rs7873345	-742 G-C	rs28505660	- 704G-A	rs2234580	- 51C-T
		rs28472428	-241G-C	rs2234579	- 299G-T

Se diseñaron sondas específicas mediante el sistema: Custom TaqMan SNP Genotyping Assay de Applied biosystems, Foster City, California, U.S.A.

El fragmento de amplificación dependió del diseño de la sonda y tuvo una longitud aproximada de 50 a 150 pb.

Cada caso se realizó por duplicado y cada reacción tuvo un volumen final de 10 µL y concentraciones estándar de: oligonucleotido sentido 900 nM, Oligonucleotido antisentido 900nM, sonda TaqMan MGB 500nM, dNTPs 100µM, enzima Taq Polimerasa GOLD 0.5 U, Amortiguador 1X.

Se utilizó el siguiente ciclado térmico:

Parámetro	UNG Incubation	Ampli Taq Gold Activación	PCR	
	HOLD	HOLD	Ciclado (40 ciclos)	
			Desnaturalización	Anneling/ Extensión
Temperatura	50 ° C	95 ° C	92 ° C	60 ° C
Tiempo	2 min.	10 min.	15 seg.	1 min.

Al final del ciclado térmico las reacciones se incubaron a 60 ° C durante 10 minutos. El análisis de los datos se realizó con en software ABI Prism 7000 SDS el cual registró la fluorescencia de cada muestra. En el siguiente cuadro se muestra un ejemplo de la interpretación de los resultados.

SNP	Alelo A / VIC	Alelo B / FAM	Genotipo
rs28505660	+	-	AA
	-	+	BB
	+	+	AB

Microarreglos

Se realizaron microarreglos de alta densidad de la marca Affimetrix, consta de una fase de digestión con las enzimas STY y NSP, una fase de ligación del adaptador seguida de una amplificación por PCR. Los productos de la reacción de PCR se purificaron y se obtuvieron fragmentos de tamaños menores a 150 pb, estos fragmentos de DNA se marcaron con un anticuerpo y se hibridaron en el chip por 18 horas; después se escanearon y analizaron.

Se obtuvieron los genotipos de 50 SNPs localizados en regiones intrónicas y adyacentes 5' y 3' del gen *GATA4*, 21 de *WT1* y 25 SNPs del gen *ZFPM2*. Los genotipos del grupo de pacientes se compararon inicialmente con un grupo control de la población mundial y posteriormente con 63 sujetos control de la población mexicana.

DNA

Se determinó la concentración del DNA genómico y se diluyó a una concentración de 50ng/μl con buffer (EDTA 0.1mM, Tris HCl 10 mM).

Digestión

Se digirieron 500ng de DNA genómico con cada una de las de las enzimas *NspI* o *STY*. Las concentraciones y condiciones utilizadas en la reacción se muestran en los cuadros siguientes:

Mezcla de reacción	
Reactivo (stock)	Volumen (μl)
Agua	49
NE Buffer2 (10x)	8
BSA(10x)	8
<i>NspI</i> (10U/μl) o <i>STY</i>	5
DNA	10
Volumen final	70

Termociclador	
Temperatura	Tiempo
37°C	120min
65°C	20min
4°C	Hold

Para verificar que el DNA se digirió, se corrieron en un gel de agarosa al 1%, 2 μl de DNA sin digerir (100ng) y 10 μl de DNA digerido (100ng)

Ligamiento

Los fragmentos de DNA se ligaron a una secuencia corta de nucleótidos con función de adaptador para el iniciador. Las concentraciones de la reacción y las condiciones en que se llevó a cabo se muestran a continuación.

Mezcla de reacción	
Reactivo (stock)	Volumen (μl)
Adaptador <i>NspI</i> (50 mM)	0.75
Buffer T4 DNA ligasa (10X)	2.5
T4 DNA ligasa (400U/ml)	2.0
DNA digerido	19.75
Volumen final	25.00

Termociclador	
Temperatura	Tiempo
16°C	180 min
70°C	20 min
4°C	hold

Al terminar la reacción de ligamiento se diluyeron 25μl de DNA ligado con 75 μl de agua grado biología molecular.

PCR

Se efectuaron tres reacciones de 100μl por cada muestra de DNA digerido con la enzima *STY* y 4 reacciones de 100μl por cada muestra de DNA digerido con la enzima *NSPI*. Se muestran las concentraciones y condiciones de la reacción en los siguientes cuadros.

Mezcla de reacción	Volumen
Reactivo (stock)	(μ l)
Agua	39.5
TITANIUM Taq PCR Buffer (10X)	10
G-C melt (5M)	20
dNTP (2.5mM) mix	14
Primer 002 (100uM)	4.5
TITANIUM Taq DNA polimerasa (50X)	2
Reacción de ligamiento	10
DNA de la reacción de ligamiento	10
Volumen final	100

Ciclaje		
ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3 min
30	94°C	30 seg
	60°C	45 seg
	68°C	15 seg
1	68°C	7 min
	4°C	hold

Se corrieron 3 μ l de cada PCR en un gel de agarosa al 1% para observar productos de 250 a 1100 pb.

Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron con el kit minielute 96 de Quiagen. Se mezclaron las reacciones digeridas: tres con la enzima STY y las cuatro reacciones digeridas con la enzima NSP I, se colocaron en un solo pozo y se filtraron al vacío, hasta que el pozo quedó completamente seco. Se realizó un lavado con etanol al 70 % grado biología molecular. Se resuspendió con 45 μ l de buffer EB y se agitó la placa por 15 minutos a temperatura ambiente. La muestra se transfirió a un tubo estéril.

FRAGMENTACIÓN

El producto de PCR purificado se diluyó en 5 μ l de buffer de fragmentación (mezcla de fragmentación), posteriormente se preparó la mezcla de reacción con las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción	Volumen
Reactivo (stock)	2U/ μ l
Agua	106
Buffer de fragmentación 10X	12
Reactivo de fragmentación	2

TERMOCICLADOR	
Temperatura	Tiempo
37°C	35 min
95°C	15 min
4°C	Hold

Se mezclaron los 50 μ l de la reacción de fragmentación y 5 μ l de la mezcla de reacción, conservada en hielo.

Se incubó en las condiciones adecuadas y se corrieron 3 μ l de la muestra fragmentada en un gel de agarosa al 2% para observar fragmentos menores a 180 pb. Inmediatamente después se procedió a hacer el marcado del DNA.

Marcado del DNA

Los fragmentos obtenidos en la reacción anterior se marcaron agregando 19.5µl de la siguiente mezcla:

Mezcla de reacción	Volumen
Reactivo stock	(µl)
Buffer 5X TdT	14
Gene Chip DNA labeling reagent	2
Enzima TdT (30U/µl)	3.5
Volumen final	19.5

TERMOCICLADOR	
Temperatura	Tiempo
37°C	4 horas
95°C	15 min
4°C	hold

Hibridación

La mezcla de hibridación se preparó con los siguientes reactivos:

MEZCLA DE HIBRIDACIÓN

Reactivo	1x (µl)
MES (12X, 1.22M)	12
Denhart's sol (50X)	13
EDTA (0.5M)	3
HSDNA (10mg/ml)	3
OCR. 0100	2
Human Cot-1 DNA (1mg/ml)	3
Tween-20 (3%)	1
DMSO (100%)	13
TMACL	140
Volumen total	190

Se agregaron 190µl de la mezcla de hibridación más 70µl de la muestra marcada. Se incubaron a 95°C durante 10 min y se mantuvieron a 49°C, después se inyectaron 200µl al GeneChip 500K Affymetrix. Este último se incubó de 16 a 18 horas a 49°C agitando a 60rpm.

Lavado, teñido y escaneo

Al terminar el tiempo de hibridación (16 a 18 horas) se quitó la mezcla de hibridación y se llenó el Gene Chip con 260µl de Buffer de mantenimiento.

Buffer de mantenimiento

Reactivo	Volumen (μl)
Agua	73.1
Buffer MES 12X	8.3
NaCl 5M	18.5
Tween-20 10%	0.1
Volumen final	100ml

Se colocó el chip en la estación de fluidos “GeneChip Fluidics Station 450 de Affymetrix”.

ESCANEO

El proceso de escaneo se realizó en un Scanner 3000 7G.

Se analizaron 50 SNPs presentes en el gen *GATA4*, su ubicación y variantes alélicas se describen en la tabla 4, también se estudiaron 21 polimorfismos del gen *WT1* (tabla 5) y 25 polimorfismos del gen *ZFPM2* (Tabla 6).

Tabla 5. SNPs presentes en intrones y en las regiones no traducidas 3’ del gen *GATA4*.

		GATA 4				
Cromosoma	posición	Banda	dbSNP ID	Distancia	Alelo A	Alelo B
8	11476422	p23.1	rs2409800	Distancia:122740	C	G
8	11480745	p23.1	rs4841568	Distancia:118377	G	T
8	11488146	p23.1	rs12677146	Distancia:111016	C	G
8	11495681	p23.1	rs17153509	Distancia:103441	A	G
8	11495752	p23.1	rs2254797	Distancia:103410	A	G
8	11495911	p23.1	rs1079326	Distancia:103251	C	T
8	11496900	p23.1	rs2467517	Distancia:102262	A	G
8	11497721	p23.1	rs2264865	Distancia:101401	C	T
8	11500424	p23.1	rs17807624	Distancia:98738	A	G
8	11500453	p23.1	rs17153516	Distancia:98669	C	T
8	11500639	p23.1	rs4840573	Distancia:98523	A	G
8	11507031	p23.1	rs10106995	Distancia:92091	A	G
8	11507869	p23.1	rs2250562	Distancia:91253	A	C
8	11507982	p23.1	rs2250556	Distancia:91180	C	T
8	11518662	p23.1	rs2246521	Distancia:80500	A	C
8	11519090	p23.1	rs10107540	Distancia:80072	C	G
8	11527303	p23.1	rs17153551	Distancia:71859	G	T
8	11534867	p23.1	rs2253061	Distancia:64255	C	T
8	11541388	p23.1	rs1564265	Distancia:57774	A	G
8	11548680	p23.1	rs2618472	Distancia:50482	C	T

8	11551480	p23.1	rs2248334	Distancia:47682	A	G
8	11566690	p23.1	rs10216815	Distancia:32432	A	G
8	11575198	p23.1	rs10086192	Distancia:23964	C	T
8	11578133	p23.1	rs11784455	Distancia:20989	A	T
8	11579106	p23.1	rs11784691	Distancia:20056	A	G
8	11584559	p23.1	rs2409809	Distancia:14563	A	G
8	11585029	p23.1	rs2898293	Distancia:14133	A	G
8	11585199	p23.1	rs2409810	Distancia:13923	C	G
8	11585380	p23.1	rs2409811	Distancia:13923	G	T
8	11599475	p23.1	rs11987373	Distancia:13923	A	G
8	11602496	p23.1	rs10088151	Distancia:intrón	A	C
8	11610054	p23.1	rs2409812	Distancia:intrón	C	G
8	11617363	p23.1	rs12550668	Distancia:intrón	C	T
8	11617645	p23.1	rs2409808	Distancia:intrón	A	G
8	11617923	p23.1	rs11994925	Distancia:intrón	A	G
8	11618316	p23.1	rs9329247	Distancia:intrón	C	T
8	11618857	p23.1	rs2409807	Distancia:intrón	A	G
8	11621250	p23.1	rs10086064	Distancia:intrón	A	G
8	11626792	p23.1	rs10503426	Distancia:intrón	A	C
8	11628545	p23.1	rs6983129	Distancia:intrón	A	C
8	11632379	p23.1	rs12541318	Distancia:intrón	G	T
8	11633846	p23.1	rs11250163	Distancia:intrón	G	T
8	11636092	p23.1	rs11988920	Distancia:intrón	G	T
8	11646314	p23.1	rs2740434	Distancia:intrón	C	T
8	11646578	p23.1	rs2645399	Distancia:intrón	C	T
8	11647124	p23.1	rs17153743	Distancia:intrón	C	T
8	11648095	p23.1	rs11250164	Distancia:intrón	C	T
8	11649688	p23.1	rs13262643	Distancia:intrón	C	G
8	11649724	p23.1	rs13264774	Distancia:intrón	C	T
8	11650107	p23.1	rs804280	Distancia:intrón	G	T

Tabla 6. SNPs presentes en intrones y en las regiones no traducidas 3' y 5' del gen *WT1*.

<i>WT1</i>						
CROMOSOMA	Posición	banda	dbSNP ID	Distancia	Alelo A	Alelo B
11	32366913	p13	rs5030317	Distancia:3UTR	C	G
11	32366956	p13	rs5030316	Distancia:3UTR	A	G
11	32367092	p13	rs5030315	Distancia:3UTR	A	G
11	32367676	p13	rs5030311	Distancia:intrón	A	G
11	32367816	p13	rs5030310	Distancia:intrón	A	T
11	32373451	p13	rs5030281	Distancia:intrón	C	T
11	32374008	p13	rs5030280	Distancia:intrón	A	G
11	32374245	p13	rs5030277	Distancia:intrón	A	T
11	32383280	p13	rs10767935	Distancia:intrón	C	T
11	32384608	p13	rs3858441	Distancia:intrón	A	C
11	32392105	p13	rs2900740	Distancia:intrón	C	T
11	32394253	p13	rs2295082	Distancia:intrón	C	G
11	32394275	p13	rs3858444	Distancia:intrón	A	G
11	32403923	p13	rs7110547	Distancia:intrón	C	G
11	32409501	p13	rs10742277	Distancia:intrón	C	G
11	32410198	p13	rs7936152	Distancia:intrón	A	G
11	32410838	p13	rs11031781	Distancia:intrón	C	T
11	32412103	p13	rs3930513	Distancia:intrón	G	T
11	32412429	p13	rs5030141	Distancia:intrón	G	T
11	32415200	p13	rs5030118	Distancia:851	C	T
11	32415383	p13	rs3809060	Distancia:1720	A	C

Tabla 7. SNPs presentes en regiones intrónicas y en regiones no traducidas 3' y 5' del gen ZFPM2.

ZFPM2					
Cromosoma	posición	Banda	Genotipo	Alelo A	Alelo B
1	rs16873557	8q23	GG	A	G
2	rs7003141	8q23	AA	A	G
3	rs7003445	8q23	GG	A	G
4	rs16873564	8q23	GG	A	G
5	rs7823563	8q23	GG	A	G
6	rs9643020	8q23	TT	C	T
7	rs3779776	8q23	GG	A	G
8	rs1025856	8q23	CC	C	T
9	rs11995327	8q23	AA	A	C
10	rs17220879	8q23	GG	C	G
11	rs17220900	8q23	GG	C	G
12	rs12547056	8q23	AA	A	C
13	rs1578995	8q23	CC	C	G
14	rs1442326	8q23	CC	C	T
15	rs12546300	8q23	GG	A	G
16	rs2958709	8q23	CC	C	T
17	rs2958710	8q23	GG	G	T
18	rs6469014	8q23	TT	C	T
19	rs6469015	8q23	AA	A	G
20	rs16873677	8q23	GG	A	G
21	rs7834726	8q23	AA	A	G
22	rs16873702	8q23	GG	A	G
23	rs16873707	8q23	GG	G	T
24	rs11986654	8q23	AA	A	C
25	rs7007909	8q23	TT	C	T

RESULTADOS

Análisis del marco abierto de lectura del gen SRY.

Se secuenció el marco abierto de lectura del gen SRY, en dos de los 11 pacientes con DGC (18%) y se observaron alteraciones en dicho gen. El primer caso presentó una sustitución de guanina (G) por adenina(A) lo que originó el cambio del Trp70 por un codón de paro, esta mutación se había reportado previamente (figura 2).

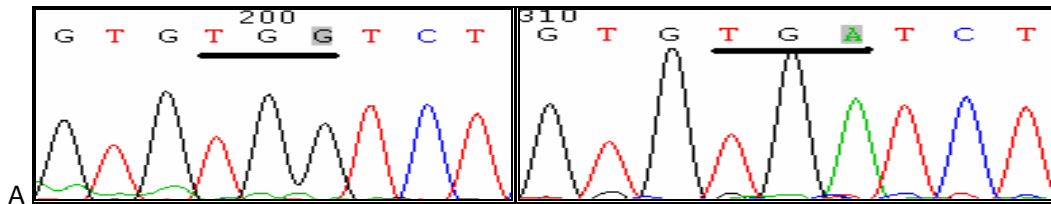


Figura 2. Electroferograma de parte de la secuencia del gen SRY en paciente con DGC 1. El electroferograma marca al triplete 70 en secuencia del gen SRY, que codifica para un triptofano. Se muestra una sustitución de G por A en la tercera base del triplete, lo que origina un codón de paro. *Sustitución en el aminoácido Try70X*

En el segundo caso hubo una sustitución de G por T, que provocó un cambio de la arginina 75 por serina, esta mutación no se ha reportado previamente. (Figura 3).

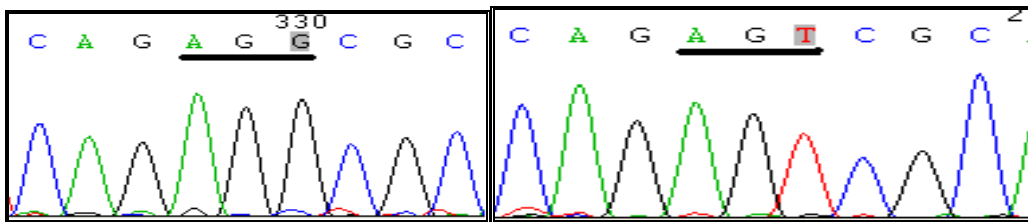


Figura 3. Electroferograma de parte de la secuencia del gen SRY en paciente con DGC 2. El electroferograma marca al triplete 75 en secuencia del gen SRY, que codifica para arginina. Se muestra una sustitución de G por T en la tercera base del triplete, lo que origina un codón que codifica para serina. *Sustitución del aminoácido Arg75Ser.*

Tipificación del genotipo de los SNPs, presentes en las regiones promotoras de los genes *GATA4*, *SF1* y *WT1* por PCR en tiempo real.

Se analizaron 9 casos de *DGC* sin mutación en *SRY*, en estos pacientes se descartaron alteraciones en el número de copias de genes, como las descritas previamente en anomalías del desarrollo testicular presentes en individuos 46,XY. Se descartaron duplicaciones de los genes *DAX 1* y *WNT4*.

GATA4

La genotipificación de genotipos de los SNPs (-1437C-G, -704C-G, -241 A-G), presentes en la región promotora del gen *GATA4* se comparó con una muestra de 100 controles mexicanos representativos del Valle de México y se confirmó que, de ésta población, las proporciones de los genotipos están en equilibrio de Hardy-Weinberg; los valores de probabilidad se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Probabilidades de las frecuencias alélicas, observadas y esperadas, de los polimorfismos -1437C-G, -704C-G, -241 A-G del gen *GATA4*.

1 <i>GATA4</i> -1437 C-G			2 <i>GATA4</i> - 704 C-G			3 <i>GATA4</i> -241 A-G		
Obs	Esp	(O-E)2/E	Obs	Esp	(O-E)2/E	Obs	Esp	(O-E)2/E
CC	2	0	0	0	0	100	100	0
CG	23	17	2.11	0	0	1	1	0
GG	74	82	0.78	100	100	0	0	0
		X2 2.89			X2 =0			X2 0
		P>0.05			P>>0.04			P>>0.04

La distribución de frecuencias de los genotipos para el polimorfismo -1437C-G, es similar a las reportadas para otras poblaciones, en tanto que para los polimorfismos -704C-G y -241A-G no existen reportes de las frecuencias de los genotipos en otros grupos de individuos.

El examen de la distribución de frecuencias para los tres polimorfismos pone de manifiesto que no existe diferencia significativa entre los casos y los controles (-1437C-G $X^2= 1.1036$ $P>0.4$, -704C-G $X^2=2.341$ $P>.25$, -742C-G $X^2= 0$ NS, -241 A-G $X^2= 2.53339$ $P>0.25$). Tabla 9.

Tabla 9. Distribución de los genotipos presentes en la región del promotor en el gen *GATA4*.

GATA4 -1437C-G*		GATA4 -704C-G		GATA4 -241 A-G	
CASOS	CONTROL	CASOS	CONTROL	CASOS	CONTROL
CC 0	CC 0	GG 0	GG 0	GG 8	GG 101
CG 1	CG 17	CG 1	CG 0	AG 1	AG 0
GG 8	GG 82	CC 8	CC 100	AA 0	AA 0
	$X^2= 1.1036$		$X^2=2.341$		$X^2= 2.53339$
	$P>0.4$		$P>0.25$		$P>0.25$

SF1

El estudio de tipificación génica de los SNPs (-473 C-G, -742 A-C) presentes en la región promotora del gen *SF1* se comparó con una muestra de 100 controles mexicanos representativos del Valle de México; se confirmó que, para el polimorfismo -473C-G de la región promotora del gen, la proporción de genotipos está en equilibrio de Hardy-Weinberg. El polimorfismo -473 A-C no se ajustó al equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=100$, $P<<.001$) y se descartó del estudio.

Los valores de probabilidad se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Probabilidades de las frecuencias alélicas observadas y esperadas de los polimorfismos -473 C-G, -742 A-C del gen *WT1*

1SF1 -473 A-C			2SF1 -742 C-G		
Obs	Esp	(O-E)2/E	Obs	Esp	(O-E)2/E
AA	0	25	GG	102	0
AC	100	50	GC	0	0
CC	0	25	CC	0	0
		100			0
*		$P<<.001$			$P>>.04$

La distribución de frecuencias de los genotipos para el polimorfismo -742C-G, es similar a la reportada en otras poblaciones, en tanto que para el polimorfismo -473 A-C no se han informado las frecuencias de la variante alélica en otras poblaciones.

El examen de la distribución de frecuencias para los 2 polimorfismos en estudio pone de manifiesto que no existe diferencia significativa entre los casos y controles (tabla 11).

Tabla 11. Distribución de los genotipos presentes en la región promotora del gen *SF1*.

SF1 -274 C-G		SF1 -473 A-C	
CASOS	CONTROL	CASOS	CONTROL
GG 9	GG 102	CC 0	CC 0
CG 0	CG 0	CA 9	CA 100
CC 0	CC 0	AA 0	AA 0

WT1

El estudio de tipificación génica de los SNPs (**WT1** +107 C-T, **WT1** -51 C-T, **WT1** -299 G-T) presentes en la región promotora del gen **WT1** se comparó con una muestra de 100 controles mexicanos representativos del Valle de México. Los polimorfismos se evaluaron en la población control y se confirmó que la proporción de genotipos para los tres polimorfismos está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El análisis de la distribución de frecuencias para los polimorfismos **WT1** +107 C-T, **WT1** -299 G-T mostró que la población de los casos y los controles se comporta de manera similar, en la que no observamos la variante polimórfica T. El polimorfismo **WT1** -51 C-T se analizó por medio de la prueba estadística χ^2 cy , este estudio mostró que no existe diferencia significativa entre los casos y los controles para este polimorfismo ($\chi^2=1.45$, $P>0.4$, tabla 12).

Tabla 12. Distribución de los genotipos presentes en la región promotora del gen **WT1**.

WT1 +107 C-T		WT1 -51 C-T **		WT1 -299 G-T	
CASOS	CONTROL	CASOS	CONTROL	CASOS	CONTROL
CC 9	CC 105	CC 1	CC 33	GG 9	GG 105
CT 0	CT 0	CT 7	CT 51	GT 0	GT 0
TT 0	CC 0	TT 1	TT 21	TT 0	TT 0

, ** $\chi^2=1.45$, $P>0.4$

Estudio de Microarreglos

Se analizaron las frecuencias génicas de otros polimorfismos que se localizan en un microarreglos de SNPs para los genes de interés. El análisis de los polimorfismos, presentes en las secuencias génicas de interés, se realizó por medio de microarreglos de alta densidad Afimetrix. Se analizaron los genotipos de 50 SNPs presentes en intrones, regiones adyacentes 3' y 5' del gen *GATA4*, 21 SNPs presentes en el gen *WT1* y 25 polimorfismos en el gen *ZFPM2*.

El estudio de la distribución de frecuencias de los genotipos de los pacientes se comparó con las frecuencias alélicas de la población mundial por medio de una F Fisher exacta. Se encontraron diferencias significativas en los polimorfismos rs7110547, rs10742277, rs3930513 y rs3809060 del gen *WT1*. Posteriormente, las frecuencias alélicas de los casos se compararon con un grupo control de la población mexicana, mediante la prueba estadística de F Fisher exacta, no se encontró diferencia significativa entre casos y controles en ninguno de los SNPs (tabla 13).

Tabla 13. Análisis estadístico, de los SNPs del gen WT1 presentes en los casos y los controles, con la prueba F Fisher exacta.

—	dbSNP ID	Alelo	Alelo	Controles mexicanos			Casos			F Fisher
		A	B	AA	AB	BB	AA	AB	BB	
1	rs5030317	C	G	14	36	10	2	5	1	1
2	rs5030316	A	G	54	9	0	8	0	0	1
3	rs5030315	A	G	48	14	0	8	0	0	1
4	rs5030311	A	G	1	10	52	0	0	8	0.180
5	rs5030310	A	T	17	20	17	3	4	1	0.705
6	rs5030281	C	T	22	32	9	3	4	1	1
7	rs5030280	A	G	23	31	9	2	3	2	1
8	rs5030277	A	T	23	30	10	2	5	1	0.704
9	rs10767935	C	T	20	27	12	3	4	1	1
10	rs3858441	A	C	19	23	16	3	3	1	0.666
11	rs2900740	C	T	60	2	1	7	0	0	1
12	rs2295082	C	G	11	35	16	1	3	4	0.213
13	rs3858444	A	G	1	10	52	0	3	5	0.186
14	rs7110547	C	G	8	41	14	1	7	0	0.342
15	rs10742277	C	G	19	36	8	0	7	1	0.099
16	rs7936152	A	G	1	14	48	0	2	6	1
17	rs11031781	C	T	48	13	1	6	2	0	1
18	rs3930513	G	T	7	32	19	1	7	0	0.093
19	rs5030141	G	T	20	33	9	3	5	0	0.712
20	rs5030118	C	T	61	0	2	8	0	0	1
21	rs3809060	A	C	13	41	8	0	7	1	0.336

GATA4

Se compararon, la distribución de frecuencias de los pacientes con las frecuencias alélicas de la población mundial por medio de la prueba F Fisher exacta. Se encontró diferencia significativa en los polimorfismos rs12677146, rs17807624, rs17153551, rs2253061, rs10086192, rs2409809, rs2898293, rs2409810, rs2409811, rs2409808 y rs9329247 del gen GATA4. Posteriormente las frecuencias alélicas de los casos se compararon con un grupo control de la población mexicana mediante la prueba estadística de F Fisher exacta y se encontró diferencia significativa entre casos y controles sólo para el SNP rs2409811 (tabla 14).

Tabla 14. Análisis estadístico de los SNPs del gen GATA4 presentes en los casos y los controles, con la prueba F Fisher exacta.

	dbSNP ID	Alelo A	Alelo B	Controles mexicanos			Casos		
				AA	AB	BB	AA	AB	BB
1	rs2409800	C	G	7	29	27	0	4	4
2	rs4841568	G	T	0	3	59	0	0	8
3	rs12677146	C	G	24	36	2	5	2	0
4	rs17153509	A	G	40	15	4	8	0	0
5	rs2254797	A	G	56	5	1	8	0	0
6	rs1079326	C	T	0	11	52	0	0	8
7	rs2467517	A	G	3	7	51	0	0	8
8	rs2264865	C	T	0	0	0	0	0	8
9	rs17807624	A	G	28	29	3	5	3	0
10	rs17153516	C	T	56	3	3	8	0	0
11	rs4840573	A	G	1	18	40	0	1	7
12	rs10106995	A	G	6	8	49	0	0	8
13	rs2250562	A	C	0	11	52	0	2	6
14	rs2250556	C	T	10	15	33	0	2	6
15	rs2246521	A	C	7	10	46	0	0	8
16	rs10107540	C	G	50	10	1	4	3	0
17	rs17153551	G	T	13	20	29	1	5	2
18	rs2253061	C	T	10	32	20	1	4	1
19	rs1564265	A	G	0	0	0	6	1	0
20	rs2618472	C	T	5	10	47	0	0	8
21	rs2248334	A	G	0	0	0	2	6	0
22	rs10216815	A	G	0	0	0	8	0	0
23	rs10086192	C	T	10	35	15	0	6	2
24	rs11784455	A	T	19	26	16	3	4	0
25	rs11784691	A	G	48	12	2	8	0	0
26	rs2409809	A	G	15	23	24	0	7	1
27	rs2898293	A	G	9	21	30	0	7	1

28	rs2409810	C	G	21	24	16	1	7	0	
29	rs2409811	G	T	10	31	22	3	5	0	0.049
30	rs11987373	A	G	0	0	0	0	0	8	
31	rs10088151	A	C	3	10	47	0	0	8	
32	rs2409812	C	G	50	2	10	8	0	0	
33	rs12550668	C	T	14	22	27	0	4	4	
34	rs2409808	A	G	7	24	30	0	6	2	
35	rs11994925	A	G	0	0	0	0	0	8	
36	rs9329247	C	T	0	0	0	2	6	0	
37	rs2409807	A	G	27	18	16	2	6	0	
38	rs10086064	A	G	21	24	14	2	6	0	
39	rs10503426	A	C	11	18	34	0	3	5	
40	rs6983129	A	C	11	21	30	0	4	4	
41	rs12541318	G	T	42	13	6	5	3	0	
42	rs11250163	G	T	9	18	33	0	4	4	
43	rs11988920	G	T	55	7	0	8	0	0	
44	rs2740434	C	T	37	22	4	4	3	1	
45	rs2645399	C	T	30	22	8	3	3	1	
46	rs17153743	C	T	0	5	56	0	0	8	
47	rs11250164	C	T	43	14	4	2	3	0	
48	rs13262643	C	G	8	22	31	0	2	6	
49	rs13264774	C	T	0	0	0	5	2	0	
50	rs804280	G	T	10	20	33	0	2	4	

ZFPM2

El estudio de la distribución de las frecuencias alélicas de los pacientes se compararon con las frecuencias alélicas de la población del Valle de México por medio de la prueba estadística F Fisher exacta y se encontraron diferencias significativas entre los casos y los controles en los SNPs rs9643020, rs1442326 y rs6469015 (tabla 15).

Tabla 15. Análisis estadístico de los SNPs del gen ZFPM2 presentes en los casos y los controles, con la prueba F Fisher exacta.

—	dbSNP ID	Alelo	Alelo	Controles mexicanos			Casos			F fisher
		A	B	AA	AB	BB	AA	AB	BB	
1	rs16873557	A	G	0	10	52	0	0	8	0.591
2	rs7003141	A	G	47	15	1	5	2	1	0.434
3	rs7003445	A	G	23	31	6	3	4	1	1
4	rs16873564	A	G	0	0	0	1	3	3	-
5	rs7823563	A	G	14	36	12	2	4	2	0.656
6	rs9643020	C	T	26	32	4	6	2	0	0.02 D/S
7	rs3779776	A	G	28	27	5	6	2	0	1
8	rs1025856	C	T	9	32	21	1	5	1	1
9	rs11995327	A	C	36	12	1	8	0	0	0.77
10	rs17220879	C	G	1	17	36	0	0	7	0.93
11	rs17220900	C	G	0	5	58	0	2	6	0.175
12	rs12547056	A	C	6	35	21	2	4	2	0.225
13	rs1578995	C	G	14	31	18	2	4	2	1
14	rs1442326	C	T	9	34	20	4	1	2	0.019
15	rs12546300	A	G	17	34	11	2	4	2	0.636
16	rs2958709	C	T	49	14	0	6	2	0	1
17	rs2958710	G	T	19	31	13	3	3	2	0.696
18	rs6469014	C	T	15	29	9	5	3	0	0.591
19	rs6469015	A	G	12	34	15	0	3	5	0.040
20	rs16873677	A	G	0	7	56	0	0	8	1
21	rs7834726	A	G	60	2	1	6	0	0	1
22	rs16873702	A	G	0	0	0	0	1	6	-
23	rs16873707	G	T	47	12	2	8	0	0	0.193
24	rs11986654	A	C	47	14	1	8	0	0	0.187
25	rs7007909	C	T	0	10	53	0	0	8	0.590

P≤0.05

En el gen *GATA4* se identificó un SNP que difiere significativamente entre los casos y los controles, asimismo, en tres SNPs en el gen *ZFPM2*. Ninguno de los cuatro SNPs se habían relacionado antes con ninguna patología (Tabla 16).

Tabla 16. SNPs con diferencia estadística significativa entre controles mexicanos y pacientes con disgenesias gonadales completas.

Gen	ID	Posición en el gen	Genotipos DGC	Genotipo de la población mexicana	Genotipo de la población mundial	Asociación Clínica
GATA4	rs2409811	Intrón 10	GG(0.375) GT (0.625) TT (0.0)	GG(0.158) GT (0.49) TT (0.34)	GG(0.091) GT (0.500) TT (0.409)	NO
ZFPM2	rs9643020	Intrón 5	CC (0.75) CT (0.25) TT(0.00)	CC (0.42) CT (0.52) TT(0.06)	CC (0.800) CT(0.0.183) TT(0. 017)	NO
ZFPM2	rs1442326	Intrón 5	CC (0.57) CT (0.14) TT(0.28)	CC (0.14) CT (0.54) TT(0.32)	CC (0.117) CT (0.400) TT(0.483)	NO
ZFPM2	rs6469015	Intrón 5	AA (0.0) AG (0.37) GG (0.63)	AA (0.20) AG (0.55) GG (0.25)	AA (0.042) AG (0.458) GG (0.500)	NO

DISCUSIÓN

Los eventos celulares que dirigen la formación de la gónada indiferenciada hacia un testículo funcional en el humano dependen de la expresión correcta en lugar y tiempo del gen determinante testicular *SRY*. El gen *SRY* se describió en 1990, actúa sobre las células del epitelio celómico e inicia la proliferación celular para que se formen los testículos, en humanos la expresión de *SRY* comienza entre los días 41 y 44 post ovulación, con un pico de expresión a los 44 dpo, momento en el que se inicia la formación de los cordones testiculares. Cualquier modificación en la expresión génica conducirá a alteraciones en el desarrollo testicular. Las disgenesias gonadales completas 46,XY presentan estrías bilaterales, cariotipo 46 XY y fenotipo femenino, constituyen una patología poco frecuente y sólo entre el 15 y el 20 % de los casos se han descrito mutaciones en el gen determinante testicular *SRY*. En el presente estudio dos de los 11 pacientes (18%) presentaron mutaciones en gen *SRY*, este porcentaje es similar al que reportan en la literatura. Uno de los pacientes presentó una sustitución de G por A lo que originó el cambio del triptófano 70 por un codón de paro, esta mutación se había hallado previamente; una segunda paciente presentó una sustitución de guanina por timina lo que provocó un cambio de arginina 75 por serina, la mutación no se ha descrito en la literatura. Ambas mutaciones se encuentran en el dominio central (caja HGM), esta región es altamente conservada entre las diferentes especies y entre los diferentes miembros de la familia de genes *SOX*. El cambio ocasiona pérdida de función. En el otro 80% aún no se conoce la causa por la cual no se da la determinación testicular. Por lo que se ha sugerido que otros genes no descritos o genes modificadores que actúan antes de la expresión de *SRY* juegan un papel importante en la expresión correcta, tanto en tiempo, como en los umbrales adecuados para el gen determinante testicular.

La determinación testicular es un proceso sensible a dosis, que requiere los niveles correctos de los genes implicados en las líneas celulares adecuadas por lo que cualquier cambio conduce a alteraciones en el desarrollo. En el modelo murino se determinó que la expresión de SRY por debajo de los umbrales adecuados o fuera de la ventana de expresión normal produce alteraciones en el desarrollo testicular por lo que se propone que la que la relación espacio- tiempo-cantidad es importante para el desarrollo testicular (Washburn, L. L. y Cols. 2001 Sekido, 2004).

Utilizando el modelo de ratón se han realizaron trabajos que describen genes importantes sensibles a dosis que participan en la expresión de SRY entre ellos está el gen *WT1* propuesto como un gen que promueve la transcripción de SRY. El grupo de Hammes y Cols. (2001) demostraron que alteraciones en *WT1* conducen a la disminución en los niveles de expresión de SRY. En otras especies de mamíferos (el cerdo y el ratón entre ellas), se identificó que el gen *GATA4* junto con su cofactor ZFPM2 interactúan sobre el promotor de SRY, mutaciones de *GATA4* en los dominios de unión a ZPFM2 originan anomalías en el desarrollo testicular, a nivel molecular aparentemente se debe a una disminución en los niveles de SRY y *sox9* (Tevosian y cols, 2002; Manuylov, y cols 2007).

Sf1 es otro gen en el que se han descrito mutaciones que conducen a reversión sexual 46, XY, y se ha sugerido que la dosis en la expresión de genes que actúan “rio a arriba” de SRY son indispensables para el desarrollo normal del testículo. Con todos estos antecedentes en el presente trabajo de tesis se estudiaron los SNPs presentes en las regiones promotoras de los genes *Sf1*, *GATA4* y *Wt1*. El estudio de SNPs de las regiones promotoras de los genes *Wt1*, *GATA4* y *Sf1* mediante PCR tiempo real es el primer trabajo a nivel internacional que se realiza para tratar de correlacionar las disgenesias gonadales completas con variantes polimórficas. Los resultados permitieron determinar las frecuencias alélicas de controles mexicanos y se determinó que son similares a las de otras poblaciones. Nuestros resultados muestran también que los genotipos de

los polimorfismos en estudio en las DGC no muestran diferencias respecto a los controles por lo que se puede concluir que los SNPs analizados, en los promotores de los genes, no se relacionan con la reversión sexual o que la muestra es pequeña para poder ver alguna diferencia.

Los resultados obtenidos en la tipificación génica de los SNPs en las regiones promotoras no arrojaron resultados estadísticamente significativos. Se estudiaron las regiones promotores aunque no se puede descartar que algún SNP que se localice fuera del promotor, (regiones intrónicas o en regiones adyacentes 5' o 3' del gen de distancias de hasta 10 Kb) pudiera estar involucrado en la patología; además que en los modelos murinos se sugiere que la presencia de polimorfismos funcionales de genes claves en el desarrollo testicular podría participar en la etiopatogenia de la disgenesia testicular. Por lo tanto todos los SNPs localizados en el marco abierto de lectura y regiones adyacentes de los genes *WT1* y *GATA 4* y *ZFPM2* se analizaron mediante la técnica de microarreglo (500K SNParray de Affymetrix). Las frecuencias alélicas de los SNPs obtenidas con microarreglos se compararon inicialmente con un grupo de 48 sujetos pertenecientes al Hap Map Internacional y se utilizó la prueba estadística de F exacta de Fisher. Se encontró diferencia significativa en los polimorfismos rs7110547, rs10742277, rs3930513 y rs3809060 del gen *WT1* (tabla 5). Debido a la importancia que tiene el análisis de los resultados con una muestra control adecuada, se realizó la tipificación génica con individuos representativos del Valle de México, se encontró que todas las variantes con diferencia estadística significativa en el gen *WT1*, que se compararon con la población mundial, no presentaron diferencia en ninguno de los polimorfismos. El papel del gen *WT1* en la diferenciación sexual es fundamental y necesario para que la expresión se dé en los niveles y en el momento adecuado, en este trabajo se estudiaron 21 SNPs presentes en intrones y regiones no traducidas 5' y 3' además de los que están en el promotor y se esperaba encontrar un polimorfismo relacionado con el grupo de disgenesias, ya que en mamíferos el desarrollo de los testículos se inicia por la expresión del gen determinante testicular, en el embrión

de ratón *SRY* se expresa entre los días 10.5 y 12.5 días post coito y aunque el mecanismo de la regulación transcripcional no es claro, se sabe que el promotor de *SRY* tiene sitios de unión a la proteína *WT1* además que el gen se expresa justo antes de *SRY*; también en el trabajo de Hossain y Sanders (2001) se demostró que *WT1* induce la expresión del gen *SRY* y un estudio posterior del grupo de investigación de Matsuzawa y cols. (2003) demostraron “in vitro e in vivo” que la isoforma *WT1-KTS* se une con la proteína *SRY* y actúa de manera sinérgica para activar a otros factores de transcripción incluida la expresión de del propio *SRY*. Por lo tanto se conocen dos modelos de regulación transcripcional de *WT1* en los procesos de diferenciación sexual: a) mediante unión directa al DNA y b) a través de unión proteína- proteína y en los humanos la presencia de mutaciones en alguno de los dos genes conduce a reversión sexual XY. Sin embargo, en los SNPs en estudio no se observó diferencia entre los casos y controles por lo que podemos concluir que los polimorfismos estudiados en *WT1* (Tabla 6) no están relacionados con la patología.

Por otro lado el modelo de ratón se ha utilizado para estudiar las reversiones 46 XY, la sepa de ratón conocida como $B6-Y^{DOM}$ presenta reversión sexual y se originó al incluir el cromosoma Y del la sepa de ratón *Mus domesticus* con el ambiente genético de C57BL/ 6J (abreviado como B6) (Eicher y Cols., 1982) se han propuesto varios mecanismos para explicar la reversión sexual en este ratón sin embargo el fenomeno sigue sin ser claro. El gen candidato que se piensa está alterado en el ratón $B6-Y^{DOM}$ es lógicamente *SRY*, algunos trabajos se han enfocado en la variación de la expresión de este gen (hacker y Cols., 1995; koopman y Cols., 1990). Nagamine y Cols. (1999) realizó estudios de expresión por medio de RT-PCR semicuantitativo y encontró que los niveles de expresión de *sry* eran bajo y se relacionan con la reversión sexual, por lo tanto los genes que se expresan antes de *SRY* son la causa de la anormalidad, entre ellos se encuentran *GATA4* y su cofactor *ZFPM2* además de *WT1*. Ya se discutió la importancia del gen *WT1* en la expresión correcta

de *SRY*, sin embargo otro gen que se ha descrito como necesario para que la determinación sexual se lleve a cabo de manera correcta es *GATA4* (Tevosian y Cols., 2002) la disminución en la expresión de *GATA4* reduce la expresión de *SRY* y consecuentemente conduce a reversión sexual XY. Recientemente se estudió la manera en que participa *GATA4* en la determinación sexual y estudios en con modelos experimentales de cerdos demostró que *GATA4* se une directamente al promotor de *SRY* y promueve la expresión del gen. Estos resultados no son similares en los modelos con ratones ni en los humanos (Miyamoto y Cols., 2008). Existen experimentos en el que los genes *GATA4* y *WT1* colocalizan con *SRY* y con la hormona antimulleriana. (Hacker y Cols., 1995; Pelletier y Cols., 1991; Viger y Cols., 1998; Münsterberg y Lovell-Badge, 1991), demostrando que *GATA4* actúa junto con *WT1* de manera sinérgica sobre el promotor de *sry*. La unión del complejo *GATA4/WT1* con la secuencia del promotor de *SRY* se da a través de *WT1* (Miyamoto y Cols 2008). En el intrón 10 del gen *GATA4* se identificó el polimorfismo rs2409811 **T/G**, se observaron diferencias estadísticas entre los casos y los controles, los casos presentan la variante polimórfica **G** ya sea de manera homocigota (G/G) o bien heterocigota (G/T). Lo que sugiere que esta variante polimórfica pudiera estar relacionada con la falta de determinación gonadal. Es necesario continuar con estudios que demuestren si la variante alélica afecta la expresión del gen *GATA4* y así poder concluir que mecanismo que origina la disgenesia gonadal es vía la reducción de la expresión de *GATA4* y a su vez ésta origina la disminución de *SRY*.

Los genotipos de riesgo para los polimorfismos con diferencia significativa entre casos y controles de *ZFPM2* se presentan de manera homocigota en el caso del polimorfismo rs1442326 C/T la mayoría de los casos presentan al genotipo CC, el polimorfismo rs9643020 C/T también tiene una frecuencia alta para los genotipos CC y para el polimorfismo rs6469015 A/G la variante polimórfica que podría estar implicada en la patología es el genotipo GG.

La expresión en la dosis correcta de ZFPM2 es importante y en este trabajo se relacionaron tres polimorfismos todos se localizan en el intrón cinco del gen y podrían estar involucrados en la reversión sexual XY de humanos.

El complejo GATA2/ZFPM2 está involucrado en la expresión del gen SOX9, éste participa en la determinación sexual y se ubica en el cromosoma 17 (17q24.3-q25.1) presenta un patrón de expresión dimórfico entre machos y hembras. Sox9 se sobre expresa justo después de SRY (Sekiedo y Cols., 2004). La expresión de SOX9 depende principalmente de SRY, sin embargo, bajo circunstancias especiales Sox 9 es suficiente para inducir el desarrollo testicular en ausencia de SRY (Vidal y Cols., 2001; Qin y Bishop, 2005). Anteriormente se discutió la importancia que tiene GATA4 en el inicio de la determinación testicular unido a su cofactor ZFPM2, también conocido como Fog2 (Friend of GATA – 2). Alteraciones en la expresión o función de este complejo conducen a alteraciones en correcto funcionamiento del complejo proteico que participa en etapas tempranas del desarrollo gonadal (Manuylov y Cols., 2008). El complejo GATA4/ZFPM2 activa la expresión tanto de SRY como SOX9. Por lo tanto el haber identificado tres polimorfismos se podrían sugerir que estos modificarían la expresión de ZFPM2 y tener además de un impacto en la expresión tanto de SRY también la expresión de SOX9 (Figura 4).

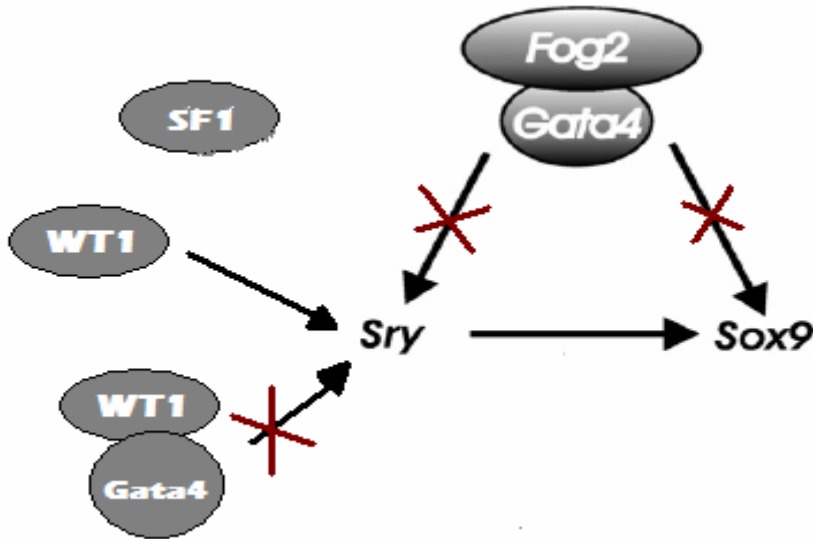


Figura 4. Acción del complejo GATA4 /ZFPM2 (Fog2) en la expresión de SRY y SOX9. El complejo **GATA4 /ZFPM2** promueve la expresión de SRY y la expresión de sox9. A su vez Sry también promueve la expresión de Sox9. Las variantes polimórficas con diferencia estadística entre los casos y controles podrían disminuir la expresión de los genes ZFPM2 y Gata4 en consecuencia la expresión de SRY y SOX9 sería afectada y origina la falla en el desarrollo testicular.

CONCLUSIONES

- Las anomalías en el gen SRY causan fallas en el desarrollo de los testículos y origina pacientes con disgenesia gonadal completa.
- El 18 % de los casos con disgenesia gonadal presentan mutación en el gen SRY.
- El gen WT1 no presenta SNPs funcionales que se relacionen con la patología.
- El polimorfismo rs2409811 del gen Gata4 y los polimorfismos rs1442326, rs9643020, rs6469015 pueden estar relacionados con la etiología de las disgenesias gonadales XY.

PERSPECTIVAS

Los SNPs con diferencias estadísticas significativas podrían estar relacionados con la patología; sin embargo, es importante considerar que el número de pacientes es bajo y por tanto es necesario aumentar la N de los caso, además se realizaran estudios que demuestren si los polimorfismos afectan la expresión del gen.

REFERENCIAS

1. Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol.* 1993 Apr;13(4):2235-46.
2. Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Shoot PJ, Hoogerbrugger Jw, de Winter JP, Uilenbroek JT, Karels B, Wilming LG, Meijers JH, Themmen PN and Grootegoed JA. 1994. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development*; 120:189-197.
3. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M, et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet.* 1994 Aug;7(4):497-501.
4. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. 1994. Müllerian-Inhibiting substance function during sexual development. *Cell.*79:415-425.
5. Behtash N, Karimi Zarchi M. Dysgerminoma in three patients with Swyer syndrome. *World J Surg Oncol.* 2007 Jun 23;5:71.
6. Berkovitz GD, Rock JA, Urban MD, Migeon CJ True hermaphroditism. *Johns Hopkins Med J.* 1982 Dec;151(6):290-7.
7. 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.
8. Biason-Lauber A, Konrad D. WNT4 and sex development. *Sex Dev.* 2008;2(4-5):210-8. Epub 2008 Nov 5.
9. Bickmore WA, Oghene K, Little MH, Seawright A, van Heyningen V, Hastie ND. Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor *Wt1* gene transcript. *Science.* 1992 Jul 10;257(5067):235-7.

10. Bouma GJ, Hart GT, Washburn LL, Recknagel AK, Eicher EM. Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expr Patterns*. 2004 Nov;5(1):141-9.
11. Bouma GJ, Washburn LL, Albrecht KH, Eicher EM. Correct dosage of *Fog2* and *Gata4* transcription factors is critical for fetal testis development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 18;104(38):14994-9. Epub 2007 Sep 11.
12. Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (*WT1*) during kidney development. *Mol Cell Biol*. 1991 Mar;11(3):1707-12.
13. Capel B, Albrecht KH, Washburn LL, Eicher EM. Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on *Sry*. *Mech Dev*. 1999;84(1-2):127-31.
14. Capel B. 2000. The battle of the sexes. *Mechanisms of Development*, (92) 89-103.
15. Da Silva SM, Hacker A, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1996. *Sox9* expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics*. 14:62-68.
16. Daggett MA, Rice DA, Heckert LL. Expression of steroidogenic factor 1 in the testis requires an E box and CCAAT box in its promoter proximal region. 2000. *Biol Reprod* 62:670-679.
17. Eicher EM, Washburn LL, Whitney JB 3rd, Morrow KE. *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science*. 1982 Aug 6;217(4559):535-7.
18. Federman Daniel D. 2006. The Biology of Human Sex Differences. *N Engl J Med* 2006;354:1507-14.
19. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 1990 Oct;110(2):521-8.
20. Grumbach MM, Conte FA. Disorders of Sex Differentiation en *Williams Textbook of Endocrinology*. 9^a ed. Wilson J, Foster D, Kronenberg H, Larsen P. eds. W.B. Saunders Company. E.U.A. 1998:1303-1425.
21. 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.
22. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene. *Development*. 1995 Jun;121(6):1603-14.

23. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R: Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 1995;121:1603-1614.
24. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):319-29.
25. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortés L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev*. 2000; 91(1-2):403-7.
26. Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr Rev*. 2003;24(4):466-87.
27. Hirose M. The role of Wilms' tumor genes. *J Med Invest*. 1999 Aug;46(3-4):130-40.
28. Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem*. 2001 May 18;276(20):16817-23. Epub 2001 Feb 20.
29. Hsiao HP, Tsai LP, Chao MC, Tseng HI, Chang YC. Novel SOX9 gene mutation in campomelic dysplasia with autosomal sex reversal. *J Formos Med Assoc*. 2006;105(12):1013-6.
30. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet*. 1999;87(4):349-53.
31. 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):554-63.
32. 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):1102-9
33. Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet J. 1973. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res*.29:1-41.
34. Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*. 1996 Sep;122(9):2813-22.
35. Ketola, I; Anttonen, M; Vaskivuo, T; Tapanainen, JS; Toppari, J; Heikinheimo, M. Developmental expression and spermatogenic stage specificity of transcription factors GATA-1 and GATA-4 and their cofactors FOG-1 and FOG-2 in the mouse testis. *Eur J Endocrinol*. 2002;147:397-406.

36. Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development*. 2004 Feb;131(3):539-49.
37. Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. 1982. Diferenciación sexual. Bases Biológicas del Dimorfismo sexual. *Rev Inv Clin*. 34: 374-359.
38. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*. 1990 Nov 29;348(6300):450-2.
39. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. *WT-1* is required for early kidney development. *Cell*. 1993 Aug 27;74(4):679-91.
40. Kriedberg J, Sariola H, Loring J, Maeda M, Pelletier J. 1993. *Wt-1* is required for early kidney development. *Cell*. 174: 679-691.
41. Krob G, Braun A, Kuhnle U. True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *Eur J Pediatr*. 1994 Jan;153(1):2-10.
42. Le Caignec C, Delnatte C, Vermeesch JR, Boceno M, Joubert M, Lavenant F, David A, Rival JM. Complete sex reversal in a WAGR syndrome patient. *Am J Med Genet A*. 2007 Nov 15;143A(22):2692-5.
43. Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the *WT1* gene. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10;264(1):74-99.
44. 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.
45. MacLaughlin D.T. and Patricia K. Donahoe. 2004. Mechanisms of disease Sex Determination and Differentiation. *N Engl J Med* 2004;350:367-78.
46. Makridakis N, Reichardt JK. 2005. Pharmacogenetic analysis of human steroid 5 alpha reductase type II: comparison of finasteride and dutasteride. *J mol Endocrinol*. 34(3):617-23.
47. Manuylov NL, Fujiwara Y, Adameyko II, Poulat F, Tevosian SG. The regulation of *Sox9* gene expression by the *GATA4/FOG2* transcriptional complex in dominant XX sex reversal mouse models. *Dev Biol*. 2007 Jul 15;307(2):356-67. Epub 2007 May 3.
48. Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B. 1997. Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol*.;712:958-968.

49. Matsuzawa-Watanabe Y, Inoue J, Semba K. Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene*. 2003 Sep 11;22(39):7900-4.
50. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;163(1-2):3-9.
51. Mendez JP, Ulloa-Aguirre A, Imperato-McGinley J, Brugmann A, Delfin M, Chavez B, Shackleton C, Kofman-Alfaro S, Perez-Palacios G. 1995. Male pseudohermaphroditism due to primary 5 alpha-reductase deficiency: variation in gender identity reversal in seven Mexican patients from five different pedigrees. *J endocrinol Invest*.18:205-213.
52. Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N. Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Exp Cell Res*. 1998 Oct 10;244(1):230-8.
53. Merchant-Larios H. The onset of testicular differentiation in the rat: An ultrastructural study. *Am J Anat*. 1976 Mar;145(3):319-29.
54. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S. 1997. Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development*. 124:1653-1664.
55. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol*. 2008 Apr 29;9:44.
56. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet*. 1996; 14(1):62-8.
57. Morohashi K, Zanger UM, Honda S, Hara M, Waterman MR, Omura T. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol Endocrinol*. 1993 Sep;7(9):1196-204.
58. Muller U. 1994. The human Y chromosome. En: *Molecular Genetics of Sex Determination*. Stephen S Wachtel (Ed). Academic Press:205-224.
59. Münsterberg A, Lovell-Badge R Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*. 1991 Oct;113(2):613-24.
60. Münsterberg A, Lovell-Badge R: Expression of the mouse antimüllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 1991, 113:613-624.

61. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*. 1998;93(3):445-54.
62. Nagamine CM, Morohashi K, Carlisle C, Chang DK. Sex reversal caused by *Mus musculus* Y chromosomes linked to variant expression of the testis-determining gene *Sry*. *Dev Biol*. 1999 Dec 1;216(1):182-94.
63. Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*. 2005 Mar;5(3):210-22.
64. Ottolenghi C, Veitia R, Quintana-Murci L, Torchard D, Scapoli L, Souleyreau-Therville N, Beckmann J, Fellous M, McElreavey K. The region on 9p associated with 46,XY sex reversal contains several transcripts expressed in the urogenital system and a novel doublesex-related domain. *Genomics*. 2000;64(2):170-8.
65. Ozisik G, Achermann JC, Jameson JL. The role of *SF1* in adrenal and reproductive function: insight from naturally occurring mutations in humans. *Mol Genet Metab*. 2002;76(2):85-91.
66. Park SY, Jameson JL. Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology*. 2005;146(3):1035-42.
67. Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene *WT1* in the murine urogenital system. *Genes Dev*. 1991 Aug;5(8):1345-56.
68. Petersen C, Boitani C, Frøysa B, Söder O. Transforming growth factor-alpha stimulates proliferation of rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;181(1-2):221-7.
69. Petersen C, Söder O. The Sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res*. 2006;66(4):153-61.
70. Qin Y, Bishop CE. *Sox9* is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of *Sry*. *Hum Mol Genet*. 2005 May 1;14(9):1221-9. Epub 2005 Mar 24.
71. Raymond C, Shamu M. 1998. Evidence for evolutionary conservation of *Sry*-determining gene. *Nature*. 391:691-695.
72. Reddy J, Licht J. The *WT1* Wilms tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochem. Biophys. Acta*. 1287:1-28.
73. Sanlaville D, Vialard F, Thépot F, Vue-Droy L, Ardalán A, Nizard P, Corré A, Devauchelle B, Martin-Denavit T, Nouchy M, Malan V, Taillemite JL, Portnoï MF. Functional disomy of Xp

including duplication of DAX1 gene with sex reversal due to t(X;Y)(p21.2;p11.3). *Am J Med Genet A*. 2004;128(3):325-30.

74. Scherer G, Held M, Erdel M, Meschede D, Horst J, Lesniewicz R, Midro AT. Three novel SRY mutations in XY gonadal dysgenesis and the enigma of XY gonadal dysgenesis cases without SRY mutations. 1998. *Cytogenet Cell Genet*; 80(1-4):188-92.
75. Scherer G. The molecular genetic jigsaw puzzle of vertebrate sex determination and its missing pieces. *Novartis Found Symp*. 2002;244:225-36; discussion 236-9, 253-7.
76. Scott DA, Cooper ML, Stankiewicz P, Patel A, Potocki L, Cheung SW. Congenital diaphragmatic hernia in WAGR syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005 May 1;134(4):430-3.
77. Sekido R, Bar I, Narváez V, Penny G, Lovell-Badge R. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol*. 2004 Oct 15;274(2):271-9.
78. Shwalot W, Behringer R. 1995. Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature*. 374:425-430.
79. Sinclair A H. 1998. Human sex determination. *J Exp zool.*; 281:501-505.
80. Sinclair A, Berta P, Palmere 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.
81. Swain A, Lovell-Badge R. 1999. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*. 13(7):720-755.
82. Swain A, Narvaez P, Burgoyne G, Lovell-Badge R. 1998. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature*. 391: 761-767.
83. Tevosian S, Albrech K, Crispino J, Fujiwara Y, Eicher E, Orkin S. 2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners *GATA4* y *FOG2*. *Development*. 129:4627-4634.
84. Tilmann C, Capel B. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development*. 1999;126(13):2883-90.
85. Tsang TE, Shawlot W, Kinder SJ, Kobayashi A, Kwan KM, Schughart K, Kania A, Jessell TM, Behringer RR, Tam PP. Lim1 activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. *Dev Biol*. 2000 Jul 1;223(1):77-90.

86. Vaino S, Heikkila M, Zamboni L. 1999. Female Development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. *Nature*. 397:405-409.
87. Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet*. 2001 Jul;28(3):216-7.
88. Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, Nemer M: Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Development* 1998,125:2665-2675.
89. Vilain E. Anomalies of human sexual development: clinical aspects and genetic analysis. *Novartis Found Symp*. 2002;244:43-53; discussion 53-6, 79-85, 253-7.
90. Vincent Guguère. 1999. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocrine Reviews*; 20(5): 689-725.
91. Washburn LL, Albrecht KH, Eicher EM. C57BL/6J-T-associated sex reversal in mice is caused by reduced expression of a *Mus domesticus* Sry allele. *Genetics*. 2001 Aug;158(4):1675-81.
92. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*. 1994;372(6507):635-41.
93. Zarkower D. Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet*. 2001;2(3):175-85.