

## MECANISMOS GENETICOS DE DETERMINACION SEXUAL EN MAMIFEROS.

por Néstor O. Bianchi.

IMBICE, C. C. 403. 1900 La Plata.

### RESUMEN

El desarrollo del testículo en los mamíferos depende de la existencia de un cromosoma Y. La ausencia de este elemento promueve el desarrollo de ovarios. Los estudios realizados en casos humanos y ratón con discordancia entre el sexo genético y el sexo fenotípico indican que el gen responsable del desarrollo testicular se encuentra en un segmento de 140 kilobases ubicado en el brazo corto del Y humano, o en la región cercana del centrómero en el cromosoma Y de ratón. Recientemente en humanos y ratón ha podido clonarse y caracterizarse un gen (*SRY/Sry*) el cual parece ser el iniciador del proceso de diferenciación gonadal embrionaria que conduce a la aparición del testículo. Además del gen *SRY/Sry* se han identificado otros genes (*ZFY/Zfy*, *ZFX/Zfx*, genes autosómicos) que participan en el proceso de determinación sexual de los mamíferos. La estructura y función de estos genes aún no ha sido definitivamente aclarada.

### ABSTRACT

Testis development in mammals depends on the presence of a Y chromosome. The lack of this element promotes ovary development. The studies performed in humans and mouse showing discordance between the genetic and phenotypic sex indicate that the gen responsible for testicular development maps to a 140 kilobases segment located in the short arm of the human Y, and to a centromere close segment in the Y chromosome of the mouse. Recently, in humans and mouse, it has been possible to clone and characterize a gene (*SRY/Sry*) that seems to trigger the differentiation of the embryonic gonad into testis. Besides the *SRY/Sry* several other genes (*ZFY/Zfy*, *ZFX/Zfx*, autosomal genes) involved in the process of sex determination have been identified. The characterization and role of these genes have not yet been clarified.

### INTRODUCCION

Bridges (1939), en su revisión: "Cytological and Genetic Basis of Sex" hacía notar: "Sex determination in numerous forms with visible distinction between the chromosome groups of the two sexes was at first interpreted on a 'quantitative basis' as due to graded amounts of 'sex chromatin'. But because even more species were

encountered in which no visible chromosome difference was detected, the formulation was changed to include also 'qualitative differences in sex chromatin'. Now sex is reinterpreted in terms of genes, with investigation by breeding tests penetrating to detail far beyond the reach of cytological investigation. The chromosomal differences are now treated as rough guides, and chromosomal determination is being resolved into gene determination..."

Conferencia pronunciada durante la entrega del premio "Angel Gallardo" 1986-1988 y su incorporación como Académico Correspondiente en La Plata, Pcia de Buenos Aires, el día 5 de noviembre de 1991.

Aunque han transcurrido más de 40 años desde que Bridges hiciera la afirmación anterior, los mecanismos genéticos de determinación sexual continúan siendo un interrogante para la mayor parte de los or-

ganismos. En el caso de los mamíferos sabemos que existen más de 4.000 especies vivientes. En casi todas ellas, al igual que en el hombre y el ratón, el sistema cromosómico de determinación sexual es XX para las hembras y XY para los machos. Asimismo, las hembras producen óvulos X y los machos espermatozoides X e Y, por lo tanto, el sexo genético (XX o XY), queda establecido en el momento en que un óvulo es fertilizado por un espermatozoide.

Los estudios en humanos y ratones con anomalías de los cromosomas sexuales demostraron el rol esencial del cromosoma Y en la determinación del sexo. Independientemente del número de cromosomas X, la presencia de un Y (p. ej. XY, XXY, XXXY) determina que el embrión se diferencie como macho (Jacobs & Strong 1959). Por el contrario, la ausencia del Y (p. ej. XX, XO) induce el desarrollo de hembras (Ford et al. 1959, Welshons & Rusell 1959). Es obvio, entonces, que el Y es el cromosoma maestro responsable de la determinación sexual y que en él, debe residir el gen o los genes que inician el proceso que culminará en el nacimiento de un macho o de una hembra. Gracias a las investigaciones de diversos grupos, ha sido posible identificar varios de los genes que participan en la determinación sexual. El objetivo de esta revisión es detallar los mecanismos de determinación sexual de los mamíferos tal como se los acepta hoy día, y señalar los problemas que aún quedan por develar.

## Dedos de Zinc

Existen diversas proteínas con una estructura molecular que les permite interactuar con la cadena de ADN, produciendo la modulación en la expresión de determinados genes. Una de estas variedades de proteínas son las "zinc finger" o "dedos de zinc", las cuales se caracterizan por presentar varias regiones o dominios estructurales con capacidad para unirse al ADN. Cada uno de estos dominios se repite un número variable de veces, contiene 7 a 11 átomos de zinc por molécula, dos pares constantes de citidinas e histidinas, y varios otros aminoácidos conservados (Struhl 1989). Estos "dedos" estructurales se inter-

calan en los surcos de la doble hélice de ADN produciendo modificaciones locales y a distancia en la arquitectura de la molécula de ADN, las cuales dan lugar a cambios en el nivel de transcripción de ciertos genes. A su vez, los genes que codifican estas proteínas reguladoras reciben el nombre de "genes dedos de zinc". Uno de estos genes ha sido localizado en la región del cromosoma Y que promueve la determinación del sexo en los mamíferos.

En la patología sexual humana se conoce la existencia de casos con fenotipo masculino y cromosomas sexuales XX, y opuestamente, con fenotipo femenino y cromosomas sexuales XY. Mediante técnicas citogenéticas de bandeado G fino pudo determinarse que un pequeño segmento del brazo corto del Y (aproximadamente el 1%, o 1.110 kilobases, de la longitud total del cromosoma Y humano) testificaba positivo en el cariotipo de los varones XX y se encontraba ausente en el cariotipo de las mujeres XY (Disteche et al. 1986, Vergaud et al. 1986). Obviamente, esta región del Y debería contener el gen responsable del desarrollo testicular el cual recibe el nombre genérico de *TDF* por "test determining factor" (factor de determinación sexual). (Figura 1).

Mediante sondas específicas para distintas regiones del cromosoma Y, fue posible analizar con más exactitud los reordenamientos estructurales de este cromosoma en diversos casos de mujeres XY y varones XX. Así, pudo delimitarse un segmento de 280 kilobases; segmento 1A, y subdividir en tres regiones: 1A1A, 1A1B y 1A2 correspondientes a los puntos de ruptura y translocación del Y en tres pacientes con disenso entre el sexo cromosómico y el fenotípico (Figura 2).

El segmento 1A se ubica en el brazo del Y, inmediatamente proximal a la región pseudoautosómica (región de crossing over con el X) y por lo tanto pertenece a la región específica del Y que no intercambia material genético con el X (Figura 2) (Burgoyne 1982, Page et al. 1987).

El primer gen aislado y clonado, proveniente de la región 1A fue el *ZFY* (los genes humanos se identifican con acrónimos en mayúscula; en todas las otras especies de mamíferos la primera letra del acrónimo es mayúscula y todas las demás minúsculas,

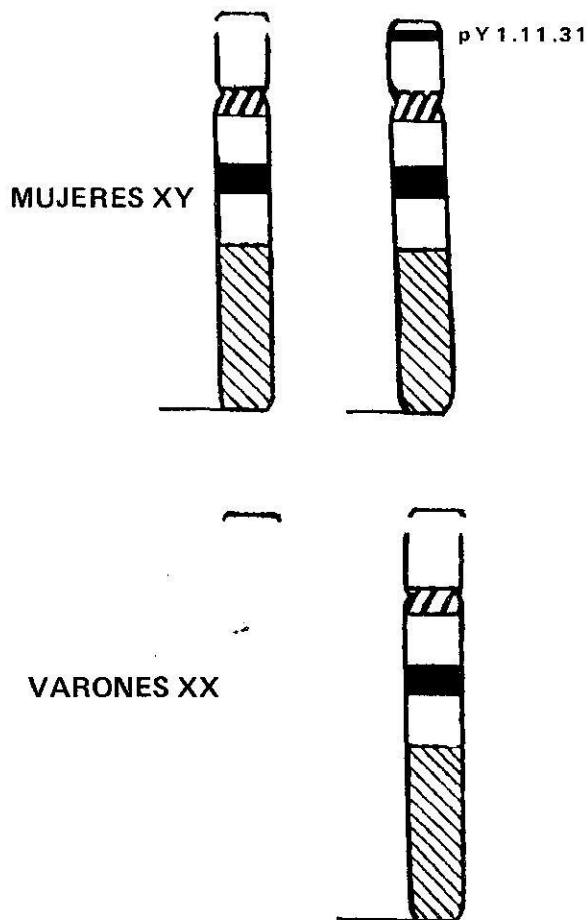


Fig. 1.-La imagen superior izquierda representa el esquema de bandeado G del cromosoma Y humano. Algunos pacientes con genotipo XY y fenotipo femenino (mujeres XY) muestran una deficiencia de la banda G pY1.11.31 (esquema superior derecho). Opuestamente en algunos varones con genotipo XX muestran la presencia de la banda G pY1.11.31 en su cariotipo.

p.ej. *Zfy*). Estas siglas corresponden a la primera letra de "zinc finger of the Y", o dedos de zinc del Y. El estudio de este gen demostró que estaba ubicado en la subregión 1A2 del Y (Figura 2), que presentaba 4 ó 5 exones y una isla de CpG en el extremo 3' del gen, y que codificaba una proteína con un dominio ácido y un dominio "dedos de zinc" que contenía 13 unidades "digitales de zinc" correspondientes al último exón del gen.

Inicialmente se pensó que el *ZFY/Zfy* era el gen determinante del sexo, y por lo tanto

equivalente al *TDF/Tdf*. Los datos que apoyaban esta hipótesis eran los siguientes: a) Un alto nivel de conservación en todas las especies de mamíferos estudiadas, tal como es de esperar para el gen *TDF* (Page et al. 1987). b) El hallazgo de este gen en algunos de los casos de varones XX. c) La ausencia de este gen en algunos casos de mujeres XY. d) El ratón de laboratorio muestra dos genes *Zfy*, denominados *Zfy<sub>1</sub>* y *Zfy<sub>2</sub>*. El estudio de distintas cepas de *Mus musculus* con fenotipo masculino y cariotipo XX reveló que algunas de ellas exhibían la presencia del *Zfy<sub>1</sub>* y el *Zfy<sub>2</sub>*, mientras que otras presentaban el *Zfy<sub>2</sub>* pero no el *Zfy<sub>1</sub>*, por lo cual se concluyó que el *Zfy<sub>1</sub>* era el gen equivalente al *Tdf* (Page et al. 1987, Mardon et al. 1989, Nagamine et al. 1989, Affara et al. 1989).

Las pruebas a favor del rol del gen *ZFY/Zfy* en la determinación sexual parecían incontrovertibles. Sin embargo, pronto comenzaron a aparecer datos contrarios a esta hipótesis. El empleo de sondas de ADN específicas para el gen *ZFY/Zfy* permitió identificar y aislar un gen altamente homólogo (aunque no alélico), ubicado en el cromosoma X de todas las especies de mamíferos placentarios analizadas. Por su ubicación cromosómica este gen se denominó *ZFX* en humanos (*Zfx* en otras especies) (Page et al. 1987). Dado que el desarrollo testicular en los mamíferos depende de la presencia del cromosoma Y (más especialmente de la presencia del segmento 1A) no resultaba clara la función que podría desempeñar el gen *ZFX/Zfx* en la determinación sexual de los mamíferos.

Los marsupiales o metaterios son mamíferos no placentarios que se han separado evolutivamente de los mamíferos placentarios o euterios hace aproximadamente 120 a 130 millones de años (Marshall-Graves 1987). En los marsupiales el sistema de determinación sexual es similar al de los mamíferos placentarios, o sea: ♀XX/♂XY. En consecuencia, el desarrollo testicular de los marsupiales depende también de la presencia de un cromosoma Y (Marshall-Graves 1987). El estudio de los genes "dedos de zinc" en los metaterios mostró la existencia de un par de alelos autosómicos con un alto grado de homología con los genes *Zfy* y *Zfx* de los euterios (Sinclair et al. 1988). La

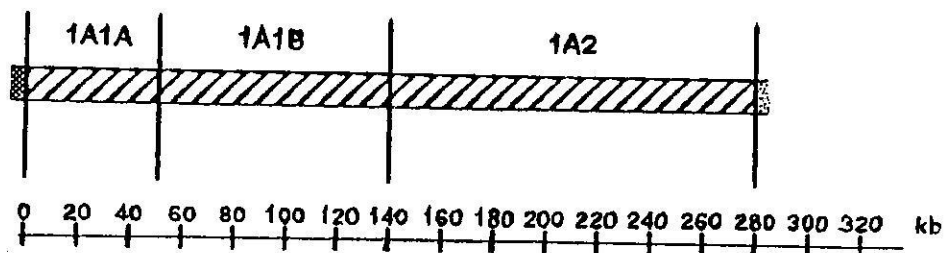


Fig. 2.-Dentro de la banda G pY1.11.31 se encuentra el segmento 1A, compuesto de tres regiones 1A1A, 1A1B y 1A2. La región 1A1A se halla orientada hacia el telómero del brazo corto del cromosoma Y, mientras que la región 1A2 está orientada hacia el centrómero cromosómico.

única forma de explicar estos hallazgos era asumir que el gen *Tdf* era diferente en los metaterios y los euterios, o por el contrario cuestionar la función de determinación sexual asignada al gen *ZFY/Zfy*.

Finalmente en 1989, aparecieron en forma simultánea dos publicaciones que dieron por tierra definitivamente con la supuesta similitud entre el *Zfy* y el *Tdf*.

El estudio de la expresión de los genes *Zfy<sub>1</sub>* y *Zfy<sub>2</sub>* de ratón durante los días que preceden la transformación de la gonada indiferenciada en testículo u ovario (días 10.5 - 12 del desarrollo embrionario de *Mus musculus*) mostró que una cepa (*W<sup>e</sup>*) de ratones de laboratorio desarrolla testículos rudimentarios, carentes de células germinales, en ausencia de transcripción de los genes *Zfy<sub>1</sub>* y *Zfy<sub>2</sub>*. En consecuencia, se concluyó que *Zfy<sub>1</sub>* y *Zfy<sub>2</sub>* son necesarios para la diferenciación de células germinales, pero no para la diferenciación de testículo (Koopman et al. 1989). Por otra parte, Palmer et al. (1989), en un estudio efectuado en 14 casos de seres humanos con genotipo XX y fenotipo masculino encontraron 4 pacientes que daban resultado negativos para la presencia del gen *ZFY*, pero mostraban la existencia de las subregiones 1A1A y 1A1B del Y. Por consiguiente, resultaba obvio que el gen *TDF* debía estar ubicado en una de estas dos subregiones.

### Un Locus en Busca de su Gen

El hallazgo de un fenotipo masculino con testículos rudimentarios en cuatro indivi-

duos XX con traslocación de las subregiones 1A1A y 1A1B y deficiencia del resto del cromosoma Y delimitaba la ubicación del locus correspondiente al gen *TDF*. Diversos grupos de investigadores iniciaron en 1989 la búsqueda del *TDF/Tdf* en humano y ratón. Finalmente a principios de 1990 se identificaron dos genes, el *RPS4Y* en la subregión 1A1B y el *SRY* en la subregión 1A1A. (Fischer et al. 1990, Sinclair et al. 1990). (Figura 2).

El acrónimo *RPS4Y* deriva de: "ribosomal protein S4 of the Y". El estudio de este gen demostró la presencia de un gen homólogo, no alélico, altamente conservado, ubicado en la banda 13.1 del brazo largo del cromosoma X humano denominado *RPS4X*. Los genes *RPS4Y* y *RPS4X* codifican proteínas ribosómicas S4 y por lo tanto no parecen intervenir en los mecanismos de determinación sexual. Sin embargo, como veremos más adelante, estos genes desempeñan un rol importante en la etiología de algunas anomalías fenotípicas que se asocian con la patología de la determinación sexual en humanos. Por otra parte, las proteínas S4 codificadas por los genes *RPS4Y* y *RPS4X* están constituidas por 244 aminoácidos similares y por 19 aminoácidos diferentes, específicos del gen ligado al Y o del gen ligado al X, lo cual determina que existan dos isoformas de proteínas ribosómicas que son sexo-dependientes. (Fischer et al. 1990).

*SRY/Sry* deriva de "sex determining region of the Y". Los estudios de este gen demuestran que: a) Es altamente conservado y está presente en el cromosoma Y de

todas las especies de mamíferos placentarios estudiadas hasta el momento. b) Se ubica en la subregión 1A1A del Y humano y carece de genes homólogos en el X o en los autosomas tanto en humanos como en otras especies de mamíferos. c) El gen *SRY/Sry* se encuentra presente en el genoma de alguno de los varones XX y en el genoma de las cepas de ratones de laboratorio con cromosomas XX y fenotipo masculino. d) Opuestamente, las hembras XY, tanto en humano como en ratón, presentan mutaciones o deficiencias completas del *SRY/Sry* (Sinclair et al. 1990, Gubbay et al. 1990, Berta et al. 1990, Jäger et al. 1990). e) Cuando la región 1A1A del Y humano se aísla, se inyecta a embriones de ratón XX, se transfieren estos embriones a hembras receptoras de ratón seudopreñadas y se los deja llegar a término, se encuentra que algunas crías son XX con fenotipo masculino y testículos carentes de células germinales (Koopman et al. 1991). f) El estudio del *Sry* en dos especies de marsupiales latinoamericanos muestra un ligamiento del gen al cromosoma Y (Bianchi et al. 1993a), mientras que en aves y reptiles con sistemas ZZ/ZW de determinación sexual se encuentran genes homólogos al *Zfy* en los autosomas (*Zfa*) pero no en los cromosomas sexuales (Tiersch et al. 1991).

De los datos anteriores se deduce que el *SRY/Sry* es equivalente al *TDF/Tdf*. Sin embargo, veremos más abajo que aún quedan varios interrogantes por aclarar.

### Lo Inusual nos Aclara lo Usual

Las excepciones a la regla son importantes; en ocasiones para cuestionar la regla, y en otras para confirmarla o aclararla. En relación al axioma de que el cromosoma Y de los mamíferos es el desencadenante de la diferenciación testicular, existen tres excepciones que son importantes por el tipo de información que aportan o por los interrogantes que plantean.

*Mus musculus* y *Mus domesticus* son dos variedades de ratón comúnmente empleadas en los trabajos de laboratorio. En ambos casos la diferenciación de la gonada primitiva en testículo u ovario depende del sistema XX/XY de cromosomas sexuales. Me-

dante múltiples retrocruzas dirigidas de *M. musculus* ♀ x *M. domesticus* ♂ es posible producir ratones con todos los autosomas y un cromosoma X proveniente de *M. musculus* y un cromosoma Y de *M. domesticus* (Y<sup>do</sup>). Obviamente, el Y<sup>do</sup> es normal, ya que es el responsable del desarrollo testicular en *M. domesticus*. Sin embargo, cuando el Y<sup>do</sup> se asocia con un entorno cromosómico proveniente de *M. musculus* (autosoma-X<sup>mu</sup>) da lugar a la aparición de hembras XY o de ratones hermafroditas con ovotestes (Eicher & Washburn 1983, 1986). El análisis genético de diferentes cruzas de *M. musculus* x *M. domesticus* ha permitido identificar tres genes autosómicos, *Tda-1*, *Tda-2* y *Tas* (por: "testis determination autosomal" y "T-associated sex reversal") ubicados en distintos pares cromosómicos. Aparentemente, el desarrollo del testículo dependería de una interacción armónica entre el *Sry* y los genes *Tda-1*, *Tda-2* y *Tas*. Una ruptura en la sincronía de interacción génica, tal como la que acontecería en los ratones: "autosomas-X<sup>mu</sup>/Y<sup>do</sup>", produciría una alteración en la diferenciación de la gonada embrionaria con la aparición de ovarios. En humanos y también en ratón, se ha informado la presencia, en un par autosómico, de un gen homólogo del *ZFY* (*ZFA/Zfa*) (Affara et al. 1989, Ashworth et al. 1990) el cual desempeñaría un rol en la determinación sexual (Koopman et al. 1990).

En Escandinavia existe una variedad de ratones (*Myopus schisticolor*), cuyas poblaciones naturales muestran hasta un 50 % de las hembras con fertilidad normal y cromosomas sexuales XY. El estudio citogenético de estos ratones muestra dos variedades de cromosomas X: X y X\*. El cromosoma X\* es ligeramente más corto que el X debido a un reordenamiento estructural del brazo corto. (Herbst et al. 1978). Todos los machos de esta especie son XY. Por otra parte, las hembras pueden ser XX, XX\* o X\*Y. Durante la ovogénesis de las hembras X\*Y ocurre un mecanismo de doble nondisyunción por el cual se elimina el cromosoma Y y se producen exclusivamente óvulos X\*. En consecuencia, la descendencia de las cruzas X\*Y♀ x XY♂ está exclusivamente constituida por hembras X\*X y X\*Y (Fredga 1983).



Los hallazgos en *Myopus* indican la existencia de genes de determinación sexual ligados al X y demuestran que el desarrollo testicular depende tanto de los genes del Y, como de los genes de determinación sexual del X. Recientemente se ha demostrado que las hembras X\*Y de *Myopus* muestran normalidad estructural del gen *Sry* (Lau, Fredga comunicación personal), una amplificación con más de 15 copias del gen *Zfy* en los machos XY y hembras X\*Y (Lau et al. 1991) y una alteración estructural del gen *Zfx* ligado al X\*. Este último hallazgo permitió proponer que el gen *Zfx* está vinculado a la diferenciación gonadal (Lau et al. 1991). Esta suposición está apoyada por el hallazgo de dos mujeres XY con alteraciones estructurales y duplicación de un segmento del cromosoma X que contiene al gen *ZFX* (Scherer et al. 1989).

El género *Akodon* comprende un gran número de especies de ratones cricétidos endémicos del continente sudamericano (Reig 1984). En las poblaciones naturales de varias de estas especies, (p. ej: *A. azarae* y *A. mollis*), se observa que 10 a 40 % de las hembras tienen fertilidad normal y un cariotipo XY (Bianchi y Contreras 1967, Bianchi et al. 1971, 1989, Lobato et al. 1982, Liascovich 1991, Vitullo et al. 1986).

El análisis de las cruas dirigidas de *A. azarae*, en condiciones de laboratorio, indica que las hembras XY derivan de las cruas XY♀ x XY♂ y nunca de las cruas XX♀ x XY♂ (Lizarralde et al. 1982, Espinoza 1991). Estos resultados demuestran que el desarrollo de fenotipo hembra XY se debe a una alteración del Y y no del X. En consecuencia, en las especies de *Akodon* con sexo genético y fenotípico no coincidentes existirían dos variedades de cromosomas Y. Un Y con capacidad de promover el desarrollo testicular, el cual se transmitiría por vía de los machos, y un Y\* con incapacidad para inducir la diferenciación testicular, el cual se transmitiría por vía de las hembras XY\*.

Las hembras XY\* producen óvulos X eY\*, los cuales al ser fertilizados dan lugar a embriones XX\*♀, XY\*♀, XY♂ e YY\*, estos últimos no viables. Para compensar la pérdida de los embriones YY\*, las hembras XY\* hiperovulan (promedio de óvulos por ciclo en las hembras XX = 5,7 contra 8,75 de las

hembras XY\*). Debido a este fenómeno el tamaño de camada de las cruas XX♀ x XY♂ y XY\*♀ x XY♂ es similar (promedio de crías = 4,5 por camada) (Lizarralde 1981, Lizarralde et al. 1982). Es interesante mencionar que el estudio de la meiosis en los ovarios de las hembras XY\* revela la presencia de una "vesícula sexual" en los ovocitos paquiténicos similar a la observada en los espermatocitos paquiténicos de los machos (Solari et al. 1989).

Mediante el empleo de técnicas moleculares ha sido posible establecer que no existen diferencias en la estructura de los genes *Zfx*, *Zfy* y *Sry* provenientes de hembras XY\* en relación a machos XY, y que tampoco existen diferencias entre los genes *Zfx* de las hembras XX y los de las hembras XY\*. Sin embargo, se encontró que los genes *Zfy* y *Sry* estaban amplificados, con un número de copias que variaba de 2 a 24 dependiendo del gen y la especie (Bianchi et al. 1989, 1992, 1993). Llamativamente, tres especies (*M. schisticolor*, *A. azarae*, *A. mollis*) con hembras XY, muestran amplificación del *Zfy*, y dos especies (*A. azarae*, *A. mollis*) exhiben amplificación del *Sry*. Sin embargo, el hallazgo de amplificación del *Zfy* y *Sry* en otras siete especies de roedores Akodontinos en las cuales no existen hembras XY\*, permitió concluir que la amplificación de estos genes es una característica del grupo probablemente no vinculada con la inversión sexual.

¿Si la amplificación de los genes *Zfy* y *Sry* no es la responsable directa del disenso entre sexo genético y sexo fenotípico observado en *Akodon*, cuál es la causa de este disenso?

El estudio estructural de los genes *Zfy* y *Sry* de *Akodon* fue realizado mediante métodos (Southern y PCR) que no permiten la identificación de mutaciones de punto. En consecuencia, en estos momentos se está efectuando la secuenciación del gen *Sry* de *A. azarae* y *A. mollis* con el fin de identificar diferencias en la composición de bases entre el gen proveniente de las hembras XY\* y el de los machos.

Una segunda posibilidad para explicar el proceso de inversión sexual en *Akodon*, es la eventual existencia de una expresión a destiempo del gen *Sry*. En *M. musculus* el

gen *Sry* se transcribe exclusivamente en los tejidos de la gonada primitiva durante las 24 a 48 horas que preceden a la diferenciación testicular (Koopman et al. 1990). Si durante este período crítico el gen no se expresa, la gonada primitiva sigue la vía de la diferenciación ovárica. En consecuencia, es probable que un retraso de más de 48 horas en el momento de activación del gen *Sry* de *Akodon* pudiera dar lugar a la aparición de las hembras XY\*. Esta posibilidad está siendo activamente investigada en la actualidad.

### Un Mensajero con Varios Mensajes

Casi todos los genes de los organismos eucariontes están organizados en regiones o dominios denominados exones, separados por otros dominios denominados intrones. Cada uno de los exones de un gen codifica una región diferente de la proteína propia de dicho gen. Opuestamente, los intrones no tienen secuencias codificantes. Durante el proceso de transcripción se sintetiza un ARNm primario que es la copia complementaria de todos exones e intrones del gen. Ulteriormente este ARNm es procesado produciéndose la eliminación de las secciones correspondientes a los intrones y el empalme de las secciones correspondientes a los exones. Se origina así un ARNm maduro portador de la información completa para la síntesis del producto génico (Watson et al. 1983).

Desde hace algún tiempo se sabe que el ARNm primario derivado de ciertos genes eucariontes (p. ej: gen de calcitonina y gen de fibrinógeno, Anava et al. 1982, Crabtree et al. 1982) puede ser procesado en forma alternativa y que mediante la eliminación de diferentes exones e intrones pueden originarse dos o más ARNm maduros y dos o más proteínas a punto de partida de un único gen. Recientemente ha podido demostrarse que el procesamiento alternativo desempeña un rol fundamental en la determinación sexual de *Drosophila melanogaster* (ver revisión de Wolfner 1988 y Baker 1989).

*Drosophila* posee un sistema cromosómico sexual XX♀/XY♂ similar al de los mamíferos. Sin embargo, a diferencia de los ma-

míferos el cromosoma Y es genéticamente inerte, y en consecuencia las diferencias sexuales dependen del número de cromosomas X: dos cromosomas X originan una hembra, un único cromosoma X origina un macho. Resulta evidente que la determinación genética en *Drosophila* no depende de la calidad de los genes, ya que éstos son los mismos en machos y hembras, sino de la cantidad de los genes ligados al X; una doble dosis promueve el desarrollo de hembras, mientras que una dosis simple induce la aparición de machos. En última instancia la diferenciación sexual en *Drosophila* depende de un conjunto de genes reguladores y estructurales similares, los cuales, mediante un procesamiento alternativo de los ARNm primarios producen ARNm maduros diferentes que inducen el desarrollo de *Drosophila* machos o hembras (Wolfner 1988, Baker 1989).

En los mamíferos el gen *SRY/Sry* es propio de los machos. Opuestamente los genes *ZFY/Zfy* y *RPS4Y* tienen contrapartes homólogas en el X, y los genes autosómicos de determinación sexual son los mismos en machos y hembras ¿Podría ocurrir entonces, que la presencia o ausencia del gen *SRY/Sry* produjera procesamiento alternativo del ARNm y una cascada de eventos diferentes que diera lugar a la aparición de machos o hembras? La respuesta a esta pregunta no es simple, ya que en mamíferos carecemos de una información similar a la existente en *Drosophila*. Sin embargo, existen algunos datos que parecen sugerir un mecanismo de este tipo.

El estudio de la transcripción en líneas celulares linfoblastoides humanas muestra la existencia de un procesamiento alternativo del ARNm primario del gen *ZFX*, con producción de las isoformas proteicas *ZFX<sup>304</sup>* y *ZFX<sup>575</sup>* (el número indica la cantidad de aminoácidos de las isoformas). Dado que estas isoformas son proteínas "dedos de zinc", se ha sugerido que ambas regulan un mismo gen produciendo una expresión diferencial y una diferente cascada de eventos (Schneider-Gädike et al. 1989b). El hallazgo de procesamiento alternativo del gen *ZFX* en tejidos testiculares, ováricos y somáticos humanos (Lau y Chan 1989) aporta pruebas adicionales a favor de un mecanismo de de-

terminación y diferenciación sexual en mamíferos mediado por diferentes transcritos de un mismo gen. La confirmación de esta hipótesis dependerá, sin embargo, de la identificación de los genes autosómicos de determinación sexual en mamíferos y de sus correspondientes transcritos, productos y funciones.

### **Cuando la Compensación de Dosis se Descompensa**

En todas las especies de mamíferos el cromosoma Y es considerablemente más pequeño que el X. En consecuencia, las hembras, con un par cromosómico sexual XX poseen más material genético que los machos XY. Esta diferencia cuantitativa se cancela mediante un mecanismo (compensación de dosis) por el cual uno de los cromosomas X de las hembras se inactiva genéticamente en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario. Esta inactivación comienza en una región del X denominada "centro de inactivación" desde la cual se extiende a lo largo del cromosoma (ver revisión en Lyon 1991) y afecta al azar el X de origen materno o el X de origen paterno en cada célula del individuo.

Recientemente se ha identificado un gen, *XIST* en humano y *Xist* en ratón ("X inactivation specific transcript) el cual está ubicado en el centro de inactivación, se expresa en el X inactivo y se mantiene reprimido en el X activo (Brown et al. 1991, Borsani et al. 1991, Brockdorff et al. 1991). Por tal motivo, actualmente se considera que la activación del *XIST/Xist* desencadena la inactivación del cromosoma X portador.

En los seres humanos, algunos de los genes ligados al X p. ej. *STS*, *MIC2* y *XG*, escapan al proceso de inactivación génica (el *Sts* también escapa a la inactivación génica en el ratón). En consecuencia, en las hembras, estos genes se expresan en doble dosis como cualquier par de alelos autosómicos (Shapiro et al. 1979, Migeon et al. 1982, Goodfellow et al. 1981, 1984). *ZFX* y *RPS4X* también escapan de la inactivación génica del X y si bien estos genes carecen de alelos cuentan con contrapartes homólogas en el Y (*ZFY*, *RPS4Y*), por lo cual puede

asumirse que también se expresan en doble dosis tanto en las mujeres como en los varones (Schneider-Gädicke 1989a, Fisher et al. 1990).

Debido a la proximidad de mapeo (ligamiento) de los genes *SRY*, *RPS4Y* y *ZFY*, es común que en los pacientes con patología de la determinación sexual por deficiencia del gen *SRY* existan también deficiencias de los genes *RPS4Y* y *ZFY*, lo cual determina que estos individuos presenten expresión de un único gen (*RPS4X* y *ZFX*); este fenómeno se denomina haploinsuficiencia.

Actualmente existen datos que sugieren que la haploinsuficiencia del *RPS4* da lugar a la aparición de un fenotipo caracterizado por talla baja (inferior a 1.45 m), tórax ancho, pliegues cutáneos en el cuello y ligera a moderada deficiencia mental (Fisher et al. 1991). De confirmarse estos hallazgos, podría diagnosticarse la presencia o ausencia del gen *RPS4Y* con la sola observación del fenotipo de los pacientes.

Por otra parte, no existe información acerca de los síntomas que pueden originarse por haploinsuficiencia del gen *ZF*. Sabemos que el gen *ZFY* interviene en el desarrollo normal de la espermatogénesis (Koopman et al. 1991). Por lo tanto, es factible que algunos casos de esterilidad masculina por ausencia primaria de células germinales pudieran deberse a una deficiencia del gen *ZFY*.

### **Panorama General**

La información acumulada indica que el desarrollo testicular depende de una cascada de eventos promovida por la acción cooperativa del gen *SRY/Sry* con genes autosómicos y genes ligados al X. Opuestamente, la ausencia del gen *SRY/Sry* permitiría el desarrollo ovárico a través de una diferente secuencia de eventos en la cual participarían los mismos genes autosómicos y del X. Es probable que un procesamiento alternativo del ARNm primario pueda, en parte, explicar la acción diferente de genes que son comunes a ambos sexos genéticos.

La gonada indiferenciada o primaria está constituida por cuatro variedades celulares: a) células de soporte, b) células productoras



de esteroides, c) células conectivas, d) células germinales. El primer indicio de desarrollo testicular es la diferenciación de las células de soporte en células de Sertoli con transformación de la gonada indiferenciada en "cordones testiculares". Como efecto secundario a la aparición de las células de Sertoli se produce la diferenciación de las células secretoras de esteroides en células de Leydig, la inhibición mitótica de las células germinales y el desarrollo del tejido conectivo en un típico patrón testicular (Burgoyne 1988).

El desarrollo ovárico es precedido por el inicio de la meiosis en las células germinales (McLaren 1988). Posteriormente, las células de soporte se diferencian en células foliculares que se organizan rodeando a los ovocitos en forma de corona. Simultáneamente las células secretoras de esteroides forman las células de la teca, y el tejido conectivo se organiza en un patrón ovárico. En ausencia de células germinales el ovario no desarrolla, lo cual indica que las acciones génicas que inician la diferenciación de la gonada femenina tienen lugar en dichas células (McLaren 1988). Opuestamente, las células germinales no son necesarias para el desarrollo del testículo. Por lo tanto, es probable que las acciones génicas responsables del desarrollo de la gonada masculina tengan lugar en las células de soporte. En consecuencia, sería posible que la presencia o ausencia del gen *SRY/Sry* determinara la iniciación de actividad génica en las células de soporte o en las células germinativas respectivamente.

Es obvio que el mecanismo genético de determinación sexual en los mamíferos posee un nivel de complejidad insospechado. Aún ignoramos el número de genes que participan y el rol que desempeña cada gen. Todavía no han sido aclaradas las causas de inversión sexual en *Myopus* y *Akodon* y por qué estas especies tienen fertilidad normal en oposición a la infertilidad observada en humanos y ratones con disenso entre el sexo genético y fenotípico.

El *SRY/Sry* es el primer gen en una cadena de genes. Es probable que se necesiten varios años y muchos experimentos para caracterizar cada uno de los genes de esta cadena y develar sus funciones.

## REFERENCIAS

- AFFARA, N.A., CHAMBERS, D., O' BRIEN, J., HABEEBU, S. S. M., KALAIKSIKI, M., BISHOP, C. E., FERGUSON-SMITH, M. A. Evidence for distinguishable transcripts of the putative testis determining gene (*ZFY*) and mapping of homologous cDNA sequences to chromosomes X, Y and G. *Nucleic Acids Res.* 17; 2987-2999 (1989).
- ANAVA, S. G., JONAS, V., ROSENFELD, M. G., ONG, E. S., EVANS, R. M. Alternative RNA processing calcitonin gene expression. *Nature* 298; 240-244 (1982).
- ASHWORTH, A., SKENE, B., SWIFT, S., LOWELL-BADGE, R. *Zfa* is an expressed retroposon derived from an alternative transcript of the *Zfx* gene. *EMBO J.* 9; 1529-1534. (1990)
- BAKER, B. S. Sex in flies: The splice of life. *Nature* 340; 521-524 (1989).
- BERTA, P., HAWKINS, J. R., SINCLAIR, A. H., TAYLOR, A., GRIFFITHS, L., GOODFELLOW, P. N., FELLOUS, M. Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. *Nature* 348; 448-450 (1990).
- BIANCHI, N. O. Sex determination in mammals. How many genes are involved? *Biol. Reprod.* 44; 393-397 (1991).
- BIANCHI, N. O., BIANCHI, M. S. Male specific *Sry* patterns in marsupials. *J. Mammal.* 74; 531-534 (1993a).
- BIANCHI, N. O., BIANCHI, M. S., PAMILO, P., VIDAL RIOJA, L., DE LA CHAPELLE, A. Evolution of zinc finger-Y and zinc finger-X genes in Oryzomine-Akodontine rodents (Cricetidae). *J. Mol. Evol.* 34; 54-61 (1992).
- BIANCHI, N. O., BIANCHI, M. S., TOVANEN, R., DE LA CHAPELLE, A. The sex determining region of the Y gene in *Akodon* (Cricetidae) species with XY females. *Chromosoma* (1993) (en prensa).
- BIANCHI, N. O., CONTRERAS, J. R. The chromosomes of the field mouse *Akodon azarae* (Rodentia Cricetidae) with special reference to sex chromosome anomalies. *Cytogenet. Cell Genet.* 6; 306-313 (1967).
- BIANCHI, N. O., DE LA CHAPELLE, A., VIDAL RIOJA, L., MERANI, M. S. The sex determining zinc finger sequences in XY females of *Akodon azarae* (Rodentia Cricetidae). *Cytogenet. Cell Genet.* 52; 162-166 (1989).
- BIANCHI, N. O., REIG, O. A., MOLINA, O. J., DULOUT, F. N. Cytogenetic of the South American Akodont rodents (Cricetidae). I. A progress report on Argentinian and Venezuelan forms. *Evolution* 25; 724-736 (1971).
- BORSANI, G., TONLORENSI, R., SIMMLER, M. C., DANDOLO, L., ARNAND, D., CAPRA, V., GROMPE, M., PIZZUTI, A., MUZNY, D., LAWRENCE, C., WILLARD H. F., AVNER, P., BALLABIO, A. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* 351; 325-329 (1991).
- BRIDGES, C. B. Cytological basis of sex. En: ALLEN E., DANFORTH C. H., DORSY E. A. (eds) *Sex and Internal Secretions: Williams and Wilkins Co.*, 1939 p: 43-84.

- BROCKDORFF, N., ASHWORTH, A., KAY, G. F., COOPER, P., SMITH, S., MCCABE, V. M., NORRIS, D. P., PENNY, G. D., PATELL, D., RASTAN, S. Conservation of position an exclusive expression of mouse *Xist* from the inactive X chromosome. *Nature* 351; 329-331 (1991).
- BROWN, C. J., BALLABIO, A., RUPERT, J. L., LAFRENIERE, R. G., GROMPE, M., TONLORENZI, R., WILLARD, H. F. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349; 38-44 (1991).
- BURGOYNE, P. S. Genetic homology and crossing-over in the X and Y chromosomes of mammals. *Hum. Genet.* 61; 85-90 (1982).
- BURGOYNE, P. S., Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 322; 63-72 (1988).
- CRABTREE, G. R., KANT, J. A. Organization of the rat v-fibrinogen gene: Alternative in RNA splice patterns produce the  $\gamma$ A and  $\gamma$ B ( $\gamma$ ) chains of fibrinogen. *Cell* 31; 159-166 (1982).
- DISTECHE, C. M., CASANOVA, M., SAAL, H., FRIEDMAN, C., SYBERT, V., GRAHAM, J., THULINE, H., PAGE, D. C., FELLOUS, M. Small deletions of the short arm of the Y chromosome in 46, XY females. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 83; 7841-7844 (1986).
- EICHER, E. M., WASHBURN, L. L. Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu. Rev. Genet* 20; 327-360 (1986).
- ESPINOSA, M. B. Hembras hetero y homogaméticas en el roedor cricétido *Akodon azarae*: su desempeño productivo y mantenimiento en condiciones de laboratorio. Tesis de Doctorado Facultad de C. Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires p. 178 (1991).
- FISHER, E. M. C., BEER-ROMERO, P., BROWN, L. G., RIDLEY, A., MCNEIL, J. A., LAWRENCE, J. B., WILLARD, H. F., BIEBER, F. R., PAGE, D. C. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and implication for Turner syndrome. *Cell* 63; 1205-1218 (1990).
- FORD, C. E., MILLER, O. J., POLANI, P. E., DE ALMEIDA, J. C., BRIGGS, J. H. A sex chromosome-anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome) *Lancet* I 711 (1959).
- FREDGA, K. Aberrant sex chromosome mechanisms in mammals. Evolutionary aspects. *Differentiation* 23 (suppl.); 523-30(1983).
- GOODFELLOW, P. N., MOHANDAS, T., SHAPIRO, L. J. The cell surface antigen locus, MIC2X escapes X-inactivation. *Am. J. Hum. Genet.* 36; 777-782 (1984).
- GOODFELLOW, P. N., TIPPET, P. A human quantitative polymorphism related to Xg blood groups. *Nature* 289; 404-405 (1981).
- HERBST, E. W., FREDGA, K., FRANK, F., WINKING, H., GROOPP, A. Cytological identification of two X-chromosome types in wood lemming (*Myopus schisticolor*). *Chromosoma* 69; 185-191 (1978).
- JÄGER, R. J., ANVRET, M., HALL, K., SCHERER, G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis determining gene *SRY*. *Nature* 348; 452-454 (1990).
- KOOPMAN, P., ASHWORTH, A., LOVELL-BADGE, R. The *ZFY* gene family in humans and mice. *trends Genet.* 7; 132-136 (1991a).
- KOOPMAN, P., GUBBAY, J., COLIGNON, J., LOVELL-BADGE, R. *Zfy* gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* 342; 940-942 (1989).
- KOOPMAN, P., GUBBAY, J., VIVIAN, N., GOODFELLOW, P., LOVELL-BADGE, R. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351; 117-121 (1991b).
- KOOPMAN, P., MÜNSTERBERY, A., CAPEL, B., VIVIAN, N., LOVELL-BADGE, R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348;450-452 (1990).
- LAU Y-F., C., CHAN, K. The putative testis-determining factor and related genes are expressed as discrete-sized transcripts in adult gonadal and somatic tissues. *Am. J. Hum. Genet.* 45; 942-952 (1989).
- LAU, Y-F, C., YANG, K., WIBERG, U. Possible involvement of the *Zfx* gene in sex determination: a case study of the wood lemming. *Cytogenet Cell Genet* (1991) (en prensa).
- LIASCOVICH, R. C. Cariosistemática y evolución cromosómica en roedores akodontinos (Rodentia-Muroidea). Tesis Doctoral. Facultad de C. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. p. 195 (1991).
- LIZARRALDE, M. S. Polimorfismo del cromosoma sexual X en las hembras de *Akodon azarae* (Rodentia Cricetidae). Tesis de Doctorado. Facultad de C. Naturales. Universidad de La Plata. p. 108 (1981).
- LIZARRALDE, M. S., BIANCHI, N. O., MERANI, M. S. Cytogenetics of South American *Akodon* rodents (Cricetidae). VII. Origin of sex chromosome polymorphism in *Akodon azarae*. *Cytologia* 47; 183-193 (1982).
- LOBATO, L., CANTOS, G., ARAUJO, B., BIANCHI, N. O., MERANI, S. Cytogenetics of South American *Akodon* rodents (Cricetidae). X. *Akodon mollis* a species with XY females an B chromosomes. *Genética* 57; 199-205 (1982).
- LYON, M. E. The quest for the X-inactivation centre. *Trends Genet*; 69-70 (1991).
- MARDON, G., MOSHER, R., DISTECHE, C. M., NISHIOKA, Y., MCLAREN, A., PAGE, D. C. Duplication, deletion and polymorphism in the sex determining of the mouse Y chromosome. *Science* 243; 78-80 (1989).
- MARSHALL-GRAVES, J. A. The evolution of mammalian sex chromosomes and dosage compensation: clues from marsupials and monotremes. *Trends Genet.* 3; 252-256 (1987).
- MCLAREN, A. Sex determination in mammals. *Trends Genet* 4; 153-157(1988).
- MIGEON, B. R., SHAPIRO, L. J., NORUM, R. A., MOHANDAS, T., AXELMAN, J., DABORA, R. L. Differential expression of steroid sulphatase locus on active and inactive human X chromosomes. *Nature* 299; 338-340 (1982).
- NAGAMINE, C. M., CHAN, K., KOZAK, C. A., LAU, Y-F. Chromosome mapping and expression of a

- putative testis-determining gene in mouse. *Science* 243; 80-83. (1989).
- PAGE, C. C., MOSHER, R., SIMPSON, E. M., FISHER, E. M. C., MARDON, G., POLLACK, J., MCGILLIVRAY, B., DE LA CHAPELLE, A., BROWN, L. G. The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51; 1091-1104 (1987).
- PALMER, M. S., SINCLAIR, A. H., BERTA, P., ELLIS, N. A., GOODFELLOW, P. N., ABBAS, N. E., FELLOUS, M. Genetic evidence that *ZFY* is not the testis-determining faactor. *Nature* 342;937-939 (1989).
- REIG, O. A. Distribuição geográfica e historia evolutiva dos roedores muroideos subamericanos (Cricetidae: *Sry* modontinae). *Rev. Brasil. Genet.* VII; 2; 333-365 (1984).
- SHAPIRO, L. J., MOHANDAS, T., WEISS, R., ROMERO, A. Non-inactivation of an X chromosome locus in man. *Science* 204; 1224-1226 (1979).
- SCHERER, G., SCHEMPP, W., BACCICHETTI, C., LENZINI, E., BRICARELLI, F. D., CARBONE, L. D. L., WOLF, U. Duplication of an Xp segment that includes the *ZFX* locus causes sex inversion in man. *Hum. Genet* 81; 291-294 (1989).
- SCHNEIDER-GÁDICKE, A., BEER-ROMERO, P., BROWN, I., MARDON, G., LUOH, S. W., PAGE, D. C. The human *ZFX* gene encodes a putative transcription activator with alternative isoforms. *Nature* 342; 708-711 (1989b).
- SCHNEIDER-GÁDICKE, A., BEER-ROMERO, P., BROWN, L. G., NUSSBAUM, R., PAGE, D. C. *ZFX* has a gene structure similar to *ZFY*, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57; 1247-1258 (1989a).
- SINCLAIR, A. H., BERTA, P., PALMER, M. S., HAWKINS, R. J., GRIFFITS, B. L., SMITH, M. J., FOSTER, J. W., FRISCHANF, A. M., LOVELL-BADGE, R., GOODFELLOW, P. N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346; 240-244 (1990).
- SINCLAIR, A. H., FOSTER, J. W., SPENCER, J. A., PAGE, D. C., PALMER, M., GOODFELLOW, P. N., MARSHALL-GRAVES, J. A., Sequences homologous to *ZFX*, a candidate human sex determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature* 336; 780-783 (1988).
- SOLARI, A. J., ESPINOSA, M. B., VITULLO, A. D., MERANI, M. S. Meiotic behavior of gonosomically variant females of *Akodon azarae* (Rodentia Cricetidae ). *Cytogenet. Cell Genet.* 52; 57-61 (1989).
- STRUHL, K. Helex-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends Bioch. Sc.* 14; 137-140 (1989).
- TIERSCH, T. T., MITCHELL, M. J., WATCHEL, S. S. Studies on the phylogenetic conservation of the *SRY* gene. *Hum. Genet.* 87;571-573 (1991).
- VERGNAND, G., PAGE, D. C., SIMMLER, M. C., BROWN, L., RONYER, F., NOEL, B., BOTSTEIN, D., DE LA CHAPELLE, A., WEISSENACH, J. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* 38; 109-124 (1896).
- VITULLO, A. D. MERANI, M. S., REIG, O. A., KAJON, A. E., SCAGLIA, O., ESPINOSA, M. B. Cytogenetics of South American Akodont rodents (Cricetidae): New karyotypes and chromosome patterns of Argentinian and Uruguayan forms. *J. Mammal.* 67; 69-80 (1986).
- WATSON, J. D. TOOZE, J., KURTZ, D. T. Recombinant DNA. A short course. Scientific American Books. W. H. Freedman, ed. p. 260 (1983).
- WELSHONS, W. J. & RUSSELL, L. B. The Y chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45; 560-566 (1959).
- WOLFNER, M. F. Sex-specific gene expression in somatic tissues of *Drosophila melanogaster*. *Trends Genet* 4; 333-337 (1988).