

15 00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DE UNA REGION DEL CROMOSOMA X ASOCIADA A REVERSION SEXUAL MASCULINA UTILIZANDO MICROSATELITES

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

Q.F.B. NANCY MONROY JARAMILLO

DIRECTORA DE TESIS: DOCTORA SUSANA H. KOFMAN EPSTEIN



MEXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2002

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL

AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

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

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de julio de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Monroy Jaramillo Nancy**, con número de cuenta 89269338, y número de expediente 3991150, con la tesis titulada: "Identificación de una región del cromosoma X asociada a reversión sexual masculina utilizando microsatélites", bajo la dirección de la **Dra. Susana Helena Kofman Epstein**.

Presidente:	Dra. Susana Kofman Epstein
Vocal:	Dra. Rosario Rodríguez Amaiz
Secretario:	Dr. Jaime Berumen Campos
Suplente:	Dra. Marisol López López
Suplente:	Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de julio de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Se a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM para difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Nancy Monroy

Jaramillo

FECHA: 28-08-02

SUBSCRITO: [Firma]

Este trabajo fue financiado por el proyecto de CONACYT con clave G28494M.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Doctora Susana Helena Kofman Epstein
Doctor Jaime Berumen Campos
Doctora Marisol López López

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, por la gran experiencia de colaborar con ella.

A mi comité tutorial, por su apoyo y motivación en la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios.

A toda la gente del servicio de Genética del Hospital General de México.

Quiero dedicar este trabajo a todos mis seres queridos,

A mi esposo Eduardo y a mi hija Itzel

A mis padres

A mis hermanos

y a todos mis amigos

INDICE GENERAL

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Antecedentes teóricos.....	3
Determinación sexual.....	3
Diferenciación sexual.....	6
Escenario molecular en la determinación y diferenciación sexual.....	7
<i>SRY</i>	8
<i>SOX9</i>	9
Proteínas que interactúan con <i>SRY</i> y <i>SOX9</i>	10
Otros genes que participan en el desarrollo de la gónada.....	10
<i>WT1</i>	11
<i>SF1</i>	12
<i>LIM1</i>	13
<i>DAX1</i>	13
<i>WNT4</i>	16
<i>DMRT1 Y 2</i>	17
Algunas interacciones de los genes de la determinación sexual.....	17
Reversión sexual.....	18
Reversión sexual XX.....	19
Propuestas para explicar diferenciación testicular en ausencia de <i>SRY</i>	24
Particularidades del cromosoma X.....	25
Microsatélites.....	27
Análisis de ligamiento.....	28
Planteamiento del problema.....	30
Objetivo.....	30
Metodología.....	31
Material y métodos.....	32
Pacientes.....	32
Extracción de DNA genómico.....	32
Cuantificación de DNA genómico.....	33
Amplificación de regiones microsatélite.....	34
Preparación de las muestras para el analizador genético.....	35
Separación de las muestras por electroforesis en capilar y análisis mediante el programa GeneScan.....	36
Determinación de frecuencias alélicas (genética de población).....	37
Análisis de ligamiento.....	38

Resultados.....	39
Discusión.....	41
Conclusiones.....	46
Perspectivas.....	46
Bases electrónicas consultadas.....	48
Referencias.....	48
Tablas.....	55
Figuras.....	60
ANEXO 1 (Secuencias de los oligonucleótidos empleados).....	69
ANEXO 2 (Características de los <i>loci</i> microsatélites utilizados)	71

RESUMEN

El síndrome de varón XX es una forma poco común de reversión sexual que se caracteriza por desarrollo testicular en ausencia de un cromosoma Y. La mayoría de los casos son esporádicos y presentan el gen determinante de testículo (*SRY*) translocado en uno de sus cromosomas X. Adicionalmente, se han descrito cinco familias con dos o más afectados, cuatro de estos casos son *SRY* negativos lo que indica la participación de un gen(es) aún desconocido(s) en autosomas o en el X en la etiología de la enfermedad. En este trabajo se realizó análisis de ligamiento con 29 marcadores genéticos microsatélites para identificar si existía ligamiento al cromosoma X en una familia con dos varones XX, *SRY* negativos. La reconstrucción de los haplotipos mostró evidencia de ligamiento del padecimiento a una región de 2.11 cM en Xp21.3-p21.1. El análisis de múltiples puntos en este intervalo reveló un valor máximo de *LOD score* de 0.6 entre los marcadores DXS1218 y DXS997, lo cual concordó con los estudios de simulación (*LOD score*= 0.64). Esta es la primera descripción de una región del cromosoma X ligada a reversión sexual XX. Es interesante señalar que dentro de este segmento se localiza el *locus* DSS que incluye al gen antitestículo, *DAX1*. Se analizó la probable participación de esta región y se propuso un modelo para la etiología de los varones XX, *SRY* negativos.

ABSTRACT

46,XX maleness is an uncommon form of human sex reversal characterized by testicular development in subjects lacking a Y-chromosome. The majority of 46,XX males occur sporadically and are *SRY*-positive due to translocated Y-sequences, but there are a few families in which two or more affected individuals have been described, most of them being *SRY*-negative. In order to recognize if sex reversal in a family with two *SRY*-negative XX males was X-linked we performed linkage analysis, using twenty-nine X-chromosome polymorphic markers. Haplotype reconstruction showed evidence of linkage to sex reversal in a 2.11 cM region at Xp21.3- Xp21.1. Multipoint analysis in this region revealed a maximum LOD score of 0.6 from marker DXS1218 to DXS997 which was in agreement with simulation studies (LOD score=0.64). This is the first report where an X-chromosome region shows linkage with XX sex reversal. Interestingly, the DSS locus that includes the antitestis gene *DAX1* is located within this interval. We discuss the possible involvement of this region in *SRY*-negative XX maleness.

ANTECEDENTES TEORICOS

El sexo es uno de los rasgos fenotípicos que más fácilmente se relaciona con la herencia y en consecuencia con el genotipo. Sin embargo, la relación entre el genotipo y el sexo no es sencilla como se creyó durante la mayor parte del siglo pasado. El desarrollo sexual en los mamíferos se describe como un programa secuencial, ordenado e interrelacionado que se lleva a cabo en tres etapas consecutivas: en el primer paso se decide el sexo genético (genotípico o cromosómico) del embrión cuando el ovocito es fertilizado por un espermatozoide portador de un cromosoma X o de un Y. En el segundo paso ocurre la determinación gonadal; es decir, se decide el destino de la gónada bipotencial hacia ovario o testículo, mediante la expresión de un gen regulador maestro del Y en los embriones XY; así en esta etapa se define el sexo gonadal. En el tercer paso ocurre la diferenciación sexual fenotípica en la que se desarrollan los genitales internos y externos en respuesta a hormonas producidas por la gónada diferenciada; esta etapa condiciona el sexo fenotípico o somático (Lim et al, 1998; Roberts et al, 1999; Capel, 1999; McElreavey et al, 1999). El género de un individuo es el sexo de asignación y éste generalmente depende de ambos procesos: determinación y diferenciación normales (Hiort et al, 2000) (Fig. 1).

DETERMINACION SEXUAL

La determinación sexual en los mamíferos euterios parece ser insensible a estímulos externos, lo que sugiere que existen genes específicos que establecen uno u otro sexo. En el humano la opción entre el desarrollo masculino o femenino se decide mediante mecanismos genéticos y al igual que

en otros mamíferos, las mujeres tienen dos cromosomas X (XX) y los hombres poseen un solo X y un Y (XY). La determinación sexual ocurre en una etapa muy temprana del desarrollo fetal, cuando se decide el destino de la gónada bipotencial (indiferenciada) hacia testículo u ovario: $\cong 7^{\text{a}}$ y $\cong 13^{\text{a}}$ semana de gestación, respectivamente (Beale, 2001). En los mamíferos, la gónada se forma a partir del mesodermo intermedio. De acuerdo a las estructuras que lo constituyen durante el desarrollo, este tejido se divide en tres partes que de anterior a posterior son el pronefros, que da lugar a la corteza suprarrenal; el mesonefros que origina las gónadas; y el metanefros, a partir del cual se desarrolla el riñón (Byskov et al, 1994; Parker et al, 1999b; Capel, 1999 y Clarkson et al, 2002). Durante esta etapa de gónada indiferenciada, se forman los sistemas de conductos genitales, empezando con los conductos masculinos o de Wolff (progenitores del epidídimo, vasos eferentes y vesículas seminales), seguidos por los conductos femeninos o de Müller (progenitores de oviductos, útero y tercio superior de vagina) (Byskov et al, 1994; Parker et al, 1999b y Capel, 1998; 1999).

En los mamíferos euterios, la determinación sexual se define como el inicio del desarrollo del testículo a partir de la gónada bipotencial ya que toda la diferenciación sexual secundaria depende y es subsecuente de este evento inicial (Martineau et al, 1997; Scherer et al, 1999; Vilain, 2001). En la década de los cuarenta, los experimentos de Alfred Jost fueron los primeros en definir a la determinación sexual de los mamíferos como un proceso dependiente de la presencia o ausencia de un testículo funcional. Jost castró embriones de conejos en una etapa temprana de su desarrollo y luego los reimplantó en el útero de su madre. Todas las crías resultaron femeninas al nacimiento (Jost,

1947). Subsecuentemente, varios reportes en la literatura demostraron que en presencia de un cromosoma Y e independientemente del número de cromosomas X, el embrión de mamíferos se desarrolla como macho, mientras que en ausencia del Y se desarrolla como hembra (Capel, 1998). Estas observaciones llevaron a suponer la existencia de un gen determinante de testículo localizado en el cromosoma Y. A este gen hipotético se le denominó *TDF* (*Testis Determining Factor*) en humanos y *Tdy* (*Testis determining gene on the Y*) en ratones. El gen *TDF* fue localizado en Yp mediante el análisis de pacientes con reversión sexual XX que portaban una porción del cromosoma Y translocado a un cromosoma X (Palmer et al, 1989). Finalmente, esta región se acotó a un segmento de 35 Kb, adyacente al límite pseudoautosómico, y en ella se identificó al gen *SRY* (*Sex determining Region on Y chromosome*) (Sinclair et al, 1990). Posteriormente, se clonó al homólogo murino y se le llamó *Sry* (Gubbay et al, 1990).

Las evidencias que confirmaron a *SRY* como *TDF* fueron: (1) algunos individuos con cariotipo 46,XY pero con fenotipo femenino y disgenesia gonadal completa presentan mutaciones en el marco abierto de lectura del gen *SRY*. (2) La expresión de *Sry* en el desarrollo normal de embriones de ratón ocurre en la cresta genital alrededor de los días *post coitum* (dpc) 10.5-12.5, justo antes de su diferenciación hacia testículo (Koopman et al, 1990). (3) Ratones con cariotipo XX desarrollaron testículos cuando se introdujo un fragmento de DNA de 14 kb que contenía al gen *Sry* como transgen, lo que demostraba que *Sry* es necesario y suficiente para determinar la formación del testículo (Koopman et al, 1991;1999; McElreavey et al, 2000).

DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Una vez que ha ocurrido la determinación sexual, la siguiente fase es la diferenciación sexual; es aquí donde se llevan a cabo todos los eventos subsecuentes que finalmente producirán un fenotipo sexual masculino o femenino (Parker et al, 1999a,b).

En esta etapa el destino de la gónada ya está decidido, los testículos se vuelven histológicamente diferentes de los ovarios. Estos últimos tienen una apariencia sólida, transparente, amorfa y exhiben poca diferenciación estructural hasta la gestación tardía (Parker et al, 1999a, Swain y Lovell, 1999; Roberts et al, 1999; Hughes et al, 1999). En contraste, el testículo se organiza en dos compartimentos distintos: los cordones testiculares (precursores de túbulos seminíferos) y región intersticial. Los cordones contienen las células fetales de Sertoli y las células germinales primordiales que se originan fuera de la cresta genital y migran a la gónada indiferenciada. La región intersticial rodea a los cordones y contiene las células esteroidogénicas de Leydig y las mioideas peri-tubulares. Los conductos masculinos de Wolff continúan desarrollándose y los müllerianos experimentan regresión (Byskov et al, 1994; Parker et al, 1999b; Capel, 1999 y Clarkson et al, 2002).

En el ser humano, el testículo fetal produce las hormonas necesarias para el desarrollo de un fenotipo masculino completo: las células de Sertoli secretan la hormona anti-Mülleriana (AMH o MIS) que causa la regresión de los conductos de Müller y las células de Leydig producen testosterona que induce la diferenciación de los conductos de Wolff en epidídimo, vasos eferentes y vesícula seminal. La acción de la enzima extragonadal 5- α -reductasa convierte a la testosterona en 5- α -dihidrotestosterona que es la hormona responsable de

la diferenciación de los genitales externos masculinos (pene y escroto) (Swain y Lovell, 1999; Parker et al, 1999b; Hiort et al, 2000).

En el embrión femenino, la ausencia de hormonas testiculares origina que los conductos de Wolff experimenten regresión y los de Müller formen los oviductos, el útero y el tercio superior de la vagina (Swain y Lovell, 1999; Parker et al, 1999b; Hiort et al, 2000).

ESCENARIO MOLECULAR EN LA DETERMINACION Y DIFERENCIACION SEXUAL

Actualmente, parece emerger un “escenario molecular” para la determinación-diferenciación sexual de los mamíferos, al menos con respecto a varios factores de transcripción cuya participación ya se conoce en este proceso (Swain y Lovell, 1999). Estos pueden clasificarse en tres grupos: el primero incluye factores de transcripción generales, que probablemente participen en varias etapas diferentes, quizás en forma continua, desde el desarrollo temprano de la cresta genital hasta la diferenciación de los tipos celulares específicos en las gónadas. En este grupo se incluyen factores tales como *SF1*, *WT1*, *LIM1*. El segundo grupo está representado por *SRY* y *SOX9* que son factores específicos del desarrollo testicular. Los miembros del tercer grupo ejercen una acción anti-testículo; hasta ahora el único gen que se conoce de esta clase es *DAX1*, pero muy probablemente *WNT4* (Jordan et al, 2001; Heikkila et al, 2001) actúe en conjunto con éste. Sin embargo, el panorama es confuso dada la cantidad de interacciones entre los genes. Los factores del primer grupo no son realmente sexo-específicos pero pueden ser más importantes en un sexo que en otro; además, varios de ellos funcionan como

reguladores positivos de otros genes que tienen una función de interruptor enfocada en la determinación sexual, tales como *SOX9*, *SRY*, y *DAX1*. Se ha demostrado que los niveles y tiempos de expresión de muchos de estos genes tienen una función esencial en este escenario, así como los efectos de umbral y de dosis génica (Swain y Lovell, 1999; Parker et al, 1999a; Roberts et al, 1999).

SRY, EL FACTOR DETERMINANTE DE TESTICULO

El gen *SRY* se localiza en la porción distal de Yp11.3, próximo a la región pseudoautosómica (Sinclair, 1990; 2001). Este gen contiene un solo exón, el cual codifica para una proteína con un dominio de unión a DNA, altamente conservado y compartido por las proteínas nucleares del grupo de alta movilidad HMG (*High Mobility Group*) y por algunos factores de transcripción. La unión de la proteína *SRY* a su secuencia específica (5' CCA TTG TTC T 3') resulta en un doblamiento de 90° en el DNA (Roberts et al, 1999). Salas-Cortés y colaboradores han demostrado la expresión de la proteína *SRY* humana en los núcleos de las células somáticas y las células germinales en la cresta genital no solo durante el desarrollo testicular fetal (tiempo en el que se ha postulado que ejerce su acción reguladora), sino que también está presente en el tejido gonadal adulto. Todo esto sugiere que *SRY* pueda tener funciones adicionales en la reproducción humana (Salas-Cortés et al, 2001).

Adicionalmente, 20% de las mujeres XY tienen mutaciones en el dominio HMG de este gen que presumiblemente actúan alterando la función de factor de transcripción de *SRY* (Capel et al, 1999). Es bien sabido que el gen *SRY* satisface los requerimientos genéticos y conceptuales de un factor

determinante de testículo, pero aún no está claro cómo inicia este proceso en el ámbito molecular, tampoco se han identificado sus genes blanco y la única región de esta proteína que está conservada en los mamíferos es la caja HMG (Roberts et al, 1999; Sinclair, 2001; Clarkson y Harley, 2002). Adicionalmente, parece estar ausente en monotremas y especies no mamíferas (Western et al, 2001).

La expresión de *SRY* en la gónada está seguida de varios eventos, que incluyen la activación de genes masculino-específicos "corriente abajo", migración y proliferación celulares. Adicionalmente, diversos estudios indican que *SRY* podría modificar la expresión de genes de la ruta masculina actuando como factor de transcripción clásico o alterando la arquitectura del DNA o de la cromatina (Clarkson y Harley, 2002).

SOX9

SOX9 codifica una proteína relacionada con *SRY* que está implicada en el proceso de la determinación sexual de mamíferos. La función de *SOX9* en la determinación testicular se descubrió por su asociación con el síndrome óseo dismórfico de displasia campomélica (DCC), debido a que 75% de estos pacientes presentan además reversión sexual XY (Foster et al, 1994; Wagner et al, 1994; McElreavey et al, 2000). Al clonar los puntos de ruptura cromosómicos de las translocaciones que presentaban los pacientes con DCC, *SOX9* fue identificado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q24.3-q25.1) (Foster et al, 1994). Este gen codifica para un factor de transcripción de 509 aminoácidos, con dominios de unión a DNA (ya que contiene una caja HMG relacionada a *SRY*) y de transactivación transcripcional. *Sox9* es un fuerte

candidato para la activación por *Sry* ya que es sobre regulado en las células de Sertoli inmediatamente después de la expresión de *Sry*, aunque no hay evidencias formales de ello debido a las dificultades para identificar regiones de regulación de *Sox9* (Clarkson y Harley, 2002). Adicionalmente, se ha demostrado que SOX9 es necesario para la activación de la AMH o MIS, hormona secretada por las células de Sertoli que causa la regresión de los conductos de Müller. La expresión ectópica de *Sox9* en ratones XX por medio de un transgen también es capaz de inducir desarrollo testicular en ausencia de *SRY* (Vidal et al, 2001). En estudios recientes de genes reporteros se han descrito dos dominios de transactivación transcripcional en la región carboxilo terminal de esta proteína; uno rico en Pro, Glu, Ser y otro rico en prolina. Ello hace suponer que SOX9 puede actuar como un activador clásico de la transcripción; sin embargo, su función en la determinación sexual debe ser más extensa (Huang, 1999; Bishop, 2000; Clarkson y Harley, 2002).

PROTEINAS QUE INTERACTUAN CON SRY Y SOX9

Debido a que la mayoría de los factores de transcripción funcionan en grandes complejos, actualmente varios investigadores están buscando las proteínas que interactúan con *SRY* y *SOX9*. Ya se han identificado algunas de ellas con función en el transporte nuclear (importina, calmodulina) y a otras como probables cofactores de transcripción (SIP-1, PC4 ó IFRD1, HSP70) (Fig. 1b).

OTROS GENES QUE PARTICIPAN EN EL DESARROLLO DE LA GONADA

El desarrollo de los sistemas gonadal, suprarrenal, urogenital y renal está estrechamente ligado. Se sabe que otros genes (autosómicos y ligados al X)

participan en este proceso y conducen la formación de la gónada indiferenciada.

WT1

El gen del tumor de Wilms, *WT1*, ha sido identificado como un gen supresor de tumores que participa en la etiología del tumor de Wilms. Las mutaciones en *WT1* (localizado en 11p13) se asocian además con falla en la diferenciación sexual, nefropatía, síndrome de Denys-Drash (DD), gonadoblastoma en el síndrome de Frasier (SF) y síndrome WAGR. El síndrome DD es un padecimiento autosómico dominante que se caracteriza por nefropatía de inicio temprano, anomalías gonadales y urogenitales y tumor de Wilms. En el SF, los pacientes no desarrollan tumor de Wilms pero presentan disgenesia gonadal, pseudohermafroditismo masculino y glomerulopatía. El WAGR es un padecimiento que incluye tumor de Wilms, anomalías oculares, anormalidades genitourinarias y retraso mental (Scharnhorst et al, 2001).

La función de *WT1* en la diferenciación gonadal no es específica de sexo, ya que la disgenesia gonadal también ocurre en los individuos 46,XX. Esto sugiere su importancia en la formación de la gónada primitiva más que en el desarrollo testicular. Sin embargo, las anormalidades genitales en el síndrome de DD se limitan a los pacientes 46,XY (McElreavey et al, 2000; Vaiman et al, 2000; Hiort et al, 2000).

El gen *WT1* codifica 24 formas proteicas diferentes que regulan la transcripción de una variedad de genes y probablemente participen en el procesamiento post-transcripcional del RNA. Todas ellas contienen 4 dedos de zinc en la región carboxilo terminal C₂H₂ y una región amino terminal rica en prolina y

ácido glutámico. Las isoformas +KTS y -KTS se originan por empalme (*splicing*) alternativo que incorporan u omiten, respectivamente, tres aminoácidos (aa's) –lisina (K), treonina (T) y serina (S)- entre los dedos de zinc 3 y 4. WT1(-KTS) es un factor de transcripción clásico, que sobre regula la expresión de *SRY*, activa a *BCL2* (inhibidor de apoptosis), *CDKN1A* (inhibidor de cinasa dependiente de ciclina), y *DAX1*. En contraste, la isoforma WT1+KTS parece tener una función en el procesamiento del RNA.

Varios estudios han demostrado una participación directa de la isoforma WT1+KTS en la determinación sexual masculina por lo que se piensa que tiene una función en la activación de *Sry* o en la estabilidad del transcrito de *Sry* (Clarkson 2002; Scharnhorst et al, 2001).

SF1

Es un miembro de la familia de receptores hormonales nucleares. Actúa como un factor que modula la transcripción de otros genes que codifican proteínas relacionadas en la esteroidogénesis y en la determinación sexual masculina, tales como: *MIS*, *DAX1*, y *STAR*.

En el humano, el gen *SF1* se localiza en 9q33 (Taketo et al, 1995), una región que no ha sido asociada con anomalías de la diferenciación sexual. Recientemente, la secuenciación del gen *SF1* en una paciente XY mostró una mutación que causa reversión sexual XY completa, aún en estado heterocigoto (Achermann et al, 1999). Sin embargo, en el ratón un fenotipo tan drástico (agenesia de gónadas y glándulas suprarrenales), solo se observa si ambas copias del gen están mutadas (Vaiman et al, 2000). Para activar el promotor de *MIS*, *SF1* se une a una secuencia específica y evolutivamente conservada,

CAAGGTC, que se localiza aproximadamente a -90 pb del sitio de inicio de la transcripción (Parker et al, 1999a).

LIM1

Otro gen involucrado en el desarrollo de la gónada y de los riñones es el recientemente clonado *LIM1*, localizado en el cromosoma 1. En humanos no se conocen mutaciones en este gen, aunque se sugiere un fenotipo de defectos en el desarrollo de gónadas y riñones, asociado con anomalías cerebrales (Swain et al, 1999; Hiort et al, 2000)

DAX1

El gen *DAX1* codifica un miembro de la familia de receptores hormonales nucleares. La secuencia del gen *DAX1* contiene sólo un marco abierto de lectura que produce un transcrito de 1.9 Kb y una proteína de 470 aa's. *DAX1* está compuesto por dos exones separados entre sí por un intrón de 3.4 Kb. El exón 1 (1168 pb) codifica el extremo amino terminal y dos tercios del dominio C-terminal. El exón 2 (245 pb) codifica el resto del dominio carboxilo terminal y la región 3' no traducida (Guo et al, 1996).

La proteína *DAX1* se puede dividir en dos porciones con características estructurales y funcionales diferentes: el dominio de enlace a ligando (DEL) y el dominio de unión a DNA (DUD). La mitad del extremo carboxilo terminal de *DAX1* es similar al DEL de la familia de receptores hormonales nucleares (RHN). En esta familia, por homología, también se incluyen los receptores huérfanos que no tienen ligando identificado o actúan en forma independiente de ligando. Los miembros de la familia de RHN son factores de transcripción que regulan una variedad de procesos celulares esenciales, en forma

dependiente de ligando (Burris et al, 1996). DAX1 carece de la estructura canónica de DUD de las proteínas RHN y en su lugar presenta un nuevo motivo N-terminal que consiste en tres repetidos y medio de 65-67 aa's ricos en alaninas y glicinas. Este motivo se une a estructuras secundarias de DNA en forma de horquilla y bloquea la esteroidogénesis en las células suprarrenales al reprimir al promotor de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (STAR). Lalli et al. (1997) investigaron el mecanismo de esta represión y encontraron que la región C-terminal de DAX1 posee actividad silenciadora de la transcripción que puede ser transferida a un dominio heterólogo de enlace a DNA y que es promotor célula-específica (Lalli et al, 1997; Goodfellow y Camerino, 1999).

Estudios de expresión y de hibridación *in situ* han demostrado que el mRNA de *Dax1* murino se localiza en cuatro órganos en desarrollo: glándulas suprarrenales, gónadas, hipotálamo e hipófisis. Por otro lado, DAX1 se expresa en las glándulas suprarrenales y testículos de adulto (Goodfellow y Camerino, 1999). Aunque aún no se conoce ligando de *DAX1* y se sabe poco acerca de su función y de los genes que regula, estos datos sugieren una posible función de *DAX1* en el eje hipotálamo/hipófisis/esteroidogénico (Zanaria et al, 1995).

Diversas deleciones y mutaciones de *DAX1* son responsables de la forma ligada al X de hipoplasia suprarrenal congénita (AHC). AHC es una enfermedad hereditaria del desarrollo de la glándula suprarrenal que se caracteriza por ausencia de zona permanente de la corteza suprarrenal y por desorganización estructural de las glándulas. Generalmente se ve asociada con hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) durante la pubertad de los pacientes. Diferentes

estudios moleculares han demostrado que mutaciones en la región codificante de *DAX1* son responsables de ambas enfermedades (AHC y HH) (Muscatelli et al, 1994; Guo et al, 1996; Schwartz et al, 1995; Zhang et al, 1998). Hasta 1999 todos los pacientes descritos habían sido hombres y las mujeres portadoras no habían presentado síntomas clínicos; sin embargo, Merke et al. (1999) reportaron una familia que muestra un amplio espectro de fenotipos asociados con la misma mutación de *DAX1* y con manifestaciones en mujeres heterocigotas.

Adicionalmente, se han reportado casos de reversión sexual XY en individuos con duplicaciones en el brazo corto del cromosoma X. El estudio de estos pacientes (Baumstark et al, 1996) demostró que la reversión sexual resulta de la presencia de dos copias activas del *locus* DSS (de sus siglas en inglés *Dosage Sensitive Sex reversal*). La dosis doble de DSS interfiere con la formación del testículo, mientras que la pérdida de DSS es compatible con un fenotipo masculino normal lo que sugirió una probable función de este *locus* en el desarrollo de ovario y/o como eslabón de enlace en la formación de testículo y ovario. DSS se localizó en una región de 160 Kb en Xp21, traslapando el *locus* de AHC. La búsqueda de secuencias que se expresaran en esta región identificó al gen *DAX1* (*DSS-AHC critical region on the X, gene 1*) (Bardoni et al. 1994, Zanaria et al. 1994).

Posteriormente, Swain et al. (1998) desarrollaron un ratón transgénico 46,XY que portaba copias extra de *dax1*, mostrando únicamente retraso en el desarrollo testicular pero sin reversión sexual. Estos autores encontraron que la reversión ocurría al probar el transgen contra alelos débiles de *Sry*. Estos resultados indican que *dax1* funciona como un gen anti-testículo ya que actúa

en forma antagonista a *Sry* y postulan a *DAX1* como DSS (Swain et al, 1998). Sin embargo, las evidencias clínicas y experimentales sugieren que la función de *DAX1* en la determinación sexual es más compleja. Ese mismo año, Yu y colaboradores desarrollaron un ratón *knockout* para *dax1* con una delección dirigida en el exón dos del gen que no resultó en el fenotipo esperado de reversión sexual XY (Yu et al, 1998). Esto puede deberse a que *DAX1* actúa como un complejo multiproteico sensible a dosis cuyo momento de expresión es fundamentalmente importante, y a que este gen funcione en forma diferente en ratón y humano (Goodfellow y Camerino, 1999; Pask et al, 2001).

Dax1 se expresa en el ratón en períodos consistentes con una función específica en la determinación sexual. Está activo a los 11.5 dpc en las gónadas de ambos sexos, al igual que *sry*, pero se apaga en el testículo a los 12.5 dpc, mientras que su función persiste en el ovario (Swain et al, 1996). Además, aunque se había postulado a este gen como determinante de ovario, su pérdida en ratones hembras no afectó el desarrollo de ovario ni su fertilidad, pero sí causó degeneración progresiva del epitelio germinal de testículo. Los datos sugieren que *dax1* es esencial para el mantenimiento de la espermatogénesis. *DAX1* parece actuar como un interruptor entre la ruta masculina y femenina y formaría parte de una cascada genética de regulación de inhibiciones sucesivas que conducen a la formación de testículo. Esto es, activaría la ruta femenina, pero inhibiría la ruta masculina (Yu et al, 1998).

WNT4

Este gen, localizado en 1p35, codifica para una molécula de señalización implicada en la determinación sexual. En ratones, las delecciones de este gen

resultan en masculinización de individuos XX (Vainio et al, 1999; Heikkila et al, 2001), mientras que en humanos su sobreexpresión o duplicación ocasiona reversión sexual XY. Al parecer, *WNT4* y *DAX1* funcionan en conjunto para controlar el desarrollo femenino y prevenir la formación de testículo (Jordan et al, 2001).

DMRT1 Y DMRT2

Estos dos genes candidato se han identificado en 9p24, una región relacionada con reversión sexual en humanos. Ambos tienen un patrón de expresión selectivo de testículo y son homólogos del gen *doublesex* de *Drosophila* que participa en la cascada de determinación sexual (Vaiman et al, 2000; Western et al, 2001).

ALGUNAS INTERACCIONES DE LOS GENES DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL

Se ha demostrado que se requiere al gen *SOX9* para que se inicie la producción de *MIS* mientras que *SF1* interacciona físicamente con el promotor de *SOX9* para regular positivamente a *MIS* (De Santa Barbara et al, 1998). En el ratón, se ha probado que la isoforma *WT1-KTS* junto con *SF1* tienen una función clave en la formación de la gónada bipotencial. Ratones XY carentes de esta isoforma, desarrollan ovarios (Clarkson et al 2002). Además, se ha demostrado que la isoforma *WT1-KTS* junto con *SF1* actúan de manera sinérgica para regular en forma positiva la expresión de *MIS* (Parker et al, 1999). El gen *DAX1* tiene una función en la gametogénesis y en el desarrollo endocrino, pero su función en la determinación sexual es poco clara. La

duplicación de este gen resulta en reversión sexual XY, lo que sugiere que tiene una acción anti-testículo (Swain et al, 1998). Experimentos *in vitro* han demostrado que *DAX1* puede reprimir la acción sinérgica de WT1-SF1 en el promotor de *MIS*, lo que resulta en una regulación negativa de esta hormona. En ratón se demostró que *Wnt4* regula en forma positiva la expresión de *Dax1*. Este último gen contiene una secuencia de repetidos en la región amino terminal que interactúa con *Sf1* y reprime su transcripción. En una gónada femenina, esto resultaría en la supresión de genes "rio abajo" de *SF1*, tales como *MIS* u otros genes esteroidogénicos (Vainio et al, 1999; Sinclair, 2001).

REVERSION SEXUAL

Cada evento que ocurre en el proceso del desarrollo sexual depende del paso precedente y en condiciones normales hay concordancia entre el sexo cromosómico, gonadal y fenotípico. Sin embargo, existen casos en donde se presenta discordancia entre el sexo cromosómico y gonadal-fenotípico (varones XX y mujeres XY), y casos donde se observa una diferenciación gonadal ambigua, con desarrollo ovárico y testicular en un solo individuo (hermafroditas verdaderos). Estos estados se denominan reversión sexual y en algunos de ellos (reversión sexual XY) se ha demostrado que son causados por mutaciones en genes importantes para la determinación sexual (Vaiman et al, 2000; Vilain, 2001).

El análisis de estos individuos ha permitido identificar diversos genes, autosómicos o ligados al cromosoma X, implicados en la determinación sexual.

REVERSIÓN SEXUAL XX

Se refiere a la diferenciación testicular en ausencia aparente del cromosoma Y, lo que origina individuos con fenotipo masculino y cariotipo 46, XX (de la Chapelle, 1981). Existen dos tipos de reversión sexual XX: hermafroditas verdaderos XX y varones XX (VXX).

El síndrome de varón XX se presenta con una frecuencia de 1 en 20'000-25'000 recién nacidos vivos varones (de la Chapelle, 1981). Esta anomalía constituye una entidad clínicamente parecida al síndrome de Klinefelter XXY por tener testículos pequeños e infertilidad. Sin embargo, los VXX son de estatura más baja, la ginecomastia es más común y algunos casos exhiben anomalías genitales (de la Chapelle, 1981; Ferguson-Smith et al, 1990; Boucekkine et al, 1992; Reddy et al, 1997; Sarafoglou y Ostrer, 2000). Las manifestaciones clínicas más comunes de los pacientes con el síndrome de varón XX son: hipogonadismo, ginecomastia, testículos pequeños y azoospermicos con túbulos seminíferos hialinos y niveles hormonales alterados durante la pubertad. Aunque la mayoría de estos individuos tienen genitales externos masculinos normales, el 10% de ellos muestra varios grados de ambigüedad genital, (incluyendo criptorquidismo, hipospadias y seno urogenital siempre con esterilidad debido al desarrollo testicular reducido) por lo que pueden ser diagnosticados al nacimiento o durante la infancia (Fechner et al, 1993; Margarit et al, 1998). Clínicamente, estos pacientes se clasifican en dos categorías: VXX con genitales normales (con o sin ginecomastia) y VXX con ambigüedad genital (Boucekkine et al, 1992; 1994).

Mediante estudios moleculares se ha determinado que existen dos grupos de varones XX: los que presentan material del cromosoma Y, incluyendo a *SRY* y

que representan el 90% de los casos y el 10% restante que corresponde a aquellos individuos negativos para *SRY* (Ferguson-Smith, 1990; Pereira et al, 1991). La mayoría de los pacientes masculinos 46,XX *SRY*(+)s presentan genitales normales, a diferencia de los varones XX con ambigüedad genital que casi siempre son negativos para *SRY* (Ferguson-Smith et al, 1990; Numabe et al, 1992; Fechner et al, 1993, McElreavey et al, 1993). Sin embargo, se puede identificar una amplia variedad de fenotipos en los VXX; así se han descrito casos *SRY* (-)s sin ambigüedad genital (Vergnaud et al, 1986; Kuhnle et al, 1993; McElreavey et al, 1993; Vilain et al, 1994; Boucekkine et al, 1994; Ramos et al, 1996; Zenteno et al, 1997; Kolon et al, 1998) e individuos masculinos con ambigüedad genital y positivos para *SRY* (Palmer et al, 1989; Boucekkine et al, 1992; McElreavey et al, 1993). Para estos últimos casos, Kusz et al. (1999) sugirieron que la distribución del patrón de inactivación del X que porta una región de Yp translocada conteniendo *SRY* y la selección de esta línea celular podría ser el mecanismo principal que explicara la ambigüedad genital (Kusz et al, 1999). En conjunto, estos datos sugieren que las condiciones que originan individuos masculinos 46,XX en ausencia de *SRY* son genéticamente heterogéneas (Fechner et al, 1993).

Se han descrito tres mecanismos para explicar la etiología de los varones XX:

- a) Translocación de secuencias del factor determinante de testículo del cromosoma Y al X,
- b) Un mosaico no detectado con una línea celular que porta al cromosoma Y (Miro et al, 1978) y
- c) Mutaciones, aún no descritas, en el cromosoma X o en autosomas que permitan determinación testicular en ausencia de *SRY* (de la Chapelle et al, 1977).

(a) Mediante estudios citogenéticos y moleculares se ha demostrado que los VXX SRY(+)'s se originan de un intercambio ilegítimo X-Y en la meiosis paterna. Durante la meiosis masculina normal, ocurre un entrecruzamiento obligatorio entre los cromosomas X y Y en una región homóloga localizada en el extremo de sus brazos cortos (PAR1), asegurando la segregación apropiada de estos gonosomas. Aunque el apareamiento entre el X-Y se extiende por fuera de PAR1, la región sexo-específica normalmente no recombina. Sin embargo, ocasionalmente ocurre una recombinación ectópica dentro de la región sexo-específica del Y, incluyendo al gen SRY que se localiza a 35Kb de PAR1. De este modo se transfiere la porción terminal de Yp como un solo bloque al brazo corto del cromosoma X paterno (Fig. 2) (Weil et al, 1994). El patrón de secuencias del Y presentes en VXX muestra gran diversidad en el tamaño del segmento translocado, que siempre incluye a SRY) (Kusz et al, 1999).

(b) de acuerdo con la teoría del mosaicismo, existe una línea celular con un cromosoma Y en una baja proporción ya sea en áreas circunscritas, en una etapa temprana del desarrollo y haber sido eliminado o limitado a gónadas (de la Chapelle et al, 1977; Abbas et al, 1990). Esto ya ha sido confirmado con los trabajos de Miro et al, 1978.

(c) la inducción de tejido testicular en ausencia de SRY, puede ser resultado de una mutación en un gen autosómico o ligado al X relacionado con la determinación sexual. Existen varias hipótesis acerca de un gen autosómico determinante de testículo (TDFA) que regula en forma negativa el desarrollo sexual masculino (McElreavey et al, 1993; Kolon et al, 1998), pero hasta la

fecha el único gen autosómico relacionado con reversión sexual XX en humanos y murinos es SOX9/Sox9 (Huang et al, 1999; Vidal et al, 2001).

Desde que se documentó el primer caso clásico de VXX (de la Chapelle, 1977) se han reportado numerosos casos, la mayoría de ellos de tipo esporádico (Margarit et al, 1998; Kolon et al, 1998). En la literatura se han informado cinco casos con dos o más individuos afectados en la misma familia (Nicolis et al, 1972; de la Chapelle et al, 1977; Minowada et al, 1979; Abbas et al, 1990; Zenteno et al, 1997). Adicionalmente, se han descrito algunas familias donde coexisten varones XX con hermafroditas verdaderos (HV), lo que sugiere que ambas entidades podrían tener un origen genético común (Kasdan et al, 1973; Skordis et al, 1987; Palmer et al, 1989; Pereira et al, 1991; Kuhnle et al, 1993; McElreavey et al, 1993; Ramos et al, 1996; Jarrah et al, 2000). Es importante señalar que en estas familias, la mayoría de los pacientes presentan ambigüedad genital y el estudio molecular no detectó SRY, excepto para el caso reportado por Palmer et al (1989).

La ausencia de SRY en 10% de los VXX y en la mayoría de los HVXX demuestra que este gen no es el único necesario para la determinación de testículo. Es muy probable que exista un mecanismo "río bajo" en la ruta de este gen que active el interruptor de la diferenciación de las células de Sertoli. La evaluación de los árboles genealógicos de las familias donde coexisten HV y VXX sugiere que el factor(es) genético responsable puede ser transmitido a los varones a través de padres 46, XY que aparentemente son normales (Skordis et al, 1987; Ramos et al, 1993) o de madres 46, XX normales (Kuhnle et al, 1993). Esto indica la probable participación de un factor autosómico determinante de testículo (TDFA); sin embargo, no se puede excluir un factor

ligado al X como ha sido sugerido previamente (Kasdan et al, 1973; de la Chapelle et al, 1987; Abbas et al, 1990; Pereira et al, 1991; McElreavey et al, 1993; Zenteno et al, 1997; Slaney et al, 1998, Sarafoglou y Ostrer, 2000). Por otro lado, aunque el patrón de herencia en los casos familiares de reversión sexual XX no es claro, se han sugerido mutaciones recesivas (autosómicas o ligadas al X) como responsables de la determinación testicular en estos individuos (de la Chapelle et al, 1987; McElreavey et al, 1993). También, se ha documentado reversión sexual XX en animales domésticos y ésta se ha atribuido a un modo de herencia recesivo monofactorial (McElreavey et al, 1993).

En familias donde algunos individuos afectados son VXX y otros son HVXX, varios autores han hipotetizado que además del defecto genético deben existir otros factores tales como sensibilidad individual a TDF y/o condiciones que modifiquen el ambiente e influyen la diferenciación gonadal resultando en diferentes fenotipos (Skordis et al, 1987). Otra posibilidad sería un modelo autosómico o ligado al X con efecto umbral; aquéllos casos que exceden el umbral resultarían varones 46,XX mientras que cuando no lo exceden el fenotipo sería HV 46,XX (Sarafoglou y Ostrer, 2000). Este modelo de herencia también considera expresividad variable y penetrancia incompleta. En el caso de suponer una mutación en un gen ligado al X como responsable de diferenciación testicular en estos desórdenes, los diversos fenotipos se explicarían por un patrón diferente de inactivación del X: inactivación al azar en HVXX e inactivación no al azar en VXX (Kuhnle et al, 1993).

PROPUESTAS PARA EXPLICAR DIFERENCIACIÓN TESTICULAR EN AUSENCIA DE *SRY*

Aunque *SRY* es suficiente para la determinación testicular, éste no es necesario bajo todas las circunstancias. Como he mencionado anteriormente, se han descrito varones 46,XX con tejido testicular pero sin evidencia de *SRY* (Berkovitz 1992; Vilain et al, 1994). Para explicar estas observaciones se ha postulado que *SRY* reprime un inhibidor del desarrollo masculino. McElreavey et al (1993) postularon la presencia de un *locus* autosómico Z, que apaga los genes determinantes de la ruta masculina. En los varones normales, *SRY* regula en forma negativa este *locus*, lo que permite que se activen los genes determinantes de la ruta masculina (GRM) y se desarrolle testículo (figura 3a). En las mujeres normales Z está activo (ya que no existe *SRY*) y apaga los genes GRM, ocasionando el desarrollo femenino (figura 3b). Este modelo podría explicar la etiología de los varones XX *SRY* negativos y de las mujeres 46,XY que portan una copia normal de *SRY* (Vilain et al, 1994). Una mutación recesiva en Z en VXX, impediría que se apaguen los GRM (figura 3c). En las mujeres XY una mutación en Z podría hacerlo insensible a *SRY* e inhibir los GRM, a pesar de la presencia de un producto funcional de *SRY* (figura 3d) (McElreavey et al, 1993). Tres años más tarde, Jiménez y colaboradores (1996) postularon que el *locus* DSS ligado al X podría actuar como un regulador negativo de la ruta masculina. Este modelo propone que la copia activa de DSS inhibe la determinación masculina en las mujeres XX, mientras que en los varones XY la copia funcional de DSS es inactivada por *SRY*. De tal forma, que si *SRY* está presente como en los varones normales, *DAX1* estaría inhibido, la ruta femenina estaría apagada y permitiría el desarrollo testicular. Si *SRY* está

ausente, como en las mujeres normales, *DAX1* continuaría activando la ruta femenina e inhibiendo la masculina (Jiménez et al, 1996).

PARTICULARIDADES DEL CROMOSOMA X

De los casi 30'000 genes que constituyen el genoma humano, el hombre y la mujer difieren solamente en los dos cromosomas sexuales, X y Y; y al parecer, de estos únicamente una docena de genes participa en los procesos de determinación y diferenciación sexual. Más aún, se sabe que el cromosoma Y posee aproximadamente 30 genes, muchos de los cuales están involucrados en funciones de tipo constitutivas o en la regulación de la producción de espermatozoides. El cromosoma X es mucho más grande (5% de la longitud total de un juego de cromosomas) y tiene miles de genes (3000-4000) con una amplia gama de funciones (Graves, 2000).

Pero, ¿qué tan dominante es el cromosoma Y? Dado que sólo uno de los cromosomas X está activo, los fenotipos de individuos con cariotipos XO y XXY dicen poco acerca de un balance potencial. Se ha sugerido la existencia de genes activos del X que hacen el balance del factor determinante de testículo (Graves, 2000; Burgoyne et al, 2001). Aunque aún no se han descrito genes de esta clase, se conoce al menos un gen en Xp, *DAX1*, causante de reversión sexual XY al estar duplicado (Zanaria et al, 1994).

Existen varios estudios donde se sugiere que en humanos los genes no están distribuidos al azar en el genoma y hay un aparente exceso de genes relacionados con el sexo (GRS) y con la reproducción en el cromosoma X; de hecho, se ha descrito que la probabilidad de encontrar un GRS en el X es tres veces mayor que en cualquier autosoma (Hurst y Randerson, 1999; Saifi et al,

1999). En algunos roedores se ha comprobado la función del cromosoma X en la determinación sexual primaria y de acuerdo con la ley de Ohno debe existir al menos un gen en el X que pueda bloquear la función de *SRY* en los mamíferos euterios (Watchel, 1998; Hurst y Randerson, 1999).

En la evolución, los cromosomas X y Y se diferenciaron a partir de un par antiguo de autosomas homólogos con la degradación progresiva del Y. Se ha comprobado también, que muchos de los genes del Y tienen homólogos en Xp, dentro de regiones que se han adherido a los cromosomas sexuales a través del tiempo. De tal forma que, la mayor parte del Y evolucionó de genes ahora representados en el X (que derivaron de esta adhesión reciente). Por ejemplo, *SRY* tiene su homólogo en el X, *SOX3* (Xq27-28). Este último par de genes se considera de los más viejos en la PAR X-Y (Lahn y Page, 1999; Graves, 2000). Además, mutaciones en el gen *ATRX* causan reversión sexual XY; sin embargo es evidente que el homólogo *ATRY* se ha perdido en mamíferos euterios (Graves et al, 1998; Graves, 2000). Hasta hace muy poco se consideraba al cromosoma X como sexualmente neutral o como el especialista en características femeninas; pero hallazgos actuales indican que el cromosoma X tiene una especialidad en la producción de espermatozoides muy parecida a la del Y (Graves, 2000; Beale, 2001). El panorama del Y frente al X ya no parece tan dominante, la ley de Ohno se cumple y aparece el primer gen de reversión sexual en el X y es muy probable que exista otro gen(es) ligados al X con una función más directa en la determinación sexual. La incógnita que queda por contestar es si el activador de *SRY* también se encontrará en el X (Watchel, 1998).

MICROSATELITES

El genoma humano contiene una cantidad considerable de DNA repetitivo que incluye tanto a DNA que no codifica, como a genes de múltiples copias y fragmentos génicos. Las secuencias de DNA repetitivo transcripcionalmente inactivas muestran dos tipos de organización: las dispersas y las repetidas en *tándem* (ordenadas unas tras otras). Estas últimas ocurren en diferentes localizaciones cromosómicas y dependiendo del tamaño promedio de las unidades repetidas, esta familia de DNA altamente repetitivo y no codificante puede agruparse en cuatro subclases: megasatélite o macrosatélite, satélite, minisatélite y microsatélite. Se ha postulado que en muchos casos estas secuencias se mantienen únicamente por su habilidad para replicar dentro del genoma; a lo que se le conoce como la hipótesis del "DNA egoísta" (Weber y Mai, 1989; Charlesworth et al, 1993; Bruford et al, 1993; Pérez-Lezaun et al, 1997; Bennet, 2000).

El DNA satélite está constituido por secuencias repetidas en tándem y altamente repetitivas, las secuencias minisatélite y microsatélite son secuencias repetidas en tándem, moderadamente repetitivas. En la eucromatina del genoma humano, existen al menos 30 000 *loci* microsatélites (Dib et al, 1996). A estos marcadores también se les conoce como repetidos cortos en tándem o STRs (*short tandem repeats*). La unidad de repetición en un microsatélite puede ir desde dos a siete nucleótidos en longitud (tipo dinucleótido y heptanucleótido, respectivamente) y en general, el número de nucleótidos por unidad de repetición es el mismo para la mayoría de los repetidos dentro de un *locus* particular. Se estima que del total de *loci* microsatélites hay alrededor de 100'000 secuencias del tipo (CA)*n* distribuidas

a lo largo de todo el genoma, o sea que en promedio habrá una secuencia polimórfica (CA)_n cada 30 Kb de ADN; y además hay una cantidad similar de secuencias (GT)_n (Dib et al, 1996).

Los alelos de diferentes longitudes son posibles ya que el número de unidades de repetición de un *locus* microsatélite es variable. Debido a su abundancia y ubicuidad, los microsatélites se han utilizado como marcadores genéticos potenciales para establecer un ligamiento entre diferentes grupos de organismos y para identificar varios *loci* de rasgos cuantitativos. Si se conocen las frecuencias del alelo, las regiones microsatélite son muy útiles en la identificación y parentesco de individuos. Particularmente, en el ligamiento genético, son muy útiles desde la aparición de mapas genéticos, para la localización de nuevos genes involucrados en una amplia gama de padecimientos (Weissenbach, 1993; Jarne et al, 1998; Bennet, 2000).

ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

El ligamiento refleja la tendencia de los segmentos de una molécula de DNA a permanecer asociados después de la recombinación meiótica. El estudio actual de ligamiento de genes humanos se ha desarrollado mucho, gracias al uso de marcadores moleculares de ADN (no génicos). La gran utilidad de los marcadores moleculares para el estudio de ligamiento de genes, reside en dos características de éstos: a) son sumamente polimórficos; b) son muy abundantes dentro del genoma humano (Weissenbach, 1993; Whittemore, 1996; Solari, 1996; Strachan y Read, 1999).

Los estudios de ligamiento se efectúan en centros especializados, tales como Centre d'Etude du Polymorphismes Humaines (CEPH), de París, Francia en donde se encuentran disponibles cultivos de tejidos de todas las personas

integrantes de un número de familias especialmente elegidas por poseer al menos tres generaciones sucesivas para su estudio, con un número sustancial de hijos. Estos ejemplares de ADN han sido ampliamente estudiados, tanto en sus *loci* génicos como en sus marcadores moleculares. Por otra parte esta información está disponible en bases de datos sobre el genoma humano (Weissenbach, 1993; Solari, 1996; Kohli, 2001).

Dado que las familias tienen usualmente un número escaso de hijos para poder definir el ligamiento de rasgos, se ideó un método estadístico que permite sumar los datos de varias o muchas familias, referidos a un mismo par de genes o marcadores. Este método de "lods" (del inglés *logarithm of odds*) es una medida de la probabilidad de que dos alelos están efectivamente ligados y no asociados por azar; se designa por la letra Z, y es el logaritmo del cociente entre la probabilidad de ligamiento y la probabilidad de asociación independiente (por azar), para una tasa dada de recombinación entre esos dos alelos (TR): $Z = \log \left[\frac{\text{pr (lig)}}{\text{pr (ind)}} \right]$. Los valores de Z pueden variar generalmente entre -3 y +3, y son considerados:

Z=3	Ligamiento establecido
Z=2	Ligamiento muy probable
Z entre 1 y 0	Ligamiento posible
Z entre 0 y -1	Posible asociación al azar
Z= -2	Asociación al azar establecida

Los lods de los mismos pares de alelos en familias separadas, se pueden sumar, hasta llegar a un valor que permita definir la prueba de ligamiento o su falta (Solari, 1996; Strachan y Read, 1999; Kohli, 2001)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto que la masculinización completa o parcial en varones XX, carentes de SRY, se deba a defectos en otro(s) gen(es) autosómicos o ligados al X. Además, en los casos familiares el análisis de los árboles genealógicos de estos individuos conduce a la hipótesis de que portan mutaciones recesivas responsables de la determinación testicular. Sin embargo, no existen estudios de ligamiento que ayuden a detectar estos genes.

OBJETIVO

- Establecer o descartar ligamiento entre un caso familiar de reversión sexual 46,XX y el cromosoma X, mediante la utilización de marcadores microsatélites.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto que la masculinización completa o parcial en varones XX, carentes de SRY, se deba a defectos en otro(s) gen(es) autosómicos o ligados al X. Además, en los casos familiares el análisis de los árboles genealógicos de estos individuos conduce a la hipótesis de que portan mutaciones recesivas responsables de la determinación testicular. Sin embargo, no existen estudios de ligamiento que ayuden a detectar estos genes.

OBJETIVO

- Establecer o descartar ligamiento entre un caso familiar de reversión sexual 46,XX y el cromosoma X, mediante la utilización de marcadores microsatélites.

METODOLOGIA



MATERIAL Y METODOS

PACIENTES

Se estudió una familia no consanguínea, con dos varones XX negativos para *SRX*, reportado por Zenteno et al. (1997). Además de los individuos afectados (II-3 y II-6), se incluyeron a sus padres (I-1 y I-2), un hermano (II-7) y una hermana (II-2) sanos (Fig. 3).

El motivo de consulta del propósito (II-3) fue ginecomastia que inició desde los trece años.

EXTRACCION DE DNA GENOMICO

Previo consentimiento informado, se obtuvieron 3 ml de sangre periférica, se mezclaron con anticoagulante EDTA y se homogeneizaron por inversión. Se eliminó el paquete de los glóbulos rojos por centrifugación selectiva a 3000rpm durante 6 min y se rompieron las células con amortiguador de lisis TTS (Tris 10 mM pH 7.6-8.0, tritón al 1% y sacarosa 300mM). Se lavó el precipitado varias veces hasta que el botón quedó blanco. Enseguida se adicionó cloruro de sodio (NaCl) de menor a mayor concentración (5mM a saturado) para eliminar proteínas, se agitó. Se adicionó y se mezcló dodecil sulfato de sodio (SDS) como detergente más agresivo para romper la membrana nuclear. Esta reacción se centrifugó a 10000rpm/30min/4°C. Se recuperó la malla del DNA y se precipitó con etanol absoluto. En este paso, la muestra se dejó reposar un mínimo de 2h a -20°C y luego se lavó con etanol al 70%. Se evaporó el etanol en un desecador al vacío, sin temperatura. Finalmente, se resuspendió la muestra de DNA en un volumen adecuado de amortiguador TE (Tris 10 mM,

EDTA 1 mM, pH 8.0) y se almacenó a -20°C hasta su uso (Buffone y Darlington, 1985; Kempter y Grossbadem, 1992).

CUANTIFICACION DE DNA GENOMICO

Se realizó mediante dos técnicas: minigel de agarosa y fluorometría. La primera de ellas consiste en analizar un gel de agarosa muy delgado al 0.8% (p/v), disuelto en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M, y EDTA 0.001 M) y teñido con bromuro de etidio (0.0005%). En él, se aplicó una alícuota de $1\ \mu\text{L}$ de las muestras problema (de concentración desconocida) junto con una curva de un DNA estándar de $100\ \text{ng}/\mu\text{L}$ en concentraciones crecientes (de 50 en 50ng), desde 50 hasta $500\ \text{ng}/\mu\text{L}$. Las muestras se separaron por electroforesis. El gel se analizó en una lámpara de luz ultravioleta (UV) y mediante la comparación de la intensidad de las bandas con el patrón se calculó la concentración de las muestras (Sambrook et al, 1989).

La cuantificación del DNA mediante fluorometría está basada en la teoría de la fluorescencia. Los átomos o moléculas que fluorescen tienen espectros de excitación y emisión bien definidos, lo que permite un análisis cualitativo y cuantitativo del material. En este caso, se empleó un fluorómetro DyNA Quant modelo 200 (HOEFER) que tiene una longitud de onda fija de 365 nm de excitación y 460 nm de emisión. Estas características de espectro están diseñadas para la cuantificación de cantidades pequeñas de DNA en presencia de proteína, RNA y nucleótidos, contaminantes comunes, que interfieren con la determinación convencional por absorbencia en la región de UV. Para ello, se preparó un estándar de DNA de concentración conocida ($100\ \text{ng}/\mu\text{L}$) en amortiguador TEN (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 7.4 y NaCl 0.1 M) y se le agregó colorante fluorescente Hoechst 33258 ($1\ \text{mg}/\text{mL}$). El equipo se calibró

introduciendo una celda con el estándar de DNA. Se tomaron 2 μ l de cada muestra de concentración desconocida y se mezclaron con 2 μ l del colorante en TEN. Se realizaron dos lecturas por cada muestra y se promediaron para el cálculo de la concentración de DNA en cada una de ellas.

Si por ambos métodos de cuantificación de DNA las lecturas eran parecidas, entonces se promediaban las lecturas, en caso contrario se repetía la determinación. Una vez cuantificada cada muestra, se realizaron las diluciones correspondientes para obtener soluciones de DNA de cada muestra en una concentración final de 20 ng/ μ L.

AMPLIFICACION DE REGIONES MICROSATELITE

Inicialmente, se utilizaron dieciocho marcadores microsátélites del cromosoma X (Fig. 4) contenidos en el panel 28 del ABI PRISM LINKAGE MAPPING SET VER 2.0 PE (Applied Biosystems). El panel consiste en pares de oligonucleótidos para PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que amplifican *loci* microsátélites tipo (CA/GT)_n y que abarcan todo el cromosoma X (desde Xp22.3 hasta Xq28). En cada par el oligonucleótido sentido (5'-3') va marcado con un fluorocromo (6FAM, HEX o NED) y el antisentido presenta una cola de poli-adeninas en su región 5' para evitar la adición inespecífica de nucleótidos en la amplificación por PCR. Los marcadores están separados entre sí por una distancia promedio de 10 cM (Panel 28 *ABI Prism Linkage Mapping Set User's Manual PE*, 1997). Adicionalmente, se requirieron once marcadores que amplifican específicamente regiones microsátélite ubicadas en la región Xp21.3-p21.1 (Fig. 4). Las características de estos pares de oligonucleótidos son como las del panel descrito ya que se solicitó su síntesis

al mismo proveedor. Las secuencias y características de los veintinueve marcadores están contenidas en los anexos 1, 2 y en la figura 2 de resultados.

Después de estandarizar la PCR, la mezcla de reacción fue la siguiente:

COMPONENTE DE LA REACCION	VOLUMEN (μL)
Mezcla del par de oligonucleótidos (5 μM de cada uno)	1.0
DNA (40ng)	2.0
Amortiguador 10X (Gene Amp PCR Buffer II)	1.0
Mezcla de dNTPs (2.5 mM)	1.0
DNA polimerasa Ampli Taq Gold™ (5U/ μl)	0.08
MgCl ₂ (25 mM)	1.0
Agua estéril c.b.p.	3.92
Mezcla total	10

Las condiciones de amplificación se estandarizaron para los veintinueve marcadores en una sola reacción y fueron las siguientes:

Desnaturalización previa a 95° C durante 12 min

94°C-15s	Diez ciclos
55°C-15s	
72°C-30s	
89°C-15s	Veintidós ciclos
55°C-15s	
72°C-30s	

Extensión final a 72°C durante 10 min.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL ANALIZADOR GENETICO

1• PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR POR COLUMNAS DE FILTRACION EN GEL

Se hace pasar el producto de PCR a través de una columna de sefarosa de poro medio o fino (sephadex G-50) y por centrifugación selectiva (3000 rpm/ 6 min) se recupera el producto limpio (Sambrook, 1989).

2 • MEZCLAS DE LOS PRODUCTOS DEPENDIENDO DEL FLUOROCROMO QUE PORTEN

Se hace en las siguientes proporciones 1FAM:2HEX:3NED. Esta mezcla se diluye 1:1000 en agua estéril y se toma 1µl por cada 12 µl de ROX 350: formamida como estándar de tamaños (en una proporción 1:24).

Se desnaturalizan las mezclas de reacción a 95°C/5 min e inmediatamente se ponen en hielo hasta el momento de ser aplicadas en el analizador genético. Posteriormente, se siguen las instrucciones sugeridas por el proveedor (*Gene Scan Users Manual PE*, 1999).

SEPARACION DE LAS MUESTRAS POR ELECTROFORESIS EN CAPILAR Y ANALISIS MEDIANTE EL PROGRAMA GENESCAN

Los productos de PCR con fluorescencia 6FAM, HEX o NED se separan por electroforesis en capilar en el analizador genético ABI PRISM 310 PE, donde son analizados mediante el programa *Genescan*. El analizador genético utiliza un sistema de detección multicolor para distinguir alelos que se traslapan, además determina el tamaño preciso de los productos de PCR a través de un estándar interno de tamaños, que se distingue de las muestras por estar marcado con un fluorocromo diferente, ROX-350 (Fig. 5b). Cada colorante fluorescente emite un espectro continuo de luz después de la excitación de un rayo láser. Durante una corrida de electroforesis, el sistema *ABI PRISM 310* graba la intensidad de fluorescencia como una función de tiempo y longitud de onda. Una matriz de corrección de multi-componentes se aplica a los datos de intensidad de fluorescencia y ya resueltas son codificadas en forma de color y desplegadas como picos en un electroferograma. El programa cuenta con

diferentes patrones para interpretar estos resultados como homocigoto o heterocigoto. En el eje de las abscisas de cada electroferograma se localiza el tamaño de los alelos en pares de bases (pb) y en el eje de las ordenadas está una escala arbitraria de emisión de fluorescencia (Fig. 5a y 5b) (*Gene Scan User's Manual PE*, 1999).

DETERMINACION DE FRECUENCIAS ALELICAS (GENÉTICA DE POBLACION EN MEXICANOS)

Se determinaron las frecuencias alélicas en población Mexicana de veintidós de los marcadores del cromosoma X empleados (DXS1061, DXS8039, DXS985, DXS992, DXS1218, AFMA082XB9, DXS1235, DXS1036, DXS1067, DXS997, DXS8014, DXS991, DXS986, DXS990, DXS1106, DXS8055, DXS1001, DXS1047, DXS1227, DXS8043, DXS8091 y DXS1073). La muestra consistió en un total de 20 individuos originarios de diferentes estados de la República Mexicana: 15 estudiantes del laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Pediatría-Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y 5 estudiantes de la Escuela Médico Militar, obteniendo un total de 30 cromosomas independientes (10 mujeres y 10 hombres).

Las frecuencias alélicas de los marcadores restantes se calcularon en un máximo de 130 cromosomas y se encuentran en la tesis de Oscar Vázquez Mena (CICATA-IPN 2000).

En cada corrida de electroforesis, además de las muestras de los pacientes y controles mexicanos, se adicionó una muestra de DNA control del individuo 1347-02 del CEPH (<http://www.ceph.fr>) Cada muestra se realizó por duplicado y se le calculó promedio y desviación estándar del tamaño de alelo crudo. Los valores de los alelos se ordenan de menor a mayor tamaño (en pb) y se les

asigna un número de alelo al compararlo con los del DNA control reportados en la base de datos del CEPH. Los alelos reales se ordenaron de menor a mayor tamaño y se les asignó un número, de acuerdo a su frecuencia (tabla 1).

ANALISIS DE LIGAMIENTO

Para los estudios de simulación, así como para los análisis de ligamiento de dos puntos y de múltiples puntos se emplearon los programas: LINKAGE 5.1 (Schork et al, 1993) y la versión sexo-ligada de GENEHUNTER PLUS (Kong y Cox, 1997), asumiendo un rasgo recesivo ligado al X, con una frecuencia alélica de la enfermedad de 0.00632 y penetrancia completa. Para hombres y mujeres se consideraron valores iguales de fracción de recombinación (θ). Los análisis de simulación se llevaron a cabo usando las frecuencias alélicas del marcador DXS1214 que se determinaron en 130 cromosomas independientes de individuos sanos, no relacionados de la población Mexicana-mestiza (Vázquez Mena Oscar, CICATA 2000). El orden de los marcadores y las distancias intra-marcadores se obtuvieron del mapa del cromosoma X de la base de datos electrónica de Marshfield. La reconstrucción de los haplotipos se realizó de acuerdo a los principios de Thompson, con el mínimo número de eventos de recombinación en cada individuo (Thompson, 1987).

RESULTADOS

Genotipificación

La búsqueda inicial de una región en el X asociada a reversión sexual XX se llevó a cabo con los 18 marcadores del panel 28, PE Biosystems (Fig. 3). Al analizar los haplotipos (tabla2), se encontró lo siguiente: Cinco de estos marcadores fueron no informativos debido a homocigosidad en la madre (I-2), mientras que los restantes, excepto DXS1214, no mostraron ninguna relación con la reversión sexual XX. En el *locus* DXS1214, el alelo materno fue el mismo en ambos hermanos XX afectados (287 pb) (Fig. 3, tabla 1) y diferente al heredado por la hermana XX sana (291 pb). Para confirmar si esta región cromosómica realmente estaba asociada con la enfermedad, se analizaron once marcadores adicionales, todos localizados alrededor de DXS1214 (señalados en negritas y cursivas en Fig. 3). Cinco de estos microsatélites se comportaron de igual manera que DXS1214: DXS1218, DXS1235, DXS1036 y DXS1067 (teloméricos a DXs1214), y DXS997 (centromérico a DXS1214). Todos estos marcadores comprenden en una región de 2.11 cM (área encuadrada en Fig. 3). Los individuos afectados fueron homocigotos para seis de los siete repetidos (CA)_n contenidos en este segmento (lo que representa el 85.7%), mientras que AFMa087xb9 no resultó informativo. Se observa que este porcentaje de homocigosidad es mucho más alto dentro de la región de interés que fuera de ella: 13.6% y 18.2% para II-3 y II-6, respectivamente ($p < 0.05$ en prueba de Fisher). Además, la reconstrucción de haplotipos mostró que ambos pacientes, sus progenitores, su hermano y hermana sanos comparten los mismos alelos entre los marcadores DXS1218 y DXS997 (Fig. 3). Los pacientes fueron homocigotos para este segmento cromosómico, mientras que

los varones XY (I-1 y II-7) fueron hemicigotos y las mujeres XX (I-2 y II-2) resultaron heterocigotas. Es interesante notar que la heterocigosidad en la hermana se debió a un evento de recombinación. La búsqueda de un gen candidato dentro de este intervalo reveló que DSS fue el único *locus* relacionado con determinación sexual

Un ejemplo de segregación de marcadores en la familia problema y una interpretación del electroferograma (EFG) de GeneScan se observan en las figuras 5a y 5b

Análisis de ligamiento

Los análisis de ligamiento de dos y de múltiples puntos generaron un valor positivo de LOD score para los marcadores localizados en el intervalo identificado de 2.11 cM en la región Xp21.3-p21.1. En el análisis de ligamiento de dos puntos se obtuvo un valor máximo de LOD score de 0.578 para todos los marcadores localizados dentro del intervalo 31.49 a 33.60 cM (incluyendo: DXS1218, DXS1235, DXS1036, DXS1067, DXS1214 y DXS997) (Fig. 4). Cabe mencionar que aunque el marcador AFMa082xb9 está incluido en este intervalo, no fue informativo debido a homocigosidad en la madre. Al usar el programa GENEHUNTER PLUS en su versión ligada al X, se obtuvo un valor de $Z=0.6$ entre los marcadores DXS1218 y DXS997 (Fig. 6) Estos resultados concuerdan con los estudios de simulación en los que se esperaba un valor de $Z=0.64$ a $\theta = 0.0$, con DXS1218.

DISCUSION

La presencia del gen *SRY* conduce la determinación testicular y el desarrollo del fenotipo masculino en la mayoría de los varones XX (Fechner et al, 1993). Se ha propuesto que mutaciones en otro(s) gen(es) autosómicos o ligados al X sean las responsables para la etiología de los VXX *SRY*(-)'s (Ferguson-Smith et al, 1990; McElreavey et al, 1993). Sin embargo, hasta la fecha no se ha localizado ningún *locus* candidato en reversión sexual XX en casos familiares. Huang y colaboradores describieron un caso esporádico de VXX *SRY*(-) con duplicación de *SOX9* como responsable de la determinación testicular (Huang et al, 1999). Además, al momento de escribir este trabajo se documentó en la literatura que *Sox9* induce desarrollo testicular en ratones transgénicos XX lo que indica que al menos en algunos casos, *Sox9*, puede sustituir la función del gen de determinación sexual, *Sry* (Vidal et al, 2001).

Los datos obtenidos en el presente trabajo, demuestran por primera vez ligamiento de una región específica del cromosoma X a reversión sexual XX. Esta región se localiza en Xp21.3-Xp21.1 y abarca 2.11 cM. El análisis de ligamiento reveló un valor de *LOD score* máximo de $Z=0.6$ desde el marcador DXS1218 hasta el marcador DXS997 (Figura 6). Esto último concuerda con el valor máximo esperado por los estudios de simulación ($Z=0.64$). Cabe mencionar que aunque con familias pequeñas no se puede alcanzar un alto poder de Z (Ostrer H, 2001), estos datos indican que la probabilidad de que la región esté ligada a la enfermedad es de 5:1.

Hasta la fecha no se ha establecido ningún modo de herencia en los casos familiares de reversión sexual XX. La homocigosidad observada para el haplotipo en Xp21.3-p21.1 en los individuos afectados sugiere que esta

condición puede estar ligada al X en forma recesiva. De acuerdo con este patrón, la madre y la hermana son heterocigotas, mientras que el padre y el hermano son hemicigotos.

Basándose en casos familiares de reversión sexual XX con un probable patrón de herencia recesivo, McElreavey y cols. (1993) propusieron un modelo para explicar la determinación sexual masculina en donde *SRY* antagoniza un represor autosómico recesivo de la ruta masculina, denominado Z. De acuerdo con este modelo, las mutaciones nulas homocigotas en Z producen una de-represión del desarrollo masculino y pueden originar varones XX y/o hermafroditas verdaderos XX, *SRY* negativos. Poco después, Jiménez y colaboradores postularon que el *locus* DSS en Xp21, que originalmente se encontró duplicado en algunos casos de mujeres XY y que experimenta inactivación, puede actuar como un regulador negativo de la ruta masculina. Este modelo sugiere que una sola copia activa de DSS inhibe la determinación masculina en las mujeres XX; mientras que en los varones XY la copia activa de DSS está inactiva (no funcional) o es anulada por la acción de *SRY*. De igual forma, como fue postulado para Z, las mutaciones nulas homocigotas en DSS permitirían desarrollo testicular en un sujeto XX al eliminar la represión del programa masculino-específico (Jiménez et al, 1996).

Se ha sugerido la existencia de genes activos del X que hacen el balance del factor determinante de testículo (Graves, 2000). Burgoyne et al (2001) emplearon ratones X^{PO} , X^{MO} , y XX transgénicos para *Sry* y demostraron que el desarrollo testicular era mucho más frecuente en los últimos. Esto implica que existe un gen(es) en el X, no compensado en dosis, que interacciona con la ruta determinante de testículo. Aunque aún no se han descrito genes de esta

clase, se conoce al menos un gen en Xp21.3, *DAX1*, que causa reversión sexual XY al estar duplicado (Zanaria et al, 1994).

El intervalo Xp21-p23 también ha sido estudiado en el roedor arvicolino *Myopus schisticolor* (*wood lemming*). En esta especie existen dos tipos de cromosoma X: uno normal y una variante designada como X*. Este último ha perdido la región Xp21-23. Los organismos con complemento cromosómico XX son hembras, los XY son machos y los roedores X*X presentan reversión sexual XY, lo cual sugiere que en esta región perdida del X* existe un gen de desarrollo testicular. Durante la reciente caracterización de esta región se encontró una secuencia homóloga al gen *Ccth* murino que codifica para una chaperonina que se expresa principalmente en el testículo. Aunque se desconoce la función de este gen en el arvicolino, se piensa que podría ser de gran importancia para el desarrollo masculino normal (Liu et al, 2001).

Los casos descritos por Ogata et al. (1991) y Tar et al. (1995) aportan evidencia adicional de la región Xp21 como un *locus* de reversión sexual. Los primeros autores documentaron el caso de un paciente con cariotipo 46,Y,Xp+, con características dismórficas menores y sin desarrollo testicular, el cromosoma Yp+ se derivó por translocación de un fragmento de Xp21-Xp22.3 a Yp11.3. Ellos concluyeron que la reversión sexual era consecuencia directa o indirecta de tener dos copias activas de la región distal de Xp y que esto también podría indicar la presencia de un gen(es) que actuara en la ruta de la determinación o diferenciación testicular. Tar et al. (1995) describieron un HV 46,XX *SRY* negativo con una deleción en Xp21.1-pter. Ellos sugirieron que en este individuo el desarrollo testicular ocurrió aún en ausencia de *SRY*, al

“desenmascararse” un alelo recesivo, probablemente DSS u otro gen desconocido en Xp, presente en el cromosoma X intacto.

La mínima duplicación de DSS en pacientes con reversión sexual XY se localizó en un segmento de 160 Kb en Xp21, donde se identificó al gen *DAX1*, que se propuso como factor de reversión sexual sensible a dosis (Bardoni et al, 1994). El producto del gen *DAX1* actúa como un regulador dominante negativo de la transcripción (Lalli et al, 1997), pero poco se sabe acerca de su función o de la identidad de los genes que él regula. Los experimentos en ratones transgénicos confirmaron que *DAX1* es DSS y que éste actúa como un gen anti-testículo al antagonizar la función de *SRY* (Swain et al, 1998). Si *DAX1* funciona como un represor de la ruta masculina, entonces se espera que los individuos XX con mutaciones homocigotas con pérdida de función en *DAX1*, desarrollen testículos en ausencia de *SRY*.

Todas estas evidencias mencionadas anteriormente, apoyan fuertemente la existencia de un gen(es) en Xp21 implicado en la regulación del desarrollo testicular. Es interesante notar que nuestros varones XX son homocigotos para una región de 2.11 cM en Xp21.3-Xp21.1 que incluye a *DAX1*, lo que sugiere que un defecto en este gen u otro localizado en esta región podría ser el responsable de la reversión sexual. De acuerdo con la hipótesis de Jiménez et al. (1996) nosotros sugerimos que los dos VXX presentan una mutación homocigota que permite el desarrollo testicular en ausencia de *SRY*. Ambos sujetos sanos XY (I-1 y II-7) son hemocigotos para el defecto, pero como esta es una mutación “virilizante” que anula a un represor del desarrollo testicular, el fenotipo masculino inducido por la presencia de *SRY* no está afectado. La

madre y hermana serían portadoras heterocigotas que no presentan la patología (Fig. 7).

En esta familia y en la descrita por Slaney et al. (1998) tal como lo había propuesto inicialmente de la Chapelle (1987), es muy probable que no exista efecto fenotípico en los portadores 46,XY. Esto es, mutación no penetrante en la madre y hermana (heterocigotas) de los individuos afectados, y limitada por la presencia del cromosoma Y en los individuos 46,XY (padre y hermano); ya que sus efectos son inhibidos por la función normal de SRY en estos dos últimos.

Todos estos datos apoyan a *DAX1* como un buen candidato para la reversión sexual XX en algunos casos *SRY* negativos. En contra de esta propuesta están los experimentos con ratones *knockout* para *Dax1* que mostraron desarrollo testicular o de ovario normales indicando que este gen no es esencial en la gonadogénesis murina (Yu et al, 1998), aunque Swain et al. (1998) mostraron evidencia de que *Dax1* se comporta en forma diferente en ratones y humanos. Adicionalmente, las mutaciones en este gen se han relacionado con hipoplasia suprarrenal congénita (AHC) e hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) (Goodfellow et al, 1999) pero nuestros pacientes no presentaron ningún dato clínico relacionado con estas anomalías. Existe la posibilidad de que las mutaciones en *DAX1* en estos varones XX puedan afectar la expresión de un gen(es) que estén involucrados en forma específica con el desarrollo de las gónadas. Otra alternativa puede ser la presencia de otro gen de reversión sexual aún desconocido, en esta región.

CONCLUSIONES

- La reconstrucción de haplotipos mostró que los individuos afectados y sus hermanos sanos compartieron la misma segregación de los alelos maternos excepto en el intervalo Xp21.3-p21.1, donde la hermana heredó un haplotipo materno diferente
- El análisis de ligamiento demostró que la reversión sexual XX, en esta familia, co-segrega con una región de 2.11 cM comprendida entre los marcadores DXS1218 y DXS997
- Mediante estudios de simulación se propuso un patrón de herencia recesivo ligado al X (limitado por la presencia del Y) para la enfermedad. Esto explicaría que los individuos normales 46,XX y 46,XY estudiados en esta familia serían portadores de la patología
- Se sugirió una mutación homocigota y con pérdida de función en un gen inhibidor de la ruta masculina, como responsable de la determinación testicular en los varones XX, *SRY* negativos de esta familia
- Proponemos que este gen pro-testicular pueda ser *DAX1* u otro gen aún no conocido que se localice en el intervalo Xp21.3-p21.1

PERSPECTIVAS

El hecho de probar esta hipótesis requerirá secuenciar *DAX1* en los VXX y en caso de encontrar mutación, clonar este gen para ensayos posteriores de expresión. De esta forma *DAX1* se esperaría que fuera un blanco directo de *SRY*.

CONCLUSIONES

- La reconstrucción de haplotipos mostró que los individuos afectados y sus hermanos sanos compartieron la misma segregación de los alelos maternos excepto en el intervalo Xp21.3-p21.1, donde la hermana heredó un haplotipo materno diferente
- El análisis de ligamiento demostró que la reversión sexual XX, en esta familia, co-segrega con una región de 2.11 cM comprendida entre los marcadores DXS1218 y DXS997
- Mediante estudios de simulación se propuso un patrón de herencia recesivo ligado al X (limitado por la presencia del Y) para la enfermedad. Esto explicaría que los individuos normales 46,XX y 46,XY estudiados en esta familia serían portadores de la patología
- Se sugirió una mutación homocigota y con pérdida de función en un gen inhibidor de la ruta masculina, como responsable de la determinación testicular en los varones XX, *SRY* negativos de esta familia
- Proponemos que este gen pro-testicular pueda ser *DAX1* u otro gen aún no conocido que se localice en el intervalo Xp21.3-p21.1

PERSPECTIVAS

El hecho de probar esta hipótesis requerirá secuenciar *DAX1* en los VXX y en caso de encontrar mutación, clonar este gen para ensayos posteriores de expresión. De esta forma *DAX1* se esperaría que fuera un blanco directo de *SRY*.

En el caso de hallar un gen *DAX1* intacto, entonces deberá procederse al escaneo del genoma completo en estos pacientes. Los primeros autosomas a explorar serían el 17 (que contiene a *SOX9*) y el 1 (que contiene a *Wnt4*).

BASES ELECTRÓNICAS CONSULTADAS

- Base de datos del genoma: <http://www.gdb.org> (para secuencias y localización de los marcadores)
- Genemap'99 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99> (en la identificación de genes candidato)
- Instituto Max Planck-Berlín <http://www.molgen.mpg.de/~xteam> (para localización y distancias intra-marcadores)
- Marshfield <http://www.marshfieldclinic.org/genetics> (para localización y distancias entre los marcadores)

REFERENCIAS

1. Abbas NE, Toublanc JE, Boucekkine C, Toublanc M, Affara NA, Job JC, Fellous M (1990) A possible common origin of "Y"-negative human XX males and XX true hermaphroditism. *Hum Genet* **84**:356-360
2. Achermann JC (1999) A mutation in the gene encoding steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* **22**: 125-126.
3. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal *Nat Genet* **7**:497-501.
4. Baumstark A, Barbi G, Djalali M, Geerkens C, Mitulla B, et al.(1996) Xp-duplications with and without sex reversal. *Hum Genet* **97**:79-86.
5. Beale B (2001) The Sexes: New Insights into the X and Y Chromosomes. *The Scientist* **15**: 18-21.
6. Bennet P (2000) Demystified...microsatellites. *Mol Pathol* **53**:177-183.
7. Berkovitz GD; Fechner PY; Marcantonio SM (1992) the role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46, XX true hermaphroditism. *Hum Genet* **88**: 411-416.
8. Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y (2000) A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* **22**: 405-408.
9. Boucekkine C, Toublanc JE, Abbas N, Semrouni N, Vilain E, McElreavey K, Mugneret F, Fellous M (1992) The Sole Presence of the Testis-Determining Region of the Y Chromosome (SRY) in 46,XX Patients Is Associated with Phenotypic Variability. *Horm Res* **37**:236-240.
10. Boucekkine C, Toublanc JE, Abbas N, Chaabouni S, Ouahid S, Semrouni M, Jaubert F, Toublanc M, McElreavey K, Vilain E, Fellous M (1994) Clinical

BASES ELECTRÓNICAS CONSULTADAS

- Base de datos del genoma: <http://www.gdb.org> (para secuencias y localización de los marcadores)
- Genemap'99 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99> (en la identificación de genes candidato)
- Instituto Max Planck-Berlín <http://www.molgen.mpg.de/~xteam> (para localización y distancias intra-marcadores)
- Marshfield <http://www.marshfieldclinic.org/genetics> (para localización y distancias entre los marcadores)

REFERENCIAS

1. Abbas NE, Toublanc JE, Boucekkine C, Toublanc M, Affara NA, Job JC, Fellous M (1990) A possible common origin of "Y"-negative human XX males and XX true hermaphroditism. *Hum Genet* **84**:356-360
2. Achermann JC (1999) A mutation in the gene encoding steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* **22**: 125-126.
3. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal *Nat Genet* **7**:497-501.
4. Baumstark A, Barbi G, Djalali M, Geerkens C, Mitulla B, et al.(1996) Xp-duplications with and without sex reversal. *Hum Genet* **97**:79-86.
5. Beale B (2001) The Sexes: New Insights into the X and Y Chromosomes. *The Scientist* **15**: 18-21.
6. Bennet P (2000) Demystified...microsatellites. *Mol Pathol* **53**:177-183.
7. Berkovitz GD; Fechner PY; Marcantonio SM (1992) the role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46, XX true hermaphroditism. *Hum Genet* **88**: 411-416.
8. Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y (2000) A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* **22**: 405-408.
9. Boucekkine C, Toublanc JE, Abbas N, Semrouni N, Vilain E, McElreavey K, Mugneret F, Fellous M (1992) The Sole Presence of the Testis-Determining Region of the Y Chromosome (SRY) in 46,XX Patients Is Associated with Phenotypic Variability. *Horm Res* **37**:236-240.
10. Boucekkine C, Toublanc JE, Abbas N, Chaabouni S, Ouahid S, Semrouni M, Jaubert F, Toublanc M, McElreavey K, Vilain E, Fellous M (1994) Clinical

- and anatomical spectrum in XX sex reversed patients. Relationship to the presence of Y specific DNA-sequences. *Clin Endocrinol* **40**:733-742.
11. Bruford MW y Wayne RK (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr Op Genet Develop* **3**:939-943.
 12. Buffone GJ y Darlington GJ (1985) Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin. Chem.* **31**: 164-165.
 13. Burgoyne PS, Lovell-Badge R y Rattigan A (2001) Evidence that the testis determination pathway interacts with a non-dosage compensated, X-linked gene. *Int J Dev Biol* **45**: 509-512.
 14. Burris TP, Guo W, McCabe E, (1996) The gene responsible for adrenal hypoplasia congenita, *Dax1*, encodes a nuclear hormone receptor that defines a new class within the superfamily. *Rec Prog Horm Res* **51**:241-260.
 15. Byskov AG, Hoyer PE (1994) Chapter 9 Embriology of mammalian gonads in *The physiology of reproduction 2^a edition*, edited by Knobil E and Neill JD. Raven Press Ltd, NY, USA, pp:487-540.
 16. Capel B (1998) SEX IN THE 90's: *SRY* and the Switch to the Male Pathway. *Annu Rev Physiol* **69**:497-523.
 17. Capel B (1999) The battle of the sexes. *Mech Dev* **92**:89-103.
 18. Charlesworth B, Snlegowski P y Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **371**:215-220.
 19. Clarkson MJ y Harley VR (2002) Sex with two SOX on: *SRY* and *SOX9* in testis development. *TEM* **13**: 106-111
 20. De la Chapelle A, Schröder J, Murros J, Tallqvist G (1977) Two XX males in one family and additional observations bearing on the etiology of XX males. *Clin Genet* **11**:91-106.
 21. De la Chapelle A. (1981) The etiology of maleness in XX men. *Hum Genet* **58**: 105-116.
 22. De la Chapelle A (1987) The Y-chromosomal and autosomal testis-determining genes. *Development* **101**(suppl): 33-38.
 23. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B et al. (1998) Direct interaction of *SRY*-related protein *SOX9* and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol and Cel Biol* **18**: 6653-6665.
 24. Dib C, Faure S, Fizames C, et al. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380**:6570:152-154.
 25. Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN et al. (1993) The Role of the Sex-Determining Region Y Gene in the Etiology of 46,XX Maleness. *J Clin Endocrinol Metab* **76**:690-695.
 26. Ferguson-Smith MA, Cooke A, Affara NA, Boyd E y Tolmie JL (1990) Genotype-phenotype correlations in XX males and their bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet* **84**:198-202.
 27. Foster JW, Domínguez-Steglich MA, Guioli S (1994) Campomelic Dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an *SRY*-related gene *Nature* **372**: 523-530.
 28. Goodfellow PN and Camerino G. (1999) *DAX1*, an 'antitestis' gene *Cell Mol Life Sci* **55**:857-863.
 29. Graves JAM, Disteché CM, Toder R (1998) Gene Dosage in the evolution and function of mammalian sex chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **80**:94-103.

30. Graves JAM (2000) Human Y chromosome, Sex Determination, and Spermatogenesis- A Feminist view. *Biol Reprod* **63**:667-676.
31. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg 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.
32. Guo W, Burris TP, Zhang YH et al. (1996) Genomic sequence of the DAX1 gene: an orphan nuclear receptor responsible for X-linked adrenal Hypoplasia congenital Hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* **81**: 2481-2486.
33. Heikkilä M, Peltoketo H, Vainio Seppo (2001) *Wnts* and the female reproductive system. *J Exp Zool* **290**: 616-623.
34. Hiort O, Holterhus PM (2000) The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* **142**:101-110.
35. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J (1999) Autosomal sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* **87**:349-353.
36. Hughes IA, Coleman N, Ahmed SF, Ng KL, Lim HN, Hawkins JR (1999) Sexual dimorphism in the neonatal gonad. *Acta Paediatr Suppl* **428**:22-30.
37. Hurst LD and Randerson JP (1999) An eXceptional chromosome. *TIG* **15**: 383-385.
38. Jarne P, David P, Viard F (1998) Microsatellites, transposable elements and the X chromosome. *Mol Biol Evol* **15**:28-34
39. Jarrah N, El-Shanti H, Khier A, Obeidat FN, Haddidi A, Ajlouni K (2000) Familial disorder of sex determination in seven individuals from three related sibships. *Eur J Paediatr* **159**:912-918.
40. Jiménez R, Sanchez A, Burgos M and Diaz De la Guardia R (1996) Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet* **12**: 164-168.
41. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Cheng XN, et al. (2001) Up-regulation of Wnt4 signalling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* **68**:1102-1109.
42. Jost A (1947) Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **59**:37-50.
43. Kasdan R, Nankin HR, Troen P, Wald N, Pan S, Yanaihara T (1973) Paternal transmission of maleness in XX human beings. *N Eng J Med* **288**:539-545.
44. Kempter B y Grossbadem K (1992) Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *Trends in Genetics* **8**: 2.
45. Kohli Jürg (2001) Linkage and crossingover. *Encyclopedia of life sciences*. McMillan published Ltd. Nature publishing group, pp: 1-8.
46. Kolon T, Ferrer F, McKenna P (1998) Clinical and molecular analysis of XX sex reversed patients. *The Journal of Urology* **160**: 1169-1172.
47. Kong A and Cox NJ (1997) Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet* **61**:1179-1184
48. Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* **348**: 450-452.
49. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* **351**: 117-121.

50. Koopman P (1999) *Sry* and *Sox9*: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci* **55**:839-856.
51. Kuhnle U, Schwartz HP, Lohrs U, Stengel-Ruthkowsky S, Cleve H, Braun A (1993) Familial true hermaphroditism: paternal and maternal transmission of true hermaphroditism (46,XX) and XX males in the absence of Y-chromosomal sequences. *Hum Genet* **92**:571-576.
52. Kusz K, Kotecki M, Wojda A, Szarras-Czapnik M, Latos-Bielenska A, Warenik-Szymankiewicz A, Ruszczyńska-Wolska A, Jaruzelska J (1999) Incomplete masculinisation of XX subjects carrying the *SRY* gene on an inactive X chromosome. *J Med Genet* **36**:452-456.
53. Lahn BT and Page DC (1999) Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* **286**:964-967.
54. Lalli E, Bardoni B, Zazopoulos E, et al. (1997) A transcriptional silencing domain in *DAX1* whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Mol Endocrinol* **11**:1950-1960.
55. Lim HN, Hawkins HR (1998) Genetic control of Gonadal differentiation. *Bailliere's Clin Endocrin Metab* **12**: 1-16.
56. Liu WS, Nordqvist K, Lau YFC y Fredga K (2001) Characterization of the Xp21-23 region in the wood lemming, a region involved in XY sex reversal. *J Exp Zool* **290**: 5551-557.
57. Margarit E, Soler A, Carrió A, Costa D, Vendrell T, Rosell J, Ballesta F (1998) Molecular, cytogenetic, and clinical characterization of six XX males including one prenatal diagnosis. *J Med Genet* **35**: 727-730.
58. Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B (1997) Male-specific cell migration into the developing gonad. *Current Biology* **7**: 958-968.
59. McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz Y, Fellous M (1993) A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: *SRY* represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:3368-3372.
60. McElreavey K, Fellous M (1999) Sex determination and the Y chromosome. *Am J Med Genet* **89**:176-185.
61. McElreavey K, Krausz C, Bishop CE (2000) The human Y chromosome and male infertility. *Res Probl Cell Diff* **28**:23-52.
62. Merke DP, Tajima T, Baron J, Cutler GB (1999) Hypogonadotropic hypogonadism in a female caused by an X-linked recessive mutation in the *dax1* gene. *New England J Med* **22**:1248-1252.
63. Minowada S, Kabayashi K, Isurugi K, et al. (1979) Two XX males brothers. *Clin Genet* **15**:399-405.
64. Miro R, Caballin MR, Marsini S, y Egozcue J (1978) Mosaicism in XX males. *Hum Genet* **45**: 103-106.
65. Muscatelli F, Walker AP, De Plaen E, Stafford AN, Monaco AP (1994) Mutations in the *DAX1* gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and Hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* **372**:635-641.
66. Nicolis GL, Hsu LY, Sabetghadam R, Kardon NB, Chernay PR, Mathur DP, Rose HG, Hirschorn K, Gabrilove JL (1972) Klinefelter's syndrome in identical twins with the 46,XX chromosome constitution. *Am J Med Genet* **52**:482-491.
67. NIH/CEPH (1992) Collaborative mapping group: A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science* **2**

68. Numabe H, Nagafuchi S, Nakahori Y, et al. (1992) DNA analyses of XX and XX-hypospadiac males. *Hum Genet* **90**:211-214.
69. Ogata T, Hawkins JR, Taylor A, Matsuo N, Hata J, Goodfellow PN (1991) Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype: support for the existence of a gene(s), located in distal Xp, involved in testis formation. *J Med Genet*
70. Ostrer Harry (2001) Identifying genes for male sex determination in humans. *J Exp Zool* **290**: 567-573.
71. Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas EN, Fellous M (1989) Genetic Evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* **34**:937-939.
72. Panel 28 X Chromosome (PE) ABI PRISM™ Linkage Mapping Set Version 2. User's Manual, 1997.
73. Parker KL, Schedl A, Schimmer BP (1999a) GENE INTERACTIONS IN GONADAL DEVELOPMENT *Ann Rev Physiol* **61**:417-433.
74. Parker KL, Schimmer BP, Schedl A (1999b) Genes essential for early events in gonadal development. *Cell Mol Life Sci* **55**:831-838.
75. Pask A y Renfree M (2001) Sex determining genes and sexual differentiation in a marsupial. *J Exp Zool* **290**: 586-596.
76. Pereira ET, Almeida JC de, Gunha A, Patton M, Taylor R, Jeffery S (1991) Use of probes for ZFY, ZRY and the Y pseudoautosomal boundary in XX males, XX true hermaphrodites, and an XY female. *J Med Genet* **28**:591-595.
77. Pérez-Lezaun A, Calafell F, Mateu E, et al. (1997) Microsatellite variation and the differentiation of modern humans. *Hum Genet* **99**:1-7.
78. Ramos ES, Moreira-Filho CA, Vicente YAMVA, Llorach-Velludo MAS, Tucci S Jr, Duarte MHO, Araujo AG, Martelli E (1996) SRY-negative true hermaphrodites and an XX male in two generations of the same family. *Hum Genet* **97**:596-598.
79. Reddy PP, Papenhausen PR, Suh YM, Riddick LM, Calvano CJ, Mandell J (1997) XX sex reversal: molecular analysis of the SRY/ZFY regions. *J Urol* **158**:1305-1307.
80. Roberts LM, Shen J, Ingraham HA (1999) HUMAN GENETICS'99: SEXUAL DEVELOPMENT New solutions to an ancient riddle: defining the differences between Adam and Eve. *Am J Hum Genet* **65**:933-942.
81. Saifi GM and Chandra HS (1999) an apparent excess of sex- and reproduction- related genes on the human x chromosome. *Proc R Soc Lond B* **266**:203-209.
82. Salas-Cortés I, Jaubert F, Bono MR, Fellous M y Roseblatt M (2001) Expression of the human SRY protein during development in normal male gonadal and sex-reversed tissues. *J Exp Zool* **290**: 607-615.
83. Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor press.
84. Sarafoglou K y Ostrer H (2000) Familial Sex Reversal: A Review. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:483-493.
85. Scharnhorst V, van der Eb AJ, y Jochemsen AG (2001) WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* **273**: 141-161.
86. Scherer G (1999) Introduction. vertebrate sex determination and gonadal differentiation. *Cell Mol Life Sci* **55**:821-823

87. Schork NJ, Boehnke M, Terwilliger JD, Ott J (1993) Two-trait-locus linkage analysis: a powerful strategy for mapping complex genetic traits. *Am J Hum Genet* **53**:1127.
88. Schwartz M, Blichfeldt S y Muller J (1995) X-linked adrenal hypoplasia in a large Greenland family. *Hum Genet* **99**:83-87.
89. Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**: 240-244.
90. Sinclair A (2001) Eleven Years of sexual discovery. *Genome Biol* **2**(7) reports 4017.1-4017.3
91. Skordis NA, Stetka DG, MacGillivray MH, Greenfield SP (1987) Familial 46,XX males coexisting with familial 46,XXXX true hermaphroditism in same pedigree. *J Pediatr* **110**:244-248.
92. Slaney SF, Chalmers IJ, Affara NA, Chitty LS (1998) An autosomal or X linked mutation results in true hermaphrodites and 46,XX males in the same family. *J Med Genet* **35**:17-22.
93. Solari AJ (1996) *Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en Medicina*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina pp: 127-147.
94. Strachan T y Read AP (1999) *Human Molecular Genetics*. 2ª edición. Wiley-Liss. Nueva York, EUA pp: 269-293.
95. Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G (1996) Mouse *dax1* expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat Genet* **12**:404-409.
96. Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R (1998) *Dax-1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature* **391**:761.
97. Swain A, Lovell-Badge R (1999) Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes and Dev* **13**:755-767.
98. Taketo M, Parker KL, Howard TA, Tsukiyama T, Wong M, et al. (1995) Homologs of *Drosophila* Fushi-Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. *Genomics* **25**: 565-567.
99. Tar A, Sólyom J, Györfári B, et al. (1995) Testicular development in an SRY-negative 46,XX individual harboring a distal Xp deletion. *Hum Genet* **96**: 464
100. Thompson EA (1987) Crossover counts and likelihood in multipoint linkage analysis. *IMA J Math Appl Med Biol* **4**:93-108.
101. Vaiman D, Pailhoux E (2000) Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *TIG* **16**:486-494.
102. Vainio S, Helkkilä M, Klispert A, Chin N, McMahon P (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **397**:405-409.
103. Vázquez Mena Oscar. (2000) Tesis: Identificación y análisis de marcadores microsatélite en una población Mexicana. IPN Centro de Investigación Y Tecnología Avanzada.
104. Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, Chapelle de la A, Weissenbach J (1986) a deletion map of the human y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* **38**:109-124.
105. Vidal VPI, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A (2001) *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* **28**:216-217.

106. Vilain E, le Fiblec B, Morichon-Delvallez N, Brauner R, Dommergues M, Dumez Y, Jaubet F, Boucekkine C, McElreavey K, Vekemans M, Fellous M (1994) SRY- negative fetus with complete male phenotype. *Lancet* **343**: 240-241.
107. Vilain E. Annual Review of sex Research (2001) Chapter: Genetics of Sexual Development. Helman JH editor by The Society for the Scientific Study of Sexuality Pp: 1-25.
108. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M et al. (1994) autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79**: 1111-1120.
109. Wang, LH et al. (1994) Integration of Gene Maps: Chromosome X. *Genomics* **22**:590-604.
110. Watchel SS (1998) X-linked sex-reversing genes. *Cytogenet Cell Genet* **80**: 222-225.
111. Weber JL y May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* **44**:388-396.
112. Weil D, Wang I, Dietrich A, Poutska A, Weissenbach J, Petit C (1994) Highly homologous loci on the X and Y chromosomes are hot-spots for ectopic recombinations leading to XX maleness. *Nat Genet* **7**:414-419.
113. Weissenbach J (1993) Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. *Curr Opin Genet Dev* **3**: 413-417.
114. Western PS y Sinclair AH (2001) Sex, genes and heat: Triggers of diversity. *J Exp Zool* **290**: 624-631.
115. Whittemore AS (1996) Genome Scanning for linkage: An Overview. *Am J Hum Genet* **59**: 704-716.
116. Yu R, Ito M, Saunders T, Camper S, Jameson J (1998) Role of *Ahch* in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet* **20**: 353-357.
117. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom T, Guioli S, Guo w et al. (1994) an unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita *Nature* **372**:635-641.
118. Zanaria E, Bardoni B, Dabovic B, Calvari V et al. (1995) Xp duplications and sex reversal *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **350**:291-296.
119. Zhang YH, Guo W, Wagner RL, Huang BL, McCabe E, Vilain E et al. (1998) DAX1 mutations map to putative structural domains in a deduced three dimensional model. *Am J Hum Genet* **62**:855-864.
120. Zenteno JC, López M, Vera C, Méndez JP, y Kofman-Alfaro S. (1997) Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Hum Genet* **100**:606-610.

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los microsatélites empleados en población mestizo Mexicana

DXS1060 ALELO	N	FR
1) 241	1	0.01
2) 243	3	0.02
3) 245	87	0.67
4) 247	6	0.05
5) 249	20	0.15
6) 251	1	0.01
7) 253	9	0.07
8) 255	1	0.01
9) 257	2	0.02
TOTAL=	130	1

DXS8051 ALELO	N	FR
1) 107	2	0.02
2) 109	1	0.01
3) 111	7	0.05
4) 113	25	0.19
5) 115	13	0.1
6) 117	24	0.19
7) 119	12	0.09
8) 121	19	0.15
9) 123	17	0.13
10) 125	5	0.04
11) 127	4	0.03
12) 129	1	0.01
TOTAL=	130	1

DXS987 ALELO	N	FR
1) 208	11	0.09
2) 210	3	0.02
3) 212	7	0.06
4) 214	19	0.11
5) 216	21	0.17
6) 218	55	0.44
7) 220	11	0.09
8) 222	4	0.03
TOTAL=	126	1

DXS1226 ALELO	N	FR
1) 279	1	0.01
2) 283	2	0.02
3) 287	2	0.02
4) 289	6	0.05
5) 291	32	0.25
6) 293	20	0.15
7) 295	33	0.25
8) 297	17	0.13
9) 299	9	0.07
10) 301	3	0.04
11) 303	2	0.02
12) 309	1	0.01
TOTAL=	130	1

DXS1061 ALELO	N	FR
1) 218	1	0.03
2) 220	4	0.14
3) 222	10	0.35
4) 226	2	0.07
5) 232	1	0.03
6) 234	8	0.28
7) 236	2	0.07
8) 238	1	0.03
TOTAL=	29	1

DXS8039 ALELO	N	FR
1) 141	1	0.033
2) 145	1	0.033
3) 147	6	0.2
4) 149	1	0.033
5) 150	4	0.132
6) 151	1	0.033
7) 152	3	0.1
8) 153	1	0.033
9) 154	3	0.1
10) 156	1	0.033
11) 158	8	0.27
TOTAL=	30	1

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los microsatélites empleados en población mestizo Mexicana

DXS985		
ALELO	N	FR
1) 126	5	0.23
2) 128	2	0.09
3) 129	3	0.14
4) 130	8	0.36
5) 131	2	0.09
6) 132	2	0.09
TOTAL=	22	1

DXS992		
ALELO	N	FR
1) 197	6	0.32
2) 198	1	0.05
3) 200	1	0.05
4) 201	1	0.05
5) 202	3	0.16
6) 204	5	0.27
7) 205	1	0.05
8) 206	1	0.05
TOTAL=	19	1

DXS1218		
ALELO	N	FR
1) 256	1	0.03
2) 258	6	0.2
3) 259	1	0.03
4) 263	1	0.03
5) 265	3	0.1
6) 266	4	0.14
7) 267	5	0.17
8) 268	8	0.27
9) 272	1	0.03
TOTAL=	30	1

AFMa082xb9		
ALELO	N	FR
1) 115	7	0.25
2) 117	3	0.11
3) 118	1	0.04
4) 119	15	0.53
5) 121	2	0.07
TOTAL=	29	1

DXS1235		
ALELO	N	FR
1) 229	1	0.03
2) 231	4	0.14
3) 235	2	0.07
4) 238	1	0.03
5) 239	15	0.53
6) 240	2	0.07
7) 243	1	0.03
8) 245	1	0.03
9) 247	2	0.07
TOTAL=	29	1

DXS1036		
ALELO	N	FR
1) 139	2	0.08
2) 142	2	0.08
3) 143	3	0.12
4) 144	5	0.19
5) 146	13	0.5
6) 148	1	0.09
TOTAL=	26	1

DXS1067		
ALELO	N	FR
1) 212	3	0.12
2) 216	1	0.04
3) 218	2	0.08
4) 220	15	0.6
5) 224	1	0.04
6) 226	2	0.08
7) 228	1	0.04
TOTAL=	25	1

DXS1214		
ALELO	N	FR
1) 281	1	0.01
2) 285	8	0.06
3) 287	66	0.51
4) 289	12	0.09
5) 291	26	0.2
6) 293	8	0.06
7) 295	2	0.02
8) 297	7	0.05
TOTAL=	130	1

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los microsatélites empleados en población mestizo Mexicana

DXS997 ALELO	N	FR
1) 104	2	0.075
2) 105	5	0.19
3) 106	8	0.31
4) 107	1	0.04
5) 109	8	0.31
6) 111	2	0.075
TOTAL=	26	1

DXS1068 ALELO	N	FR
1) 246	1	0.01
2) 248	12	0.09
3) 250	1	0.01
4) 252	32	0.25
5) 254	7	0.05
6) 256	3	0.02
7) 258	73	0.56
8) 260	1	0.01
TOTAL=	130	1

DXS8014 ALELO	N	FR
1) 264	2	0.08
2) 265	1	0.04
3) 266	8	0.33
4) 267	1	0.04
5) 268	7	0.3
6) 270	4	0.17
7) 272	1	0.04
TOTAL=	24	1

DXS993 ALELO	N	FR
1) 270	68	0.53
2) 272	21	0.16
3) 278	10	0.08
4) 286	10	0.08
5) 288	18	0.14
6) 290	1	0.01
7) 292	1	0.01
TOTAL=	129	1

DXS991 ALELO	N	FR
1) 327	2	0.134
2) 329	2	0.134
3) 331	5	0.33
4) 333	2	0.134
5) 335	2	0.134
6) 337	2	0.134
TOTAL=	15	1

DXS986 ALELO	N	FR
1) 159	1	0.03
2) 161	5	0.16
3) 163	2	0.06
4) 165	10	0.33
5) 167	3	0.1
6) 171	1	0.03
7) 173	7	0.23
8) 175	1	0.03
9) 177	1	0.03
TOTAL=	30	1

DXS990 ALELO	N	FR
1) 119	1	0.04
2) 121	1	0.04
3) 125	8	0.31
4) 127	6	0.23
5) 129	4	0.15
6) 135	6	0.23
TOTAL=	26	1

DXS1106 ALELO	N	FR
1) 123	1	0.04
2) 125	2	0.08
3) 127	2	0.08
4) 129	11	0.42
5) 131	8	0.3
6) 133	1	0.04
6) 137	1	0.04
TOTAL=	26	1

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los microsatélites empleados en población mestizo Mexicana

DXS8055 ALELO	N	FR
1) 315	9	0.3
2) 317	14	0.47
3) 319	6	0.2
4) 321	1	0.03
TOTAL=	30	1

DXS1001 ALELO	N	FR
1) 197	6	0.33
2) 199	1	0.06
3) 201	2	0.11
4) 203	4	0.22
5) 205	4	0.22
6) 207	1	0.06
TOTAL=	18	1

DXS1047 ALELO	N	FR
1) 156	2	0.08
2) 158	2	0.08
3) 160	12	0.46
4) 162	3	0.11
5) 164	4	0.15
6) 168	2	0.08
7) 170	1	0.04
TOTAL=	26	1

DXS1227 ALELO	N	FR
1) 79	1	0.03
2) 81	15	0.52
3) 83	2	0.07
4) 87	1	0.03
5) 89	3	0.11
6) 93	6	0.21
7) 95	1	0.03
TOTAL=	29	1

DXS8043 ALELO	N	FR
1) 148	3	0.11
2) 156	10	0.36
3) 160	6	0.21
4) 162	6	0.21
5) 164	1	0.037
6) 166	1	0.037
7) 168	1	0.037
TOTAL=	28	1

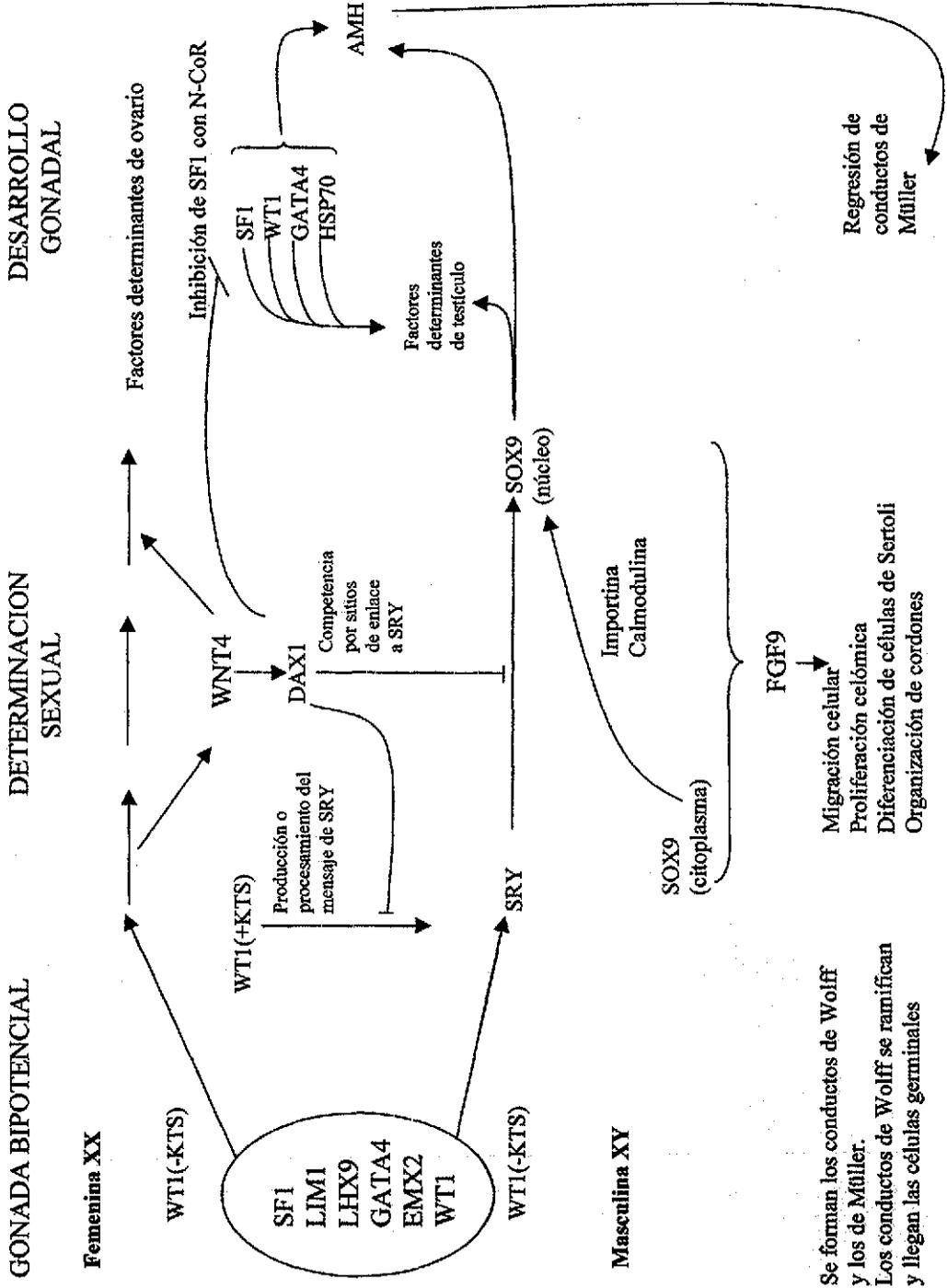
DXS8091 ALELO	N	FR
1) 79	2	0.07
2) 81	4	0.13
3) 83	2	0.07
4) 85	9	0.3
5) 87	11	0.36
6) 89	2	0.07
TOTAL=	30	1

DXS1073 ALELO	N	FR
1) 307	6	0.3
2) 309	6	0.3
3) 311	5	0.25
4) 315	1	0.05
5) 321	1	0.05
6) 325	1	0.05
TOTAL=	20	1

Tabla 2. Genotipos de los individuos afectados y sus familiares

LOCUS	LOCALIZACIÓN CITOGÉNICA	II-1		II-2		II-3		II-6		II-7	
		P	M	P	M	P	M	P	M	P	M
DXS1060	Xp22.3-p22.3	249	245 251	249 251	249 251	249 251	249 251	249 251	249 251	249 251	251
DXS8051	Xp22	121	119 125	121 125	121 125	121 125	121 125	121 119*	121 119*	121 119*	125
DXS987	Xp22	208	220 220	208 220	208 220	208 220	208 220	208 220	208 220	208 220	220
DXS1226	Xp21	295	301 293	295 293	295 293	295 293	295 293	295 293	295 293	295 293	293
DXS1061	Xp22.1-p21.3	218	218 232	218 232	218 232	218 232	218 232	218 232	218 232	218 232	232
DXS8039	Xp21.3	147	145 153	147 153	147 153	147 153	147 153	147 153	147 153	147 153	153
DXS985	Xp21.3-p21.1	126	126 132	126 132	126 132	126 132	126 132	126 132	126 132	126 132	132
DXS992	Xp21.3-p21.1	200	200 200	200 200	200 200	200 200	200 200	200 200	200 200	200 200	200
DXS1218	Xp22.3-p21.3	265	265 265	265 265	265 265	265 265	265 265	265 265	265 265	265 265	265
AFWA082XB9	Xp21.3	115	117 117	115 117	115 117	115 117	115 117	115 117	115 117	115 117	117
DXS1235	Xp21.3-p21.2	238	231 238	238 238	238 238	238 238	238 238	238 238	238 238	238 238	238
DXS1036	Xp21.3-p21.1	146	142 146	146 146	146 146	146 146	146 146	146 146	146 146	146 146	146
DXS1067	Xp21.3-p21.1	220	212 220	212 220	212 220	212 220	212 220	220 220	220 220	220 220	220
DXS1214	Xp21.3-p21.1	287	291 287	287 287	287 287	287 287	287 287	287 287	287 287	287 287	287
DXS997	Xp21.3-p21.1	105	109 105	109 105	105 105	105 105	105 105	105 105	105 105	105 105	105
DXS1063	Xp21.1-p11.4	254	254 258	254 258	254 258	254 258	254 258	254 258	254 258	254 258	258
DXS8014	Xp21.1-p11.4	265	265 265	265 265	265 265	265 265	265 265	265 265	265 265	265 265	265
DXS993	Xp11.4-p11.3	272	270 270	270 270	272 270	272 270	272 270	272 270	272 270	272 270	270
DXS991	Xp11.21	331	331 335	331 335	331 335	331 335	331 335	331 335	331 335	331 335	335
DXS986	Xq21.1	173	165 177	165 177	173 177	173 177	173 177	173 177	173 177	173 177	177
DXS990	Xq21.3-q22	125	129 129	129 129	125 129	125 129	125 129	125 129	125 129	125 129	129
DXS8055	Xq22	131	317 317	317 317	131 129	131 129	131 129	131 129	131 129	131 129	129
DXS1001	Xq23	321	197 203	321 317	321 317	321 317	321 317	321 317	321 317	321 317	317
DXS1047	Xq24	203	203 203	203 203	203 203	203 197*	203 197*	203 203	203 203	203 203	203
DXS1047	Xq25	160	162 160	160 160	160 160	160 160	160 160	160 160	160 160	160 160	162*
DXS1227	Xq26-q27	81	89 89	81 89	81 89	81 89	81 89	81 89	81 89	81 89	89
DXS8043	Xq27	160	148 156	160 156	160 156	160 156	160 156	160 156	160 156	160 156	148*
DXS8091	Xq27	87	85 85	85 85	87 85	87 85	87 85	87 85	87 85	87 85	85
DXS1073	Xq28	311	307 309	307 309	311 309	311 309	311 309	311 309	311 309	311 309	307*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Se forman los conductos de Wolff y los de Müller.
 Los conductos de Wolff se ramifican y llegan las células germinales

Figura 1b. Eventos moleculares de la determinación y diferenciación sexual en humanos.

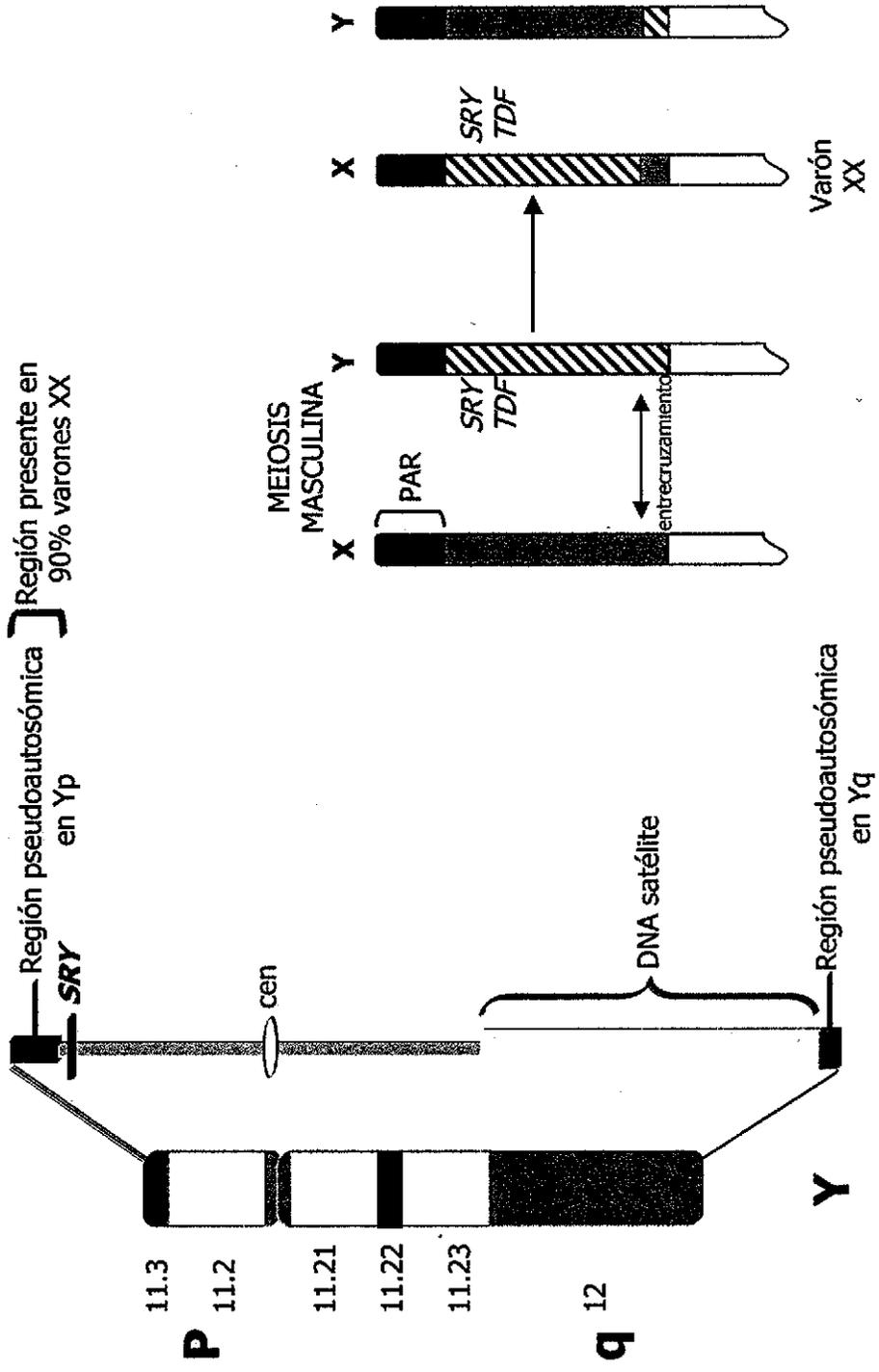
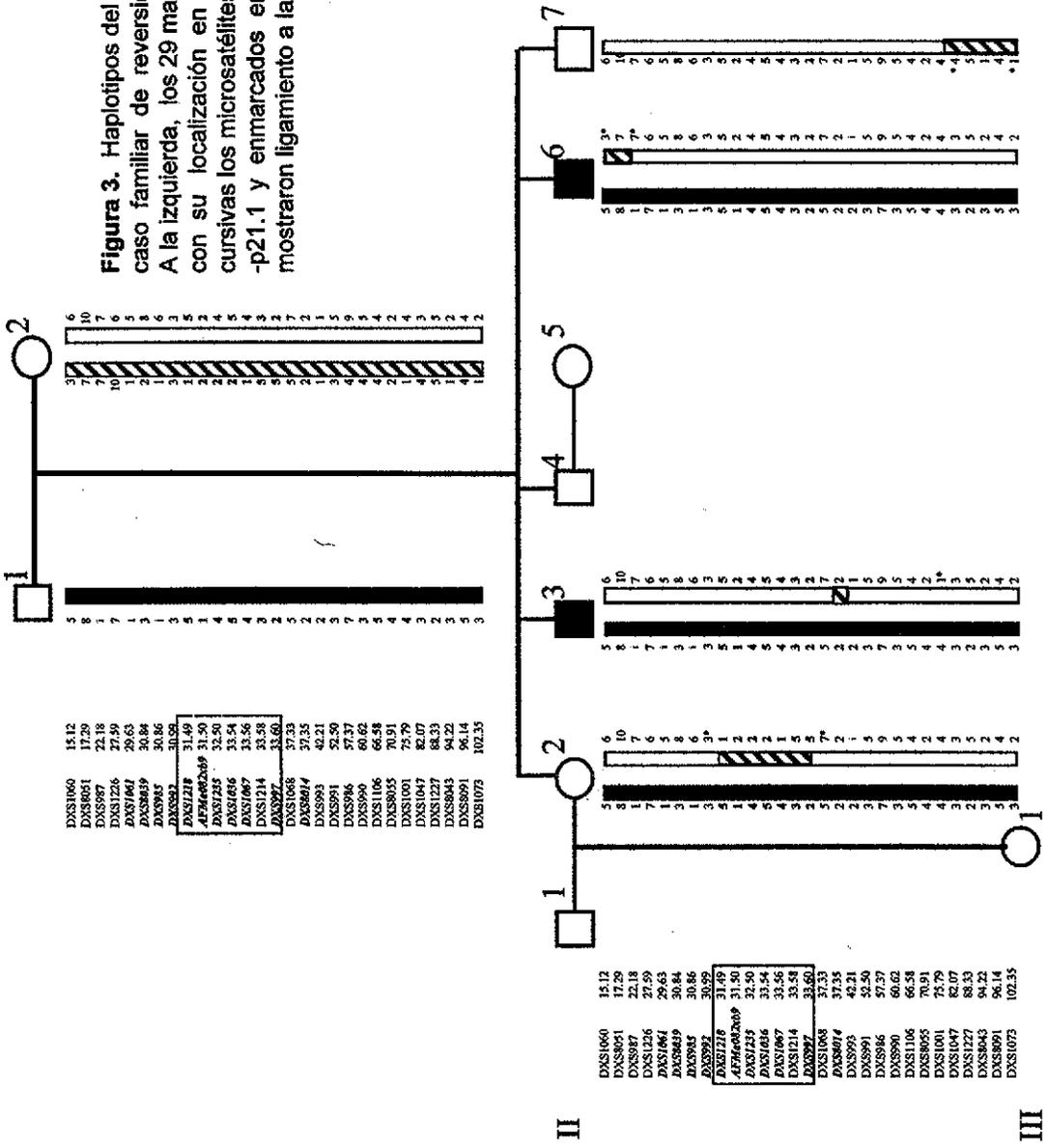


Figura 2. Ideograma de los cromosomas X y Y, mostrando la recombinación ilegítima que origina varones XX, SRY positivos

Figura 3. Haplotipos del cromosoma X en un caso familiar de reversión sexual masculina. A la izquierda, los 29 marcadores empleados con su localización en cM; en negritas y cursivas los microsatélites de la región Xp21.3-p21.1 y enmarcados en un cuadro, los que mostraron ligamiento a la patología.



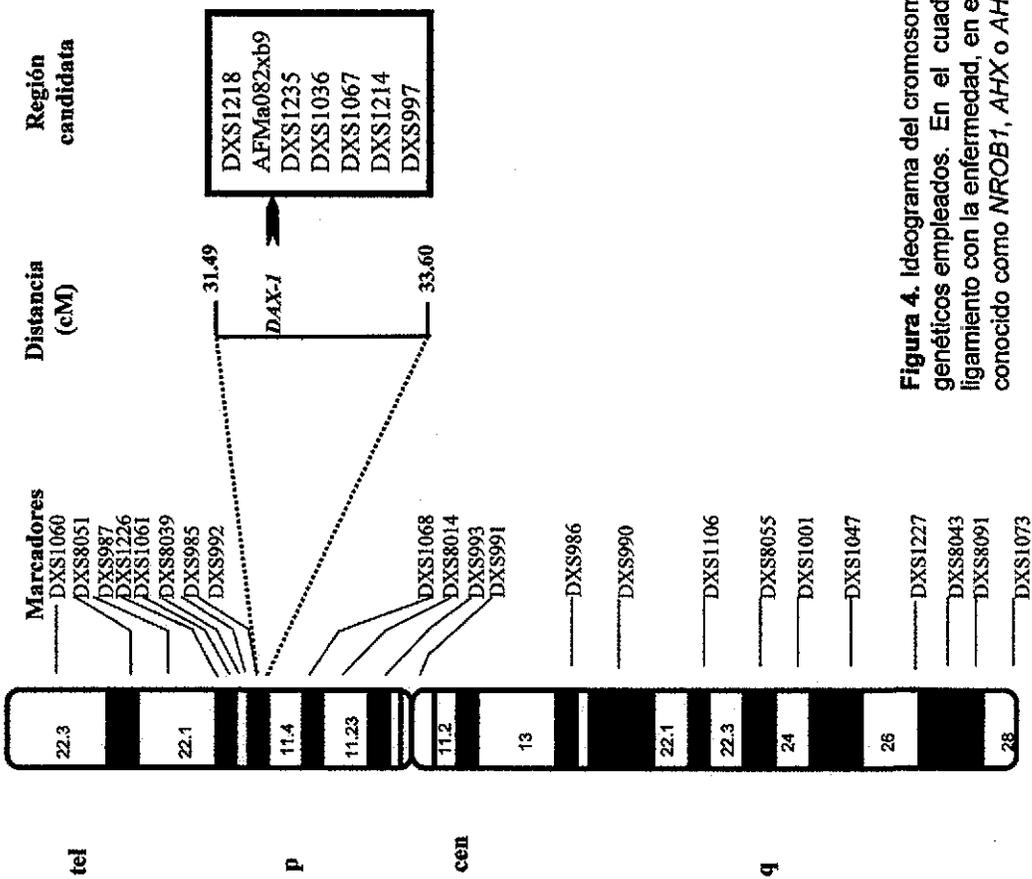
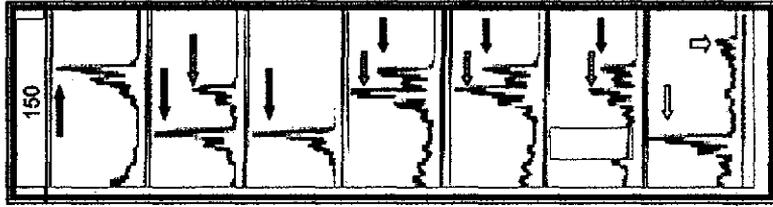


Figura 4. Ideograma del cromosoma X con la localización física de los marcadores genéticos empleados. En el cuadro se muestran los microsatélites que dieron ligamiento con la enfermedad, en esta región está contenido el gen *DAX1*, también conocido como *NROB1*, *AHX* o *AHC*.

DXS8043



I-1

I-2

II-7

II-3

II-6

II-2

CEPH 1347-02

DXS991

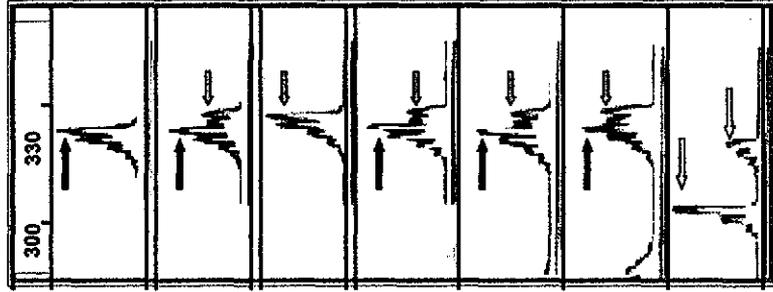


Figura 5a. Ejemplo de segregación en dos loci microsatélites. En DXS8043 se observa como el individuo II-7 hereda un alelo materno diferente que el de sus hermanos. En DXS8091, los individuos I-1 y I-2 comparten el alelo de menor tamaño.

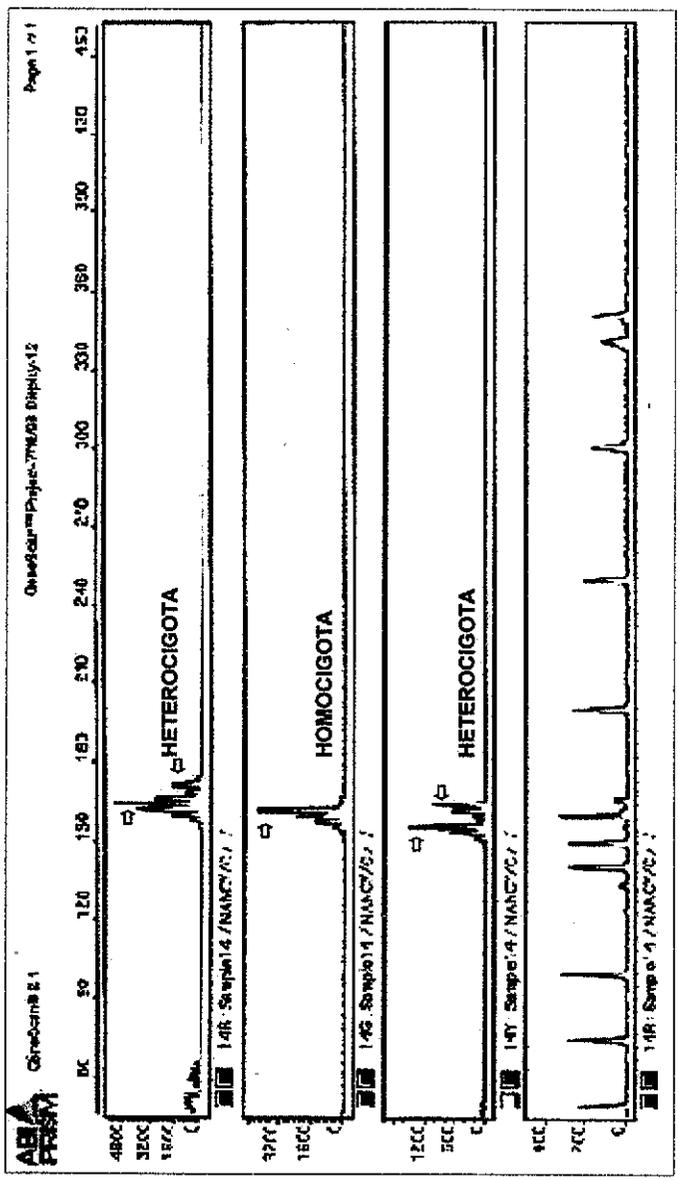


Figura 5b. Electroferograma típico de GeneScan del individuo control 1347-02. Se muestran 3 loci de regiones microsatélite marcados con diferentes fluorocromos. DXS986 [FAM], DXS1047 [HEX] y DXS8043 [NED]. En el panel inferior se muestra la curva estándar de tamaños con el fluorocromo [ROX350].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

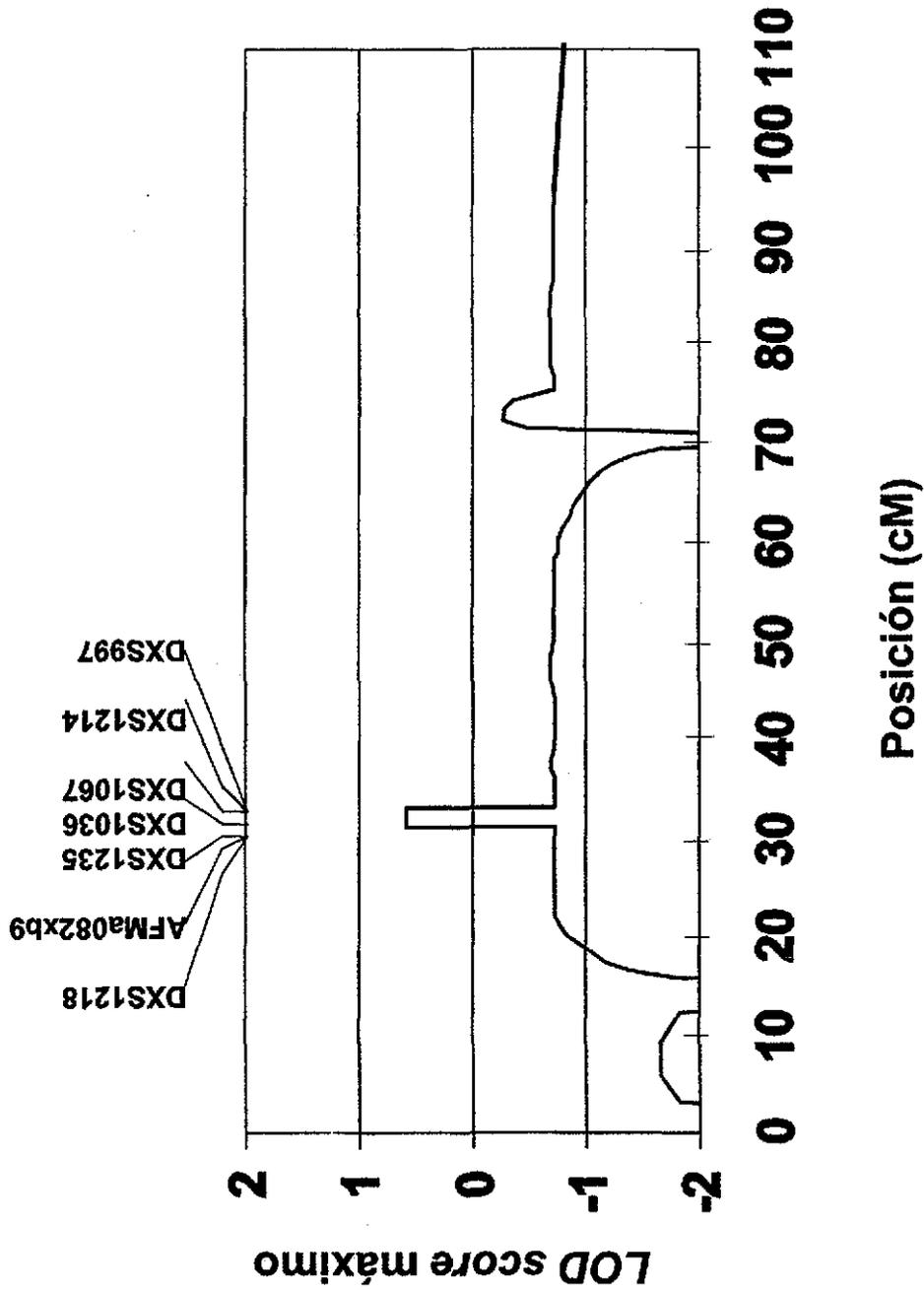


Figura 6. Gráfica de LOD SCORE. En las abscisas se indica la posición en cM de los 29 marcadores empleados a lo largo del cromosoma X. En el eje de las ordenadas se muestra el valor de LOD SCORE obtenido. Arriba se señalan los STRs de la región que mostró asociación con la enfermedad.

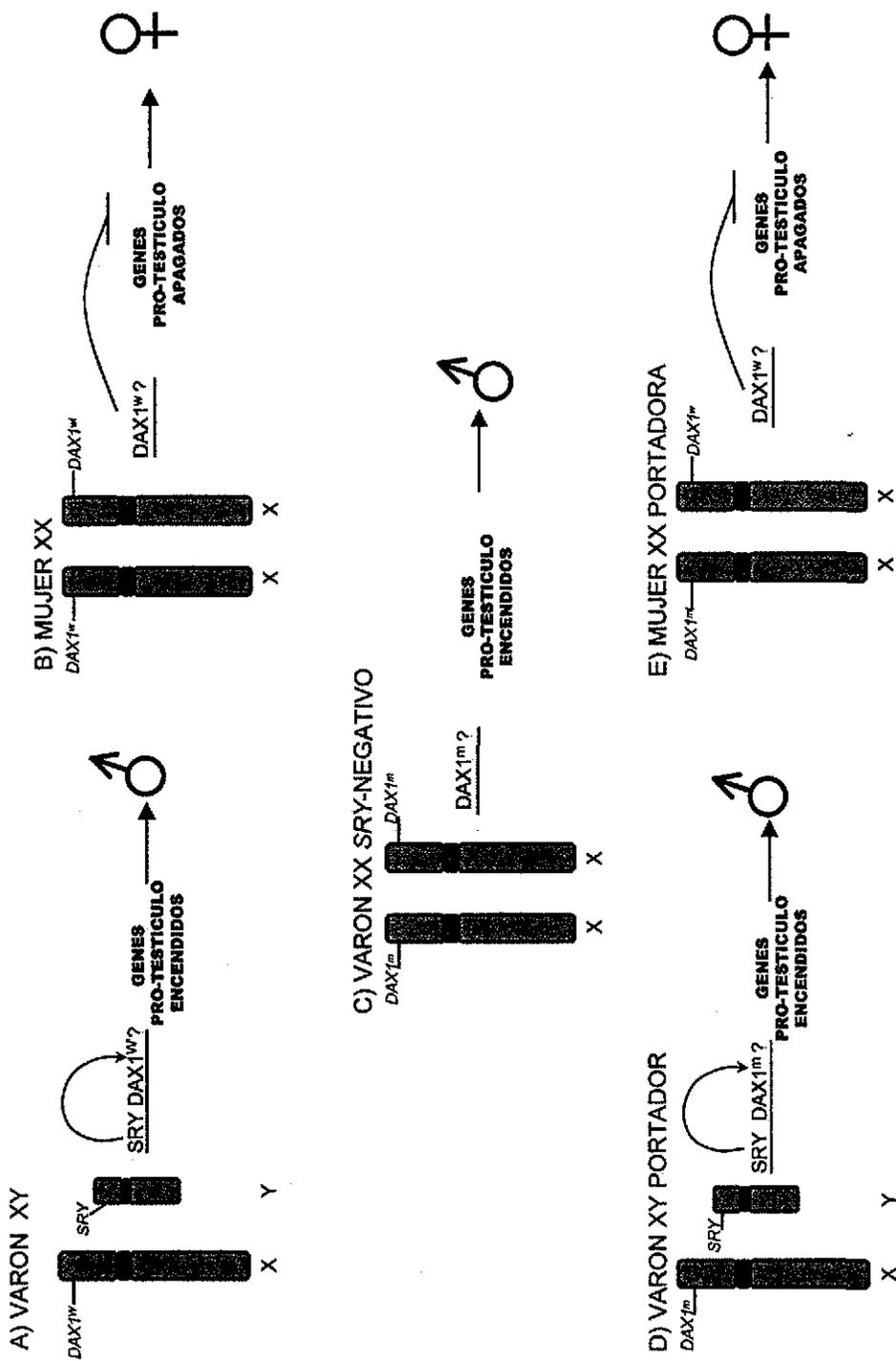


Figura 7. Modelo propuesto para la determinación testicular. A) y B) casos de varón y mujer normales. C) varón XX, SRY negativo con mutación homocigota en un gen inhibidor de la ruta masculina, incluido en DSS, que permite la determinación de testículo en ausencia de SRY. D) Varón XY portador de la mutación pero en estado hemicigoto y con SRY presente. E) mujer XX heterocigota para la mutación, por lo cual el gen actúa e inhibe ruta masculina.

ANEXO 1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados.

Locus	Secuencia del oligonucleótido
DXS1060	5' AAAATTTAAAACATCTACTAGGCAGA3' 5' TACTGCGAACGGTGAGAG 3'
DXS8051	5' ACCAGAAATGAGCGATTATTG 3' 5' TTTTGAACCTAAGAACCTGGAG 3'
DXS987	5' GTTGAGATAATGAGGCCAGT 3' 5' ACNTTAAAAGCCTGGTTCTTCTAAA 3'
DXS1226	5' CTAACCCCATCTGNCCTC 3' 5' TTTCCAGCAACTACCTTTCAT 3'
DXS1081	5' ATTTGTAAACCCCTTCTGATTG 3' 5' ACGATAGACCATTATGATGTGT 3'
DXS8039	5' AACTAACAAACCTCTAGCCAG 3' 5' TTACATGTCCATGTGAACAG 3'
DXS985	5' TTTCCAAACTTCACTAAAAC 3' 5' AAAATGTTGTTGACTGGTC 3'
DXS992	5' AAGAATGGGACTCCATTTC 3' 5' GCTTATCCACTGGGACAGAA 3'
DXS1218	5' AAGACTAAGATTGTTTCAGTTTGT 3' 5' GTGCTTTTGTAAATTTAACCCA 3'
AFMa082xb9	5' TCTTCAGTTATACCTTCTGGC 3' 5' GAACTCTTGACTTGCAGTTT 3'
DXS1235	5' AAGGTTCCCTCCAGTAACAGATTTGG 3' 5' TATGCTACATAGTATGTCCTCAGAC 3'
DXS1036	5' TGCAGTTTATTATGTTTCCAG 3' 5' GCCATTGATAAGTGCCAGAT 3'
DXS1067	5' TATGTCCTCAGACTATTCAGATGCC 3' 5' CCTCCAGTAACAGATTTGGGTG 3'
DXS1214	5' TAGAACCCAAATGACAACCA 3' 5' AAGATAGCAGGCAACAATAAGA 3'
DXS997	5' TGGCTTTATTTTAAGAGGAC 3' 5' GTTTTCAGTTTCCTGGGT 3'
DXS1068	5' CCTCTAAAGCATAGGGTCCA 3' 5' CCCATCTGAGAACACGCTG 3'

DXS8014 5' GGCAAAGTTGTCAGAGGC 3'
5' CAAATGGCTTGTCCAGTT 3'

DXS993 5' GGATCCTGTTTACAGCCTGT 3'
5' CTACAGAGCAGTTCCTACTGGG 3'

DXS991 5' ACTTCAACCACAGAAGCCTC 3'
5' ATCATTGAGCCAATTCTCC 3'

DXS986 5' CCTAAGTGCTCATCATCCCA 3'
5' AGCTCAATCCAAGTTGCTGA 3'

DXS990 5' AGCTATATGACCAGTACAAACATAC 3'
5' GACAGAAGGGACATCAACTC 3'

DXS1106 5' TATGAGAACTCCCTAAACAAA 3'
5' TGATGCACCAAATACCA 3'

DXS8055 5' AGTGGGTCCTCTAGTCATCAT 3'
5' TCAGGTTTCTGTGTGGACAT 3'

DXS1001 5' TACAAGTAACCCTCGTGACA 3'
5' GTTATGGAATCAATCCAAGTG 3'

DXS1047 5' CCGGCTACAAGTGATGTCTA 3'
5' CCTAGGTAACATAGTGAGACCTTG 3'

DXS1227 5' AGAGGTCCGAGTCTTCCAC 3'
5' ATAAGGGTTTACTCCCCCAA 3'

DXS8043 5' AGTTCTCAGAAACATTTGGTTAGGC 3'
5' AATTATTGGCAAAGAGTACAGGCAG 3'

DXS8091 5' CACATTCAGGTTCCACAGG 3'
5' CAAGATCCAGGCAAAGTC 3'

DXS1073 5' GGCTGACTCCAGAGGC 3'
5' CCGAGTTATTACAAAGAAGCAC 3'

ANEXO 2. Características de los *loci* microsatélites utilizados

MARCADOR (fluorocromo)	cM	LOCALIZACION CITOGENETICA	INTERVALO DE TAMAÑO (pb)
DXS1060[NED]	15.12	Xp22.3-p22.3	243-263
DXS8051[NED]	17.29	Xp22	110-140
DXS987[FAM]	22.18	Xp22	210-232
DXS1226[NED]	27.59	Xp22	284-306
DXS1061[FAM]	29.63	Xp22 1-p21 3	218-233
DXS8039[FAM]	30.84	Xp21.3	145-153
DXS985 [FAM]	30.86	Xp21 3-p21 1	133-139
DXS992[FAM]	30.99	Xp21.3-p21.1	201-212
DXS1218[FAM]	31.49	Xp22.3-p21.3	261-275
AFMa082xb9[FAM]	31.50	Xp21 3	125-152
DXS1235[HEX]	32.50	Xp21.3-p21.2	233-251
DXS1036[FAM]	33.54	Xp21.3-p21.1	141-151
DXS1067[FAM]	33.56	Xp21.3-p21.1	212-230
DXS1214[HEX]	33.58	Xp21.3-p21.1	287-301
DXS997[FAM]	33.60	Xp21.3-p21.1	105-117
DXS1068[HEX]	37.33	Xp21.1-p11 4	248-288
DXS8014[FAM]	37.35	Xp21 1-p11 4	265-283
DXS993[FAM]	42.21	Xp11 4-p11 3	271-297
DXS991[NED]	52.50	Xp11.21	316-344
DXS986[FAM]	57.37	Xq21.1	156-184
DXS990[FAM]	60.62	Xq21.3-q22	128-138
DXS1106[HEX]	66.58	Xq22	118-132
DXS8055[HEX]	70.91	Xq23	314-326
DXS1001[HEX]	75.79	Xq24	194-214
DXS1047[HEX]	82.07	Xq25	160-174
DXS1227[FAM]	88.33	Xq26	84-104
DXS8043 [NED]	94.22	Xq27	160-184
DXS8091 [HEX]	96.14	Xq27	84-106
DXS1073[FAM]	102.35	Xq28	310-336