

ARTÍCULO DE REVISIÓN/REVIEW ARTICLE

■ *Revisiones Básicas/Basics reviews*

Elementos genéticos móviles implicados en la evolución del cromosoma "y" con base en estudios moleculares de insectos (*Drosophila*) y de primates

Mobile genetic elements in molecular studies of insects (*Drosophila*) and primates

Enio Hernández Aguirre¹

Resumen

*La mayoría de las especies poseen un macho heterogamético XY y una hembra homogamética XX. En el macho XY sólo se conservan unas regiones donde se intercambian información entre el X y el Y (Xpter y Ypter) durante la meiosis, que se le llama región pseudoautosómica (RSA). Se ha planteado la hipótesis que el cromosoma Y se deriva del cromosoma X, y que antiguamente eran homólogos en toda su extensión. Un posible mecanismo biológico implicado en este proceso evolutivo son fragmentos de ADN que pueden moverse a través del genoma. En general se llaman elementos genéticos móviles. Con base en los elementos génicos móviles y en los genes de la cutícula larval (Lcp) se han realizado estudios en los cromosomas sexuales de *Drosophila melanogaster*, *D. Permisilis*, *D. Seudooscura* y *D. Miranda*. Los análisis moleculares realizados en *D. Miranda* son una clara evidencia científica de cómo un evento de translocación cromosómica asociados a procesos biológicos naturales y normales del ADN, como lo es la transposición, pudieron generar un cromosoma "Y" a través de la evolución, que en su forma prístina fue homólogo del cromosoma X.*

Palabras claves: Región pseudoautosómica (RSA), impronta genómica, elementos genéticos transponibles, translocación cromosómica, cutícula larval, factor determinante del testículo (TDF), región del sexo sobre el Y (SRY), elementos largos dispersos (LINE), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) / SALUD UNINORTE. Barranquilla (Col.) 2006; 22 (2): 154-167

Abstract

*Most of the species have a heterogametic male XY and a homogametic XX female chromosome. In male XY chromosomes there are only some regions that maintain information interchanges between the Y and X chromosomes (Xpter and Ypter) during meiosis, which is called the pseudoautosomic region. There has been put forward a hypothesis that the chromosome Y is derived from chromosome X, and that formerly they were homologous in all its extension. Possible implied mechanisms of this biological mechanism in this evolutive process are DNA fragments that can move through the genome. This are called movable genetic elements. Based in studies the genes of the cuticula larval (Lcp) of sexual chromosomes of *Drosophila Melanogaster*, *D. Permisilis*, *D. Seudooscura* and *D. Miranda* have given evidence of the movable genetic elements. The molecular analyses made in *D. Miranda* are a clear scientific evidence of how an event of chromosomal translocation associated to natural and*

¹ Docente de Embriología y Genética clínica, Universidad del Norte (Barranquilla, Colombia).

Docente de Biología Molecular y Genética Médica, Universidad Cooperativa de Colombia (Santa Marta, Colombia).

Correspondencia: Enio Armando Hernández Aguirre, calle 72 N° 68-59, bloque 25, apto 103. Barranquilla (Colombia). enioarma52@yahoo.com, enioh@uninorte.edu.co.

Fecha de recepción: 9 de marzo de 2006
Fecha de aceptación: 10 de julio de 2006


Vol. 22, N° 2, 2006
ISSN 0120-5552

normal biological processes of the DNA, like is it the transposition, could generate a chromosome Y and to travel across the evolution, that in its pristine form was homologous of chromosome X.

Key words: Pseudo autosomic region, Genomic imprinting, movable genetic elements, Chromosomal translocation, Cuticula larval, testis determining factor (TDF), region of sex on the Y chromosome (SRY), elements long interspersed (LINE), polimerasa chain reaction (PCR) / SALUD UNINORTE. Barranquilla (Col.) 2006; 22 (2): 154-167

INTRODUCCIÓN

Los avances en genética humana se deben primordialmente al estudio de proteínas alteradas, fenotipos anormales y enfermedades genéticas asociadas a un marcador bioquímico conocido. En 1983 (1) los doctores Nacer Abbas, Colin Bishop, Marc Fellous y J. Weissenbach del Instituto Pasteur de París aislaron un fragmento codificante del ADN del cromosoma Y de mamífero, con lo cual comenzaron una serie de investigaciones que dilucidaron la cartografía del cromosoma Y humano. Con base en estudios realizados en machos XX se ha establecido que la zona de recombinación entre los cromosoma X e Y se encuentra en el extremo telomérico del brazo corto de ambos cromosomas. Esta región, llamada pseudoautosómica (RSA), fue demostrada en la especie humana por Weissenbach, H. Cooke y P. Goodfellow en 1985 (2, 3), pero la homología disminuye a medida que se aleja de esta región. En la Región pseudoautosómica los cromosoma X e Y tienen una homología casi del 100%, lo que indica un origen ancestral común de ambos cromosomas (hipótesis propuesta por S. Ohno en 1964). Comentarios del "Trust Sanger Institute" de Cambrigde (Reino Unido) sugieren que el cromosoma "Y" tiene una "biología única" (4) por el proceso de su evolución compartida por machos y hembras. Se han estudiado el 99.3% de las secuencias eucromáticas del cromosoma X, y el análisis comparativo con el genoma sugiere el origen autosomal de los cromosomas sexuales en mamíferos, y también explica el proceso que condujo a la pérdida progresiva de recombinación entre el X y el Y originales, y a la posterior degradación del cromosoma "Y". El análisis molecular responsabiliza a secuencias repetitivas que cubren la tercera parte del cromosoma X, que son llamadas LINE-1 ("long interspersed elements"), y que su distribución concuerda también con un posible papel en el proceso de Inactivación del cromosoma X (4). El estudio de los genes asociados a las regiones no homólogas fue posible gracias al estudio genético de hombres XY infértiles no productores de espermatozoides y de individuos con reversión sexual (5). En 1986 se publicó un mapa del cromosoma Y humano que fue elaborado gracias a las técnicas de genética molecular (6). Tiene escasamente siete regiones transcripcionalmente activas que contienen 13 genes, un fragmento formado por secuencias retrovirales y fragmentos de secuencias altamente repetitivas (7). Si los cromosomas X e Y fueron originalmente homólogos, en los organismos de aquellos primeros tiempos los procesos biológicos génicos y moleculares para la diferenciación morfológica y del comportamiento sexual, posiblemente involucraban mecanismos semejantes a los de la "impronta genómica". Mecanismo que se sabe está implicado en el desarrollo del sexo, comportamiento e inteligencia; que requiere de un equilibrio molecular complejo y que quizás en aquella época inició su proceso de adaptación, lo que podría producir la formación

de cosexuales con trastornos de adaptación. Por lo tanto, la evolución tendría que otorgar esta función a genes específicos para que desarrollaran individuos con un solo sexo. Los cromosoma X e Y de humanos y de otros mamíferos contienen genes con funciones diferentes, a pesar de las evidencias de su homología ancestral. El cromosoma Y posee un grupo de genes para el desarrollo y la reproducción del sexo masculino, y los últimos avances moleculares confirman que en el cromosoma X hay genes que controlan rasgos reproductivos y procesos de inteligencia (8). De los 1.089 genes estudiados en el cromosoma X, 99 codifican proteínas en el testículo (4), y los datos evolutivos que se tienen sobre los cromosoma X e Y comparados con los datos evolutivos de otros autosomas sugieren que fuerzas evolutivas especiales actúan sobre los cromosomas X e Y.

POSIBLE EVOLUCIÓN DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

La mayoría de los mecanismos de diferenciación sexual involucra cromosomas sexuales estructuralmente diferentes. La condición más común es un macho heterogamético (macho XY y hembra XX), pero hay especies que tienen hembras heterogaméticas, que se denominan ZW, con un macho ZZ, como sucede con serpientes y pájaros. Generalmente hay poca o no hay recombinación homóloga entre X e Y; en algunas especies la recombinación es suprimida parcialmente por una inversión cromosómica que distinguen al X del Y; en otras especies, el intercambio se reduce a una región llamada región pseudoautosómica, como sucede en la gran mayoría de los mamíferos (9). En la región Ypter (RSA) se localizan los genes *Mic2* y *XGR*, que son, respectivamente, codificadores de un antígeno de grupo sanguíneo y un regulador de *Mic2* y de *Xg*. El resto de la molécula informativa del Y sólo tiene un número reducido de regiones para el determinismo del sexo masculino, el gen TDF o SRY (10), y regiones para la fertilidad. En *Drosophila Melanogaster*, el Y está exento en su mayor parte de loci genéticamente funcionales, sólo tiene un grupo de genes que transcriben ARN ribosomales, seis loci para la fertilidad del macho y el locus *Stellate*; el gen para el determinismo del sexo parece estar en el cromosoma X (11).

En pájaros no se han detectado secuencias diferentes de ADN en machos y hembras, lo que sugiere que el determinismo del sexo tiene un mecanismo diferente (¿una especie de impronta genómica?) en estas especies (12), y en otras especies se ha establecido que el sexo se determina por la temperatura de incubación del huevo, como sucede en las tortugas. Dos especies de ratas (*Tokudaia osimensis osimensis* y *Tokudaia osimensis*) que habitan en una isla del sudeste de Japón (13, 14) poseen 25 cromosomas (la especie T.o.o.) y 45 cromosomas (especie T.o.). Tanto el macho como la hembra son XO, o sea, no existe el cromosoma "Y". Estos cromosomas X no recombinan y no existe el fenómeno de inactivación del cromosoma X. Estas especies no poseen el gen *Sry* (región del sexo sobre el Y), pero tienen dos genes en la región terminal del brazo "q" del cromosoma X relacionados con el *Tspy* (proteína codificada por el Y específica de la testis) y el *Zfy* (gen relacionado con la espermatogénesis) que tradicionalmente se localizan en el cromosoma Y. ¿Cómo se regula la transcripción de estos genes para desarrollar el testículo sólo en la rata macho? ¿Será un mecanismo semejante al de la impronta genómica?

La molécula de ADN de muchos de los cromosomas Y de diferentes especies consiste en secuencias altamente repetitivas, similar en naturaleza a los elementos genéticos transponibles y a las secuencias satélites (altamente repetitivas) de la heterocromatina céntrica. El tamaño variable del Y (es polimórfico en la especie humana) indica que esas secuencias no son significativas desde el punto funcional y el fenómeno de compensación de dosis es el resultado, en parte, de la ausencia de loci funcionantes en el cromosoma Y e involucra ajustes en la actividad de los loci asociados al cromosoma X, de modo que la tasa de transcripción se equilibre en ambos sexos. Este fenómeno de compensación en la transcripción se logra en la gran mayoría de los mamíferos por inactivación de un cromosoma X en la hembra, mientras que en *Drosophila* se adquiere por aumento de la transcripción de ciertos loci en el X del macho (15, 16). En las hembras de mamíferos, los elementos genéticos móviles LINE ("long interspersed elements") están implicados en la inactivación del cromosoma X. Los LINE se hallan dos veces más en el cromosoma X que en los autosomas y evolutivamente se conocen desde hace 100 millones de años. Un grupo se localiza en Xq13-21, donde se halla el centro de inactivación del X (XIC), mientras que los alelos que escapan a la inactivación tienen un número reducido de los LINE (17). Sin embargo, las ratas de la especie T.o.o. y T.o. poseen acumulación de los retrotransposones LINE y no hacen inactivación del cromosoma X. Según el investigador Scott y colaboradores (18), las secuencias LINE también podrían contribuir a la extinción de especies. Una hipótesis de la inactivación genética del cromosoma Y se le atribuye a Müller (19), que asume que X e Y fueron originalmente homólogos pero con ausencia de intercambio genético en parte o en todo el cromosoma, y sugirió que la región del cromosoma que se mantiene sin intercambio con su homólogo acumula mutaciones deletéreas cuya expresión debe ser recesiva, y por lo tanto no serían eliminadas por la selección ambiental porque no se expresarían. Evidencias de esta homología entre el X e Y se reporta en un trabajo de Toure y colaboradores (20), relacionado con los genes Ssty implicados en la espermatogénesis murina, que tienen homólogos sobre el X. Otros investigadores como Delbridge y colaboradores (21) teorizan que los cromosomas X-Y homólogos prístinos recibieron información adicional de otros cromosomas. Evidencias de la poca recombinación se encuentran en un artículo de Callinan PA y colaboradores (22), quienes estudiaron 345 elementos "Alu" de 8 diferentes subfamilias y hallaron que 16 son polimórficas sobre el cromosoma X y sólo 1 sobre el cromosoma Y. Pero el pro-Y debía contener los mismos loci que el pro-X, y si no tenían recombinación, ambos tendrían que acumular mutaciones de expresión recesiva; por lo tanto, la teoría no explica el proceso de inactivación selectivo del Y ni el fenómeno de compensación de dosis del X.

Si los dos cromosomas, X e Y, estaban originalmente en individuos cosexuales que podían en condiciones favorables convertirse en machos o en hembras, debían transcribir ARNm específicos para la función específica, lo que implicaría pensar que los locus homólogos de estos cromosomas no debían recombinarse y la transcripción debía estar relacionada con el sexo fenotípico y el comportamiento. Con base en esta hipótesis habrían cosexuales fenotípicamente hembras y cosexuales fenotípicamente machos. El actual conocimiento de la impronta genómica, que se ha conservado a través de la evolución, explicaría la activación de sólo uno de los locus de un loci para determinadas funciones que dependerían del sexo; y esta activación sería valedera para las otras moléculas de ADN (diferentes al X e Y) con loci improntados.

¿Cómo se haría la regulación génica de determinados loci en un individuo cosexual para coordinar una determinada expresión proteica y comportamiento con el sexo apropiado? Quizás esta compleja regulación génica activó la fuerza evolutiva que inició la diferenciación de la bisexualidad génica.

En los eventos iniciales del proceso evolutivo fueron necesarios eventos mutacionales para desarrollar sexos diferentes a partir de individuos cosexuales, con una especificidad de expresión génica no ambigua para cada sexo. Como los principales genes relacionados con la expresión fenotípica sexual estaban en un pro-X y en un pro-Y posiblemente homólogos, se establecería por mecanismos biológicos dependientes del ambiente o quizás del azar (?) que uno de los dos cromosomas sufra mutaciones dañinas; ¿tendría la misma posibilidad el pro-X y el pro-Y? Veamos algunos datos referentes a este proceso evolutivo. Se investigó por medio de hibridación “in situ” fluorescencia (FISH) la evolución del cromosoma Y en varias especies de grandes monos, incluyendo al humano (23), y el resultado dado a conocer por los investigadores fue que el cromosoma Y sufrió una rápida y espontánea evolución. La región AZF (factor de azoospermia) mapea en Yq11.2 en el humano, en Yq12.1-12.2 en el chimpancé, en Yq13.2 en el gorila y en Yp13.2 en el orangután (24). Los resultados mostraron que no hay diferencias notables entre los genes de esta región que no recombina. Una publicación del *Howard Hughes Medical Institute* (25) reporta que los genes del cromosoma Y en humanos y chimpancé difieren desde hace 6 millones de años, pero que los genes de la línea humana se han conservado por una “selección purificada” y que en el chimpancé varios genes han sufrido mutaciones inactivas. Trabajos investigativos han reportado procesos evolutivos exclusivos del TDF o SRY (21). Una investigación publicada en el *J. Exp. Zool* en 1998 (26) refiere que el TDF proviene del gen SOX3 (altamente conservado sobre el cromosoma X) quizá por un evento de conversión génica o un evento de “crossing over” desigual cuando eran homólogos. Y a su vez, el gen SOX3 proviene del gen SOX9, aun más antiguo. El SOX9 no es exclusivo de los mamíferos e interviene en el desarrollo de los testículos de todos los vertebrados (27, 28).

Las investigaciones sugieren una predilección hacia un dúo pro-X pro-Y en individuos con un determinado comportamiento sexual que seguramente estaría influenciado por factores ambientales y mecanismos de regulación génica. Aunque hay especies con hembras heterogaméticas (ZW), la mayoría de las especies poseen un macho heterogamético (XY), lo que supone pensar que el proceso deletéreo debió producirse en un cosexual macho. Si la evolución determinó que en el desarrollo embriológico de una determinada especie los genes de la expresión fenotípica hembra se expresaran primero, no se podía sacrificar este proceso de regulación génica adquirido en miles de años (¿millones?), porque se expresarían mutaciones que extinguirían la especie; por lo tanto, el cosexual macho empezaría a mutar en forma deletérea uno de los procromosomas sexuales y el cosexual hembra empezaría a generar una población polimórfica. A través de los años, una reorganización genómica de genes dedicados a la reproducción (mutaciones adaptativas) supondría una invasión poblacional de hembras cosexuales que generaría un polimorfismo en los pro-X y en pro-Y, lo cual produciría la estabilidad homogamética XX. El cosexual macho generaría mutaciones deletéreas en locus no necesarios para su fenotipo y comportamiento, de generación en generación, y quedaría un dúo heterogamético

XY, del cual el cromosoma implicado (que sería el futuro "Y") estaría expuesto a más mutaciones por la no expresión fenotípica de muchos de sus loci originales que no intervienen en el desarrollo del fenotipo del macho. El polimorfismo y viabilidad de su pro-X lo establecería en la población el cosexual hembra.

Un mecanismo de mutación que supone cambios evolutivos bruscos y a saltos son los *elementos genéticos transponibles*; estos fragmentos génicos pueden autorreplicarse e insertarse en nuevos sitios (29, 30). Pueden producir mutaciones dañinas, pueden iniciar la extinción de especies, pero también pueden iniciar el desarrollo de una especie evolutivamente superior. Muchas investigaciones han reportado la intervención de los elementos genéticos móviles en la evolución del cromosoma Y. En el cromosoma Y del pez medaka (31), el gen que determina el sexo masculino (dmat1bY) se localiza en una región duplicada de 43 Kb que contiene un grupo de ligamiento de 9 genes; el único gen que se conservó fue el dmat1bY, los demás degeneraron. Esta región posee grandes tramos de secuencias repetitivas. Dos subfamilias "Alu", la Yg6 y la Y16, se analizaron en una población de genes humanos (32); 25 de los loci estudiados fueron polimórficos por inserción o ausencia de estas dos familias de Alu, que también son elementos genéticos móviles. Se identificaron dos deleciones genómicas asociadas con un evento de retrotransposición e inserción de los elementos Alu. También se comprobó que estos elementos Alu fueron producto de una conversión génica a partir de otros Alu más antiguos preexistentes en el genoma de primates no humanos. Un análisis comparativo entre los cromosomas Y de humanos y de chimpancé muestra una divergencia del 1.78% y en el resto del genoma es de 1.23% (33). Los autores afirman que esto demuestra una rata de evolución acelerada del cromosoma Y. Entre los cambios observados en el cromosoma Y humano están la deleción de 200 Kb en la región pericentromérica, expansión de jóvenes familias Alu y acumulación de elementos LINE. Se ha sugerido que la transposición de secuencias Alu jóvenes genera un polimorfismo de un simple nucleótido (SNP). Los genes que codifican la proteína específica del testículo del humano (TSPY), chimpancé, gorila y orangután fueron secuenciados (34), y fueron detectadas 144 sustituciones de 755 posiciones comparadas. El porcentaje de diferencia entre el humano y el chimpancé es del 1.9%, con el gorila es del 4% y con el orangután es del 8.2%. La rata de sustitución de nucleótidos por sitio y por año en el intrón del TSPY fue del 0.024 en el hombre y el chimpancé, de 0.048 en el gorila y de 0.094 en el orangután. Los investigadores Carroll y colaboradores seleccionaron 2.640 familias Alu Ya5 y 1.852 familias Alu Yb8 en el genoma humano (35) y trabajaron con 475 de estos elementos. El análisis de las secuencias de ADN reveló un bajo nivel de mutaciones aleatorias. Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) determinaron la distribución filogenética y la variación genómica en humanos y primates. El 99% de las familias Alu Ya5 y Yb8 están restringidas al genoma humano y ausente en el genoma de varios primates no humanos, lo que confirma el origen reciente de estos elementos en la evolución humana. Se sugiere que la conversión génica juega un papel en la diversidad de esos elementos Alu. Un fragmento de ADN, el lambda YH2D6, específica del cromosoma Y humano, se encuentra en la región Yq11; este fragmento se ha conservado en el chimpancé pero está ausente en el gorila y el orangután; en estos primates, las secuencias Alu y secuencias repetitivas de tipo GATA están implicadas en la inactivación (36). La familia Alu Yb es una subfamilia de elementos cortos dispersos (SINE) específica del humano, viajan por el genoma y

se han descrito más de 1.800 miembros. La Yb7 se integró al genoma humano hace 4.81 millones de años, la Yb8 lo hizo hace 2.39 millones de años y la Yb9 hace 2.32 millones de años. El 20% son polimórficas y el 0.5% provienen de otras familias Alu más antiguas (llamadas Sg y Sx) que se encuentran en primates no humanos (37). Otros mecanismos biológicos implicados en la evolución del cromosoma Y se han reportado comparando con la técnica de hibridación "in situ" fluorescencia (FISH) la región AZFa (Yq11.21) en metafase de células humanas y células de los grandes monos (38). Estos estudios reportan deleciones específicas en el humano, otras específicas para el orangután, una específica translocación-transposición en el chimpancé y una inversión específica en el cromosoma Y del gorila. Deleciones específicas y actuales en el humano han sido descritas por Sun (39) y por Sjoerd Repping (40).

ELEMENTOS GENÉTICOS TRANSPONIBLES EN *DROSOPHILA* Y LA EVOLUCIÓN DEL CROMOSOMA "Y"

El 10% del genoma de *Drosophila* está formado por secuencias de ADN repetitivas, llamadas secuencias de inserción, que forman familias y se mueven a través del genoma y pueden producir daño letal al interrumpir genes o pueden producir cambios fenotípicos adaptativos. Han sido factores importantes en los cambios evolutivos de las diferentes especies de moscas (41). Se han caracterizado tres tipos de elementos: 1. Elementos COPIAS, con al menos 7 familias, y son responsables de algunas mutaciones clásicas en la mosca *Drosophila*, como el color del ojo "White-Apricot". 2. Elementos "foldback" (FB), realizan reorganizaciones cromosómicas con una alta frecuencia, por lo tanto, están implicados en mutaciones con escaso tiempo evolutivo. 3. Elementos P, que se hallan en ciertas estirpes, llamadas por este motivo Citotipo P.

Cuando se cruzan moscas de Citotipo P con otras que no lo son, el elemento P ingresa en ese nuevo genoma y se moviliza libremente produciendo daños que alteran la transcripción de los genes. El ADN del elemento P puede ser usado como vehículo para la transferencia de genes a una línea germinal de una mosca receptora, y se propaga en forma desafortunada una vez ingresa en el genoma de las células receptoras.

Los estudios de la inactividad del cromosoma Y en *Drosophila* han demostrado que las inversiones y translocaciones de cromosomas (42,43) han sido importantes en la evolución de las especies *D. Permisilis*, *D. Seudooscura* y *D. Miranda*.

El estudio de las secuencias genómicas de *D. Miranda* sugieren que los cromosomas sexuales que son heteromórficos eran antiguamente homólogos. En alguna generación se produjo una translocación desde un autosoma a uno de ellos, lo cual generó un nuevo cromosoma (neo-Y) y un monosoma X2 (44, 45). Este monosoma era el homólogo del que se asoció al neo-Y. El nuevo cromosoma (neo-Y) resultó ser metacéntrico; el macho quedó con un complemento diploide de 9 cromosomas y la hembra continuó con 10 cromosomas.

Esta translocación ocurrió en épocas geológicas recientes (?) y formó un sistema cromosomal sexual X1, X2 y el Neo-Y. Durante la meiosis del macho, el "Y" y el X2 recombinan entre sí; durante el apareamiento de la meiosis, la relación vitalidad/

mortalidad del cigoto sigue siendo normal por mecanismos de segregación directa no aleatoria que involucra la formación del sexo trivalente (44, 45).

GENES Lcp

Los genes de la cutícula larval (Lcp) se hallan en el cromosoma 2 de *D. Melanogaster* y en el cromosoma 3 de *D. Seudooscuro* y *D. Permisilis*, pero se encuentran en el cromosoma X2 y el "Y" de *D. Miranda* (46). En una región de 9 Kb. del cromosoma 2 de *D. Melanogaster* se han mapeado 5 de estos genes Lcp y se han caracterizado 4 de sus proteínas. Uno de estos genes es un pseudogén por las características de su estructura y por la ausencia de transcripción. Los genes Lcp de *D. Miranda* (45) tienen aproximadamente 7 Kb de secuencia informativa sobre los cromosomas "Y" y X2; la organización de estos genes y la dirección de la transcripción es similar a los de *D. Melanogaster* (D.M.), a pesar de la diferencia de 30 millones de años entre las dos especies. Los genes Lcp se expresan en las células epidérmicas de la tercera larva instar y codifican las proteínas Lcp 1 a 4 de la cutícula larval. Comparando la estructura del ADN de los cromosomas "Y" y X2 de *D. Miranda* se observaron inserciones (ISY), deleciones (DY) y diversos grados de duplicaciones solamente en loci del cromosoma "Y" (45). Las ISY se identificaron como transposones y retrotransposones. También se trabajó con el gen Lcp4 para investigar sobre las consecuencias de inserción de ADN y el proceso de heterocromatización en la regulación y expresión de genes originalmente autosomales y actualmente presentes en un cromosoma "Y" degenerado.

Se realizaron comparaciones de las secuencias de los genes Lcp en X2 y en "Y" (15, 44, 45, 46). En el cromosoma "Y" se encontraron 5 deleciones cortas: DY1 a DY5, 10 inserciones: de ISY1 a ISY10. Estas reorganizaciones génicas no se encontraron en el X2. La DY3 con 221 bp (la más grande) se halló en la región codificante del gen Lcp4. La ISY4 con 3.1 Kb se encontró entre los genes Lcp2 y Lcp3 y la ISY5 con 2.5 Kb se halló entre los genes Lcp3 y Lcp4. Hay además una duplicación del gen Lcp2 asociado a una inserción.

La ISY4 es un retrotransposón llamado TRIM que guarda homología con el factor I de *D. Melanogaster* y con un retrotransposón de tipo repeticiones terminales largas (LTR), que son propias de las secuencias de inserción. La integración de TRIM se asocia con la deleción DY2. La ISY5 es un transposón llamado TRAM que se integra a 437 bp en sentido 5' del sitio de inicio de la transcripción del gen LCP4. TRAM está presente en el progenitor autosomal (monosoma X2), y no ha mostrado homología con transposones conocidos. La ISY1 con 25Bp tiene similitud con una secuencia consenso del intensificador del gen que transcribe un ARN pequeño nuclear (ARNsn U2). La ISY2 con 248Bp tiene homología con ADN repetitivo dispersos en *D. Viriles* y con elementos genéticos móviles del genoma de erizo de mar.

La DY3 en el gen Lcp4 del cromosoma "Y" está flanqueada con las secuencias duplicadas GGAATT, y esto representa una huella genética dejada por un evento de inserción y escisión. Esta deleción se extiende hasta un codón de parada ATC que está a 65 bp antes de la señal de adición del poli A. En la región de regulación del gen se hallan las secuencias consenso CAAT y TATAAT, y esta organización corresponde

a un gen de clase II; por lo tanto, con esta estructura génica debemos obtener un transcrito primario. Análisis de "Northern" del total de los ARN mensajeros (ARNm) derivados de los tegumentos de la tercera larva instar de machos y hembras revela sólo ARNm (del gen Lcp4) provenientes del cromosoma X2. Esto indica que el alelo Lcp4 del cromosoma "Y" no se transcribe y representa una pérdida de función.

CONCLUSIÓN

Lo descrito es un ejemplo de cómo un elemento genético transponible perteneciente a un genoma puede generar cambios evolutivos bruscos, puede reorganizar disposiciones cromosómicas y nuevas formas de expresión fenotípicas, y puede desarrollar nuevas especies (42, 47, 48). Los resultados estructurales en los loci Lcp del "Y" de *Drosophila* sugieren que las fuerzas evolutivas que lo degeneraron son los transposones y retrotransposones (y otros elementos transponibles), pudiendo transformar un cromosoma heterocromático facultativo en heterocromático constitutivo. La no transcripción (45) del loci Lcp4 en el "Y", a pesar de tener la estructuración para hacerlo, podía deberse a un efecto de regulación negativa "cis" por el TRAM, que flanquea la región 5', o por el ISY3, que flanquea la región 3'. La distribución del elemento TRIM y el aumento del número de secuencias idénticas a ISY3 dispersas en el cromosoma "Y", constituyen una importante prueba de la intervención de esos elementos móviles en el proceso biológico natural que destruyó la información genética del cromosoma "Y".

Teóricamente se consideran que los elementos transponibles se acumulan en regiones de baja recombinación (48). Por ejemplo, se han encontrado repeticiones de 1.1 Kb de tipo BamH1 en cromosomas "Y", que son más abundantes en éste que en el X y menos abundantes en otros cromosomas, y son 6 veces más frecuentes en el genoma del macho comparado con el de la hembra. Estas repeticiones de tipo BamH1 también hibridizan con otras secuencias de 0.2 – 1.8 Kb de otras especies, que también son más abundantes en el genoma del macho.

¿Qué son transposones y retrotransposones? La doctora Bárbara McClintock demostró experimentalmente la recombinación meiótica, y al observar patrones de herencia no comunes en el maíz propuso (1940) para su explicación la hipótesis de los genes que cambian de posición en el genoma. En la década de los años 1970 las investigaciones demostraron la transposición de segmentos de ADN y sus implicaciones inmediatas en la inactivación de genes y/o el cambio de funciones. (En 1983 la doctora Bárbara obtuvo el Premio Nobel). En 1970 Howard M. Temin y David Baltimore descubren en virus de ARN la enzima que puede fabricar ADN de cadena doble a partir de un ARN monocatenario y que le permite insertarse en el genoma (29); se le llamó retrotranscriptasa y a los virus se les llamó retrovirus. Este fenómeno biológico no es exclusivo de los retrovirus; actualmente se sabe que hay retrotranscripción en virus de ADN como el de la hepatitis B, en levaduras, insectos y mamíferos no infectados por retrovirus. El análisis genético secuencial del ADN de retrovirus muestra que poseen en sus extremos secuencias idénticas que comprenden cientos de nucleótidos (41); estas regiones constituyen grandes repeticiones terminales ("long terminal repeats" = LTR) que son invertidas si se comparan la región 5' con la región 3'. Los elementos genéticos transponibles tienen secuencias

semejantes a los LTR. Esta semejanza entre retrovirus y elementos genéticos transponibles vislumbró la hipótesis de que la retrotranscripción es el mecanismo por medio del cual los fragmentos génicos cambian de posición, como efectivamente se demostró, de lo cual surgió el concepto de *Retrotransposón*. En muchas especies, incluyendo el hombre (29, 30), se han hallado miles de copias de genes retrovéricos que se llaman "pro virus endógenos"; la mayoría están asociados con la actividad de retrotranscriptasa y una minoría pueden producir partículas víricas infecciosas (¿para algunos casos sería el humano el huésped y vector propagador de enfermedades víricas?). Otro hallazgo relacionado con el mecanismo de la transposición del ADN es el descubrimiento de secuencias de ADN correspondientes a las secuencias exónicas de determinados genes y que poseen un poli A (¿y por qué no un poli T?); estas secuencias corresponden al ARNm de genes localizados en sitios diferentes. A estas secuencias (30) se les ha llamado *retroseudogenes*.

Muchos estudios han demostrado la importancia de la transposición en la especie humana. En 1991 en la Universidad de Michigan se descubrió que una inserción de una secuencia "Alu" produjo una neurofibromatosis en un paciente. En el mismo año, en la Universidad Johns Hopkins se identificó como causa de hemofilia en un niño un elemento genético móvil que alteró el gen normal (30); el elemento era idéntico a una secuencia génica que los padres portaban en sitios diferentes. Parece que un transposón es el causante de la diferencia entre la amilasa salival y la amilasa pancreática. Los investigadores Marilyn A. Houck y Kidwell demostraron que el transposón ELEMENTO P produjo descendencia anormal en cepas de *D. Melanogaster* y fue transmitido por el ácaro *Proctolaelaps regalis*. Se ha demostrado que la actividad de transposición puede realizarse entre especies. El estudio de fósiles ha relacionado los transposones con un patrón de "evolución a saltos" y los investigadores relacionados con el tema admiten que los elementos genéticos móviles producen macromutaciones con cambios fenotípicos repentinos e importantes en menos tiempo que la evolución natural; su objetivo sería *establecer nuevos patrones de desarrollo* (hipótesis de la genética evolutiva). Se considera que retrotransposones, provirus endógenos y otros elementos genéticos móviles representan el 10% del genoma humano (39).

¿Cuál sería el mecanismo biológico por medio del cual las secuencias LINE ejercen su fuerza evolutiva? Como los LINE (L1) son elementos genéticos móviles capaces de inducir daño en el genoma, su transcripción es suprimida en la mayoría de los tejidos para disminuir sus efectos adversos en la línea germinal y somática. Pero ARNm de L1 se detectan en el testículo (49). El estudio de este ARNm ha demostrado que para disminuir su transcripción se le asocia numerosos poli A y posee numerosos sitios de corte y empalme de exones ("splicing") complejo de tipo alternativo (41, 49). Varios de estos diversos ARNm pueden traducirse y varios sufren retrotranscripción (¿retroseudogenes?) en humanos y ratones. Belancio y colaboradores (49) refieren que estos elementos L1 también participan en los eventos de "splicing" de otros genes (¿estos ARN de L1 se comportan como ARN guías?), "pudiendo resultar en la interrupción de la expresión normal de un gen o en la formación de un transcrito de un ARNm alternativo". Uno de los pasos para la maduración del ARNm a partir de un transcrito primario es la llamada "edición" del ARN, que consiste en inserciones y/o deleciones de nucleótidos y en mutaciones puntuales de tipo transición o transversión en el ARNm. Este proceso de mutación es un evento postranscripcional normal

y está orientado por un ARN llamado guía (ARNg), y que además selecciona los intrones que se deben eliminar en los transcritos primarios que realizan "splicing" alternativo (41). ¿Son los transcritos de los elementos L1 una especie de ARNg que al formar diferentes ARNm a partir de un gen, y realizar posterior retrotranscripción (retroseudogenes), va sembrando en el genoma la formación de nuevos genes? ¿Pudieron los elementos LINE o L1 intervenir en el desarrollo del gen TDF o SRY a partir del SOX3, y de éste a partir del SOX9? Posiblemente esta hipótesis explica en parte los conceptos de diversos autores que sugieren que el gen SRY o TDF experimenta una evolución "especial y purificada" (21, 23, 24, 25).

Los estudios moleculares han demostrado que gran parte del cromosoma "Y" humano consiste en largas repeticiones específicas del mismo que se llaman amplicones (50, 51, 52) y recombinaciones homólogas desiguales entre el cromosoma original y su duplicación durante la meiosis, generan deleciones en uno de ellos y amplificaciones en el otro que resultan en fallas de la espermatogénesis (53). Por ejemplo, la región AZFc del cromosoma "Y" está llena de amplicones, por lo tanto es susceptible a mutaciones (54). La región AZF se denomina factor de azoospermia y se divide por sus funciones en las regiones AZFa, b y c, que codifican proteínas implicadas en la espermatogénesis desde la etapa de espermatogonia hasta la de espermatozoide. La mutación tipo deleción llamada b2/b4, que se expande 3.5 Mb y elimina completamente la región AZFc, es la causa genética más común de falla espermatogénica. El análisis de estos amplicones y su posición hacen predecir que más deleciones pueden surgir por el fenómeno biológico de recombinación homóloga y contribuir a mutaciones en la zona AZF (39). Un estudio publicado en *Nature Genetics* de noviembre del 2003 (40) reporta una deleción gr / gr en la zona AZF con una baja penetrancia con respecto a la expresión de falla en la fertilidad, pero que es un factor de riesgo para la esterilidad comprobado en estudio de genealogías humanas, y que además estos estudios demostraron que la deleción ha surgido por lo menos 14 veces en forma independiente en la historia de estas familias, lo que sugiere que esta deleción es una especie de polimorfismo que refleja un balance entre la recombinación homóloga y la selección haploide.

¿Es posible que la evolución del cromosoma "Y" a partir de un cromosoma que fue homólogo de otro (¿un X primitivo? o un neo-Y?) comprobado experimentalmente en especie de *Drosophila* (42) se extrapole a procesos evolutivos de otras especies como la humana? ¿Explicaría esto el gran polimorfismo que tiene el cromosoma "Y" en la especie humana? ¿Explicaría esto la disminución en la cantidad de la producción de espermatozoides que se ha observado en las últimas generaciones? De 50 a 100 millones/ml en 1975 a 20 millones/ml en el 2006. Una publicación en el *Curr Biol* (55) reporta que el cromosoma Y de *Drosophila Seudooscura* no se detiene en su proceso de degeneración y de inactivación de genes, pero sugiere que posiblemente genes autosomales tomen el control de la fertilidad. Mencionemos el caso de las ratas de las especies T.o.o. y T.o., que tanto machos como hembras son XO, con número impar de cromosomas (13, 14), no tienen cromosomas "Y", no recombinan sobre el cromosoma X, y a pesar de tener secuencias LINE no sufren procesos de Inactivación (no necesitan compensación de dosis porque hay un equilibrio en el número de genes entre el macho y la hembra). No tienen el gen SRY, pero poseen unos genes homólogos a los genes Tspy y Zfy del sexo masculino en la región Xq terminal (tanto

el macho como la hembra). Los artículos de estas investigaciones no expresan el mecanismo para desarrollar el sexo masculino. ¿Podría ser un proceso semejante al de la Impronta Genómica? Diversos trabajos reportan (39, 53, 56) el aumento de microdelecciones en la región AZF del cromosoma "Y" humano y el aumento de infertilidad en el sexo masculino. Esto nos hace pensar que el cromosoma "Y" en humanos también está en proceso de involución y degeneración. ¿Qué tan probable sería, entonces, la aseveración que figura en el libro *La maldición de Adán* que plantea la hipótesis de la desaparición del sexo masculino? Mi respuesta es la siguiente: la evolución desarrolló la bisexualidad para el perfeccionamiento de las especies, y la evolución sólo involuciona por factores ambientales muy adversos. El cromosoma, como una estructura visible al microscopio, no es lo más importante; lo primordial y básico es una molécula de ADN funcional y la presencia de los genes determinantes del sexo, no importa que se hallen en el cromosoma "Y", o en un "X" o en cualquier autosoma, lo importante es que existan y que sean regulados adecuadamente para su transcripción e inhibición. En 1997 Zenteno y colaboradores (57) describieron dos hermanos mexicanos de 28 y 26 años, machos XX sin genitales ambiguos, que no tienen secuencias del cromosoma "Y", incluyendo al SRY. Esto sugiere que otros genes (58, 59) implicados en la cascada que determinan el sexo (DAX1 o DSS, SOX9, SF1, WT1, GATA4, etc) inducen la diferenciación gonadal y fenotípica de un varón normal en ausencia del cromosoma "Y" y del gen SRY.

Referencias

1. Abbas N, Bishop C and Fellous W. El determinismo genético del sexo. *Revista Mundo científico*, 1992; 96 (9): 1.085-1.093.
2. Goodfellow PN, Andrews PW. Is there a Human T/T. *Nature* 1983; 302: 657-8.
4. Comment in: *Nature*, 2005 Mar. 17; 434(7031):279-80. The DNA sequence of the human X chromosome.
5. Langanney A, Pellegrini B y Potoni E. El hombre descende del sexo. *Revista Mundo Científico*. 1992; 96 (9): 1052-1062.
6. Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D et al. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum. Genet*, 1986; 38:109-24.
7. López-López M, Zenteno JC, Mendez JP, Kofman-Alfaro S. Genetic heterogeneity and phenotypic variability in 46, xy sex reversal. *Rev Invest Clin*. 1998. Mar-Apr: 50(2):171-6.
8. Graves JA, Koina E., Sankovic N. How the gene content of human sex chromosome evolved. *Curr Opin Gene Dev*. 2006; 16(3): 219-24.
9. Steinemann M, Steinemann S and Lottsspeich F. How Y chromosome become genetically inert. *PNAS. USA*. 1993; 90: 5.737-5.741.
10. Marchant-Larios H., Moreno-Mendoza N. Onset of sex differentiation: dialog between genes and cells. *Arch Med. Res* 2001 Nov-Dec; 32(6): 553-8.
11. Erisckson JW and Cline TW. Molecular nature of the *Drosophila* sex determination signal and its link to neurogenesis. *Science*, 1991; 251: 1071-1074.
12. Charlesworth B. The evolution of sex chromosome. *Science*, 1991; 251: 1030-1033.
13. Sutou S., Mitsui Y., Sex determination without the Y chromosome in two Japanese rodents *Tokudaia Osimensis Osimensis* and *Tokudaia Osimensis* spp. *Mamm Genome* 2001; 12(1): 17-21.
14. Arakawa Y., Nishida-Umehara C., X-chromosomal localization of mammalian Y-linked genes in two XO species of the Ryukuyu spiny rat. *Cytogenet Genome Res*. 2002; 99(1-4): 303-9.

15. Arakawa Y., Nishida-Umehara C., A BamHI repeat elements is predominant associated with the degenerating neo-Y chromosome of *D. Miranda* but absent in the *D. Melanogaster* genome. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 89: 1340-1344.
16. Ardhendu S. Mukherjee, W. Beermann. Synthesis of Ribonucleic Acid by the X-Chromosome of *Drosophila melanogaster* and the problem of dosage compensation. *Nature*. 1965 207:785-786.
17. Bailey JA, Carrell L, Chakravarti A, Eichler EE. Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation the Lyon hypothesis. *Proct Natl Acad Sci USA*. 2000 6;97 (12): 6634-9.
18. Scott & Col. X-accumulation of LINE-1 retrotransposons in *Tokudaia Osimensis* a spiny rat with the Karyotype XO. *Cytogene Genome Res* 2006: 112 (3-4):261-9.
19. Muller. *Am. Nat.* 1932 66: 118-138.
20. Toure YT. Identification of novel Y chromosome encoded transcripts by testis transcriptome analysis of mice deletions of the Y chromosome long arm. *Genome Biol.* 2005; 6(12):102.
21. Delbridge ML, Graves, JA. Mammalian Y chromosome evolution male sperme functions of Y chromosome-borne genes. *Rev Reprod.* 1999 4(2):101-9.
22. Callinan PA & Col. Comprehensive analysis of Alu associated diversity on the human sex chromosome. *Gene* 2003 317(1-2): 103-10.
23. Kim HS., Takenaka O. A comparison of TSPY genes from Y-chromosomal DNA of the great apes and humans: sequence, evolution and phylogeny. *Am J. Phys Anthropol*, 1996 100(3): 301-9.
24. Wimmer R & Col. The evolution of the azoospermia factor region AZFa in higher primates. *Cytogenet Genomes Res.* 2005; 108 (1-3): 211-6.
25. Hughes JF. Conservation of Y-linked genes during human evolution revealed by comparative sequencing in chimpanzes. *Nature*, 2005 437(7055): 100-3.
26. Graves JA. Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J Exp Zool.* 1998 281(5): 472-81.
27. Koopman P. Sry and SOX9 mammalian testis determining genes. *Cell Mol Life Sci.* 1999 55(6-7): 839-56.
28. Koopman P., Bullejos M., Bowles J. Regulation of male sexual development by Sry and SOX9. *J Exp Zool.* 2001 290(5): 463-74.
29. Varmus H. retrotranscripción. *Revista Investigación y Ciencias.* Marzo, 1992.
30. Rennie J. Los nuevos giros del ADN, *Revista Investigación y ciencias.* Mayo 1.993.
31. Kondo M. & Col. Genomic organization of the sex determining and a adjacent regions of the sex chromosome of medaka. *Genome Res.* 2006 16(7): 815-26.
32. Salem HA & Col. Recently integrated Alu elements and human genomic diversity. *Mol Biol Evol*, 2003 20(8):1349-61.
33. Kuroki Y & Col. Comparative analysis of chimpanzee and human Y chromosomes unveils complex evolutionary pathway. *Nat Genet*, 2006 38(2): 158-67.
34. Archidiacono N, Clelia T Storlazzi, Cosma Spalluto, Rico A, Masarella R, Rochi . Evolution of chromosome Y in primates. *Chromosoma* 1998 107(4):241-6
35. Carroll ML, Roy-Engel AM, Nguyen Son V, Salem A, Vogel E. et al. Large -scale analysis of the Alu Ya5 and Yb8 subfamilies and their contribution to human genomic diversity. *J. Mol Biol.* 2001 311(1):17-40
36. Rasheed BK & Col. A Y-chromosomal DNA fragments conserved in human and chimpanzee. *Mol Biol Evol*, 1991 8(4): 416-32.
37. Carter A B, Salen A-H, Hedges D, Nguyen C, Kimball B et al. Genome wide analysis of the human Alu Yb lineage. *Hum Genomics* 2004 (3):167-78.
38. Wimmer & Col. Evolutionary breakpoints analysis on Y chromosome of higher primates provides insight into human Y evolution. *Cytogenet Genome Res.* 2005; 108(1-3): 204-10.
39. Sun, C. et al. Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 provirus *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 2291-2296.

40. Rapping, S, Skaletsky H, Brown L, Van Daalen S, Korver C, Pyntikova T et al. Polymorphism for a 1.6 Mb deletion of the human Y chromosome persist through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nature Genetics* 2003; 35(3).
41. Cox T, Sinclair J(1998). *Biología Molecular en Medicina*. Editorial Médica Panamericana. Textos básicos de Genética Molecular: Griffiths-Suzuki, Klug-Cummings, Genes VII.
42. Steinemann M, Steinemann S. Enigma of Y-chromosome degeneration: Neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila* Miranda a model for sex chromosome evolution. *Genética* 1988; 102: 409-20
43. Carvalho AB, & Col. Y chromosome of *D. pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. *Science* 2005 307(5706): 108-10.
44. Steinemann M. Telomere repeats within the neo-Y chromosome of *drosophila* Miranda. *Chromosoma* (Berl). 1984; 90: 1-5.
45. Steinemann M and Steinemann S. Degenerating Y chromosome of *Drosophila* Miranda a trap for retrotransposones *PNAS. USA*. 1992 89: 7591-7595.
46. Snyder M, Hunkapiller, Yuen D, Silvert D. et al. Cuticle protein genes of *Drosophila*: structure, organization and evolution of four clustered genes. *Cell*, 1982, July; 29: 1027-1040.
47. Steinemann S, Steinemann M. Biased distribution of repetitive elements a landmark for neo-Y chromosome evolution in *Drosophila* Miranda. *Cytogenet Cell Genet*, 2001; 93(3-4): 228-33.
48. Mc Allister BF., Charlesworth B., Reduced sequence variability on the Neo-Y Chromosome of *Drosophila Americana Americana*. *Genetics* 1999, Sept.; 153 (1): 222-33.
49. Belancio V, Hedges D, Deininger P. LINE 1 RNA splicing and influences on mammalian genes expression. *Nucleic Acids Res*. 2006 34(5): 1512-21.
50. Kamps C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K. & Vogt. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum. Mol. Genet*, 2000; 9: 2563-2572.
51. Kuroda-Kawaguchi. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men *Nat. Genet*. 2001; 29: 279-286.
52. Skaletsky, H, Kuroda-Kawaguchi T, Minz P, Cordum H, Hillier L et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes *Nature*, 2003; 423: 825-837.
53. Yen P. The fragility of fertility. *Nat. Genet*. 2001; 243-244.
54. Jobling MA, Samara V, Padya A, Fretwell N, Bernasconi B et al. Recurrent duplication and deletion polymorphism on the long arm of the Y chromosome in normal males. *Hum. Mol. Genet*. 1996; 5: 1767-1775.
55. Charlesworth D, Charlesworth B, Sex chromosomes: evolution of the weird and wonderful. *Curr Biol*. 2005 15(4): 129-31.
56. Blanco P, Shlumukova, M, Sargent C, Jobling A. et al. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome : male infertility and recurrent polymorphism. *J. Med Genet* 2000; 37: 752-758.
57. Zenteno JC, López M. Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Hum Mol*, 1997 100(5-6): 606-10.
58. Nakagome Y, Naka Hori Y. Human Y chromosome in reproduction and development. *Nippon Rinsho* 1993 51(12): 3301-7.
59. López-López M, Zenteno JC, Mendez JP, Kofman-Alfaro S. Genetic heterogeneity and phenotypic variability in 46, xy sex reversal. *Rev Invest Clin*. 1998 50(2):171-6.
60. Parker KL, Schimmer BP. Genes essential for early events in gonadal development. *Ann Med* 2002; 34(3): 171-8.