

11253



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

HOSPITAL "DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA"
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

"FRECUENCIA DE PRESENTACION DE
SECUENCIAS DEL CROMOSOMA Y MEDIANTE PCR
EN PACIENTES PEDIATRICAS CON SINDROME DE
TURNER"

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO ESPECIALISTA EN
ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA

PRESENTA:
DRA. LORENA LIZARRAGA PAULIN

ASESOR DE TESIS:
DR. HECTOR MANUEL CARDENAS TIRADO



IMSS

MEXICO, D. F.

MAYO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Matamoros

DR. JOSE LUIS MATAMOROS TAPIA

JEFE DE LA DIVISION DE EDUCACION E INVESTIGACION MEDICA DEL
HOSPITAL "DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA" DEL
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

Cardenas

DR. HECTOR MANUEL CARDENAS TIRADO

INVESTIGADOR PRINCIPAL

JEFE DEL SERVICIO DE ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO DE
ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA
HOSPITAL "DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA" DEL
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

HOSPITAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA
C.M.N. LA RAZA
SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

Montero

DRA. PATRICIA MONTERO GONZALEZ

INVESTIGADOR ASOCIADO
ENDOCRINOLOGA PERDIATRA

PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO UNIVERSITARIO DE
ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA
HOSPITAL "DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA" DEL
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

HOSPITAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA
C.M.N. LA RAZA
SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.

DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCIA

INVESTIGADOR ASOCIADO

MEDICO GENETISTA DEL HOSPITAL GENERAL
DE MÉXICO, SSA

AGRADECIMIENTOS

*A DIOS, POR GUIAR MIS PASOS POR EL
CAMINO QUE ME HA LLEVADO A LA
FELICIDAD Y SATISFACCIÓN DE MI EXISTIR*

*A MIS PADRES; POR SU AMOR, EJEMPLO Y
APOYO EN TODOS LOS PROYECTOS Y DECISIONES
DE MI VIDA, SIN LOS CUALES JAMÁS HABRÍA
ALCANZADO TANTAS METAS*

*A ELSA Y EVA GUADALUPE, QUE ADEMÁS
DE SER EXCELENTES HERMANAS, SON MIS
AMIGAS, MIS COMPLICES Y MI APOYO INCONDICIONAL*

*A EDGAR, POR EL AMOR Y EL RESPETO
CON LOS CUALES HEMOS CONSTRUIDO UN
PRESENTE Y UN FUTURO, SIEMPRE JUNTOS*

*A LUIS DAVID, PORQUE DESDE TU LLEGADA
LE DISTE UN NUEVO SENTIDO A MI VIDA; LA FUERZA
NECESARIA PARA VENCER CUALQUIER OBSTÁCULO*

*A MIS PROFESORES, POR SUS ENSEÑANZAS,
AFECTO Y CONFIANZA; PERO SOBRE TODO, POR
LA SINCERA AMISTAD QUE ME HAN BRINDADO*

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIAL Y METODOS	6
RESULTADOS	8
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	24

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El síndrome de Turner puede definirse como aquella entidad en la que existe una asociación de estigmas físicos característicos (la talla baja y el retardo puberal son los datos más constantes) y la ausencia completa o parcial de un segundo cromosoma sexual, con o sin una línea celular de mosaicismo. En el pasado, cuando sólo se disponía de estudio citogenético era frecuente encontrar cariotipos 45,XO puros hasta en un 60% de las pacientes; sin embargo, con el advenimiento de diferentes técnicas moleculares, la detección de mosaicismos se ha incrementado hasta en un 66.7%. Dentro de este grupo, la detección de fragmentos del cromosoma Y se ha reportado desde un 0% hasta un 61% en diferentes estudios. La importancia de detectar la presencia de este material, radica en que puede predisponer a la formación de un tumor de origen germinal en las gónadas disgenéticas de estas pacientes, con un riesgo de hasta un 30%.

OBJETIVO: El objetivo de este estudio es identificar la presencia de secuencias de Y en pacientes pediátricas con síndrome de Turner quienes ya reciben o podrían recibir tratamiento con hormona de crecimiento biosintética, la cual podría acelerar el desarrollo de un tumor de origen germinal.

MATERIAL Y METODOS: Se estudiaron 21 pacientes, de 3 a 16 años de edad; 15 recibían hormona de crecimiento y 6 no; todas ellas con diagnóstico citogenético de síndrome de Turner en el cual no había evidencia de material de Y. Se les realizó exploración física completa y toma de una muestra de sangre periférica para la extracción de DNA, posterior a lo cual se procedió a la amplificación mediante PCR de 5 secuencias representativas de diferentes regiones de Y (PABY, SRY, Amely, Yqh y Ycen), y la región centromérica de X (Xcen).

RESULTADOS: El 100% de las pacientes presentó talla baja; y en el 100% de las pacientes en edad puberal, hubo retardo en la aparición de la pubertad. Hubo algunas diferencias en relación a la frecuencia de presentación de varios estigmas físicos con relación a lo reportado en la literatura. En ninguna de las pacientes estudiadas se detectó alguna de las secuencias de Y mencionadas y, como era de esperarse, sólo se detectó Xcen; lo mismo ocurrió con los controles femeninos. En los controles masculinos estuvieron presentes las 6 secuencias. Por lo tanto, la frecuencia de presentación de secuencias de material de Y en nuestra población fue de 0% (frecuencia reportada previamente en otro estudio); y por ende, no hubo necesidad de plantear la realización de gonadectomía.

CONCLUSIONES: Las técnicas de estudio molecular tienen una alta sensibilidad, además de ser rápidas y permitir el análisis simultáneo de varias muestras. En el síndrome de Turner incrementan la posibilidad de identificar material cromosómico de Y, cuya presencia en estas pacientes puede predisponer al desarrollo de tumores germinales (gonadoblastoma) en sus gónadas disgenéticas. Dado que estas niñas podrán recibir tratamiento con hormona de crecimiento para el manejo de su talla baja, el riesgo de crecimiento de un gonadoblastoma podría ser aún mayor.

PALABRAS CLAVE: Síndrome de Turner, material cromosómico de Y, Reacción en Cadena de la Polimerasa, gonadoblastoma.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Turner (o síndrome de Ullrich Turner) puede definirse como la combinación de rasgos físicos característicos y la ausencia completa o parcial del segundo cromosoma sexual, con o sin una línea celular de mosaicismo ⁽¹⁾.

Se ha reportado una frecuencia de presentación de esta entidad de 1:2000 a 1:2500 nacimientos vivos con fenotipo femenino y se considera que aproximadamente 99% de los productos concebidos son abortados espontáneamente ⁽²⁾.

Siempre se debe sospechar el diagnóstico de síndrome de Turner en cualquier paciente con fenotipo femenino, inadecuada velocidad de crecimiento y retardo puberal. Por otra parte, deben también tomarse en cuenta las siguientes hallazgos clínicos: en la etapa neonatal y lactantes, linfedema de manos y pies (25%), piel redundante en la región posterior del cuello (40%), cuello corto y ancho (pterigium colli) (50%); anomalías cardíacas tales como coartación aórtica (10%), aorta bivalva (30%), dilatación de la aorta (10%) o corazón izquierdo hipoplásico; implantación baja de cabello (80%), implantación baja de pabellones auriculares, malformaciones auriculares (90%), micrognatía (70%) y teletelia (75%); en la etapa escolar hay talla baja con desaceleración de la velocidad de crecimiento, y niveles elevados de FSH, así como otros datos tales como cubitus valgus (50%), hipoplasia ungueal (70%), nevos pigmentados múltiples (50%), acortamiento de metacarpianos (50%), paladar alto (70%); en la etapa de adolescencia cuando existe falta total del 2° cromosoma hay ausencia de desarrollo mamario a los 13 años de edad cronológica, amenorrea primaria o secundaria, con niveles elevados de LH y FSH y talla baja. Cuando la ausencia es parcial, puede haber desarrollo de la pubertad acompañado de talla baja. En estas mujeres debe entonces realizarse obligadamente un cariotipo, así como estudios para descartar malformaciones renales (45%; tales como: riñón en herradura (10%), aplasia renal unilateral (20%), duplicación de ureteros (29%) y malrotación

renal (15%); hipertensión (25%), tiroiditis de Hashimoto (35%), pérdida de la audición conductiva y neurosensorial (50%), trastornos del lenguaje; estrabismo, ambliopía y ptosis palpebral (50%); así como alteraciones ortopédicas (genu valgo, displasia de cadera, escoliosis). Puede asociarse también diabetes (40%), vitiligo (2%), déficit cognitivo (70%) y personalidad inmadura (50%).^(3,4)

Dado que el pronóstico de cada uno de los mosaicismos es diferente, la identificación de bajos niveles del mismo, particularmente el mosaicismo que involucra material cromosómico de Y, es crítico para proporcionar una información precisa a la familia durante el consejo prenatal y el manejo postnatal.⁽⁵⁾

Varios estudios realizados previamente habían demostrado que un 40% - 60% de pacientes con síndrome de Ullrich-Turner eran monosómicos para el cromosoma X en los linfocitos de sangre periférica, mientras que las pacientes restantes tenían cromosomas X o Y estructuralmente anormales o eran mosaicos con una segunda línea celular que contenía un cromosoma sexual normal o anormal.⁽⁶⁾

En diferentes estudios se ha buscado identificar los diferentes cariotipos que pueden tener estas niñas, así como la frecuencia de los mismos, encontrando resultados variables con cariotipos 45,XO puros desde 9%⁽⁷⁾ hasta 85%⁽⁸⁾. Al mejorar las técnicas de estudio molecular y citogenético, se ha informado una mayor frecuencia de mosaicismo (66.7%) debido sobre todo a la identificación de cromosomas marcadores (18.4%)⁽⁹⁾, los cuales pueden contener fragmentos del cromosoma Y. Cabe señalar que la frecuencia de presentación de material cromosómico de Y en diversos estudios es muy variable, con reportes que van desde el 0% hasta el 61%.

La importancia de identificar mosaicismos de Y en niñas con síndrome de Turner radica en identificar el riesgo de la formación de un tumor germinal en las gónadas disgenéticas reportándose frecuencias de hasta 20-30%⁽¹⁰⁾, aunque hay

otros estudios que reportan 0%.⁽¹¹⁾ El tumor más comúnmente observado es el gonadoblastoma. Se ha postulado la existencia de un gen localizado en el cromosoma Y, el cual en el contexto de una gónada disgenética actúa como oncogene.⁽¹²⁾

Existe un estudio realizado en población mexicana, el cual incluyó 50 pacientes con síndrome de Turner pediátricas y adultas, el cual reporta que tras la aplicación de técnicas moleculares, se detectó en el 12% de los casos presencia de material cromosómico de Y; y en una de estas pacientes logró identificarse la presencia de gonadoblastoma.⁽¹³⁾

Las técnicas de análisis molecular han demostrado ser pruebas complementarias útiles dentro del abordaje genético en varias patologías incluyendo el síndrome de Turner. Las ventajas de estos métodos en relación al análisis citogenético (cariotipo), es que son rápidos, y varias muestras pueden ser analizadas en paralelo, por lo que pueden aplicarse en el estudio de grandes números de pacientes y amplias series de células, lo que permite obtener una mayor sensibilidad para el reconocimiento de mosaicismos. Por estas razones el análisis molecular es un método más sensible y más preciso para evaluar el mosaicismo de Y en pacientes con síndrome de Turner con o sin riesgo *a priori* (presencia de cromosoma Y identificable citogenéticamente) de desarrollar gonadoblastoma o virilización neonatal o postpuberal.⁽²⁰⁾ Dentro de estas técnicas, tenemos la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la Hibridización por Fluorescencia *In Situ* (FISH).⁽¹⁴⁾

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica que permite la síntesis repetitiva bidireccional de DNA mediante la extensión de un primer de una región de ácido nucleico. La amplificación mediante PCR ha encontrado una extensa aplicación en el diagnóstico de enfermedades genéticas, en la detección de secuencias de ácidos nucleicos de organismos patógenos en muestras clínicas, la identificación genética de muestras forenses (un cabello, un

espermatozoide) y el análisis de mutaciones en oncogenes. Recientemente ha tendido a aplicarse en proyectos que requieren clonación molecular. La PCR consiste en la amplificación de un fragmento de DNA de interés, mediante la utilización de una enzima de restricción (Taq DNA polimerasa) y recurriendo a cambios rápidos de temperatura para obtener los productos deseados.⁽¹⁵⁾

A pesar de las facilidades técnicas y de la gran sensibilidad de este método, en nuestro centro hospitalario, que es una unidad de tercer nivel, no contamos con los insumos para llevarlo a cabo. Por otra parte, la población de pacientes con síndrome de Turner es muy grande en relación con otros hospitales y, tomando en cuenta que las pacientes pediátricas pueden ser candidatas a recibir manejo con hormona de crecimiento biosintética para mejorar su talla final, podría existir un riesgo de acelerar el desarrollo de gonadoblastoma en aquellas niñas en las que exista algún fragmento del cromosoma y, dados los efectos de esta hormona en relación al crecimiento tisular en general.

Por estas razones, nosotros utilizamos la PCR para identificar material cromosómico de Y en pacientes con síndrome de Turner sin evidencia citogenética del mismo y así establecer la frecuencia de mosaicismos; comparar los datos con los estudios previos y enfatizar la importancia de la inclusión de estos auxiliares de diagnóstico en nuestro hospital.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 21 pacientes con diagnóstico de síndrome de Turner (de 3 a 16 años de edad) provenientes de la zona norte del Distrito Federal y entidades circunvecinas; todas ellas con talla baja, diferentes estigmas físicos característicos de la patología, y quienes contaban ya con diagnóstico citogenético (cariotipo) previo, en el cual no había evidencia de material cromosómico de Y.

A cada una de las pacientes se les extrajo 5 ml de sangre periférica mediante la punción de una vena superficial, y se depositaron en un tubo de ensayo con K2 EDTA al vacío.

Se obtuvieron 2 alícuotas de cada muestra (2 ml y 3 ml respectivamente) y se extrajo el DNA de cada una de ellas mediante el método básico de sales (Miller, 1988)⁽¹⁶⁾, preservándose a 4° C. El mismo proceso se llevó a cabo con las muestras de los controles normales masculino y femenino.

Posteriormente se procedió a la preparación de las reacciones para la PCR, para lo cual se realizaron 5 grupos con las muestras con el fin de facilitar y agilizar el procesamiento de las mismas; en cada grupo se incluyó un control masculino y un control femenino. Se utilizaron 6 sets de primers diferentes para la amplificación de un número equivalente de secuencias específicas. PABY 1 y PABY 2 amplificaron un locus en la región pseudoautosómica telocentromérica de 946 bp; XES 10 y XES 11, la región determinante del sexo de 609 bp; amely 1 y amely 2 amplificaron una secuencia en la región pericentromérica de 367 bp; Y1.1 y Y1.2 un fragmento de 154 bp localizado en la región heterocromática (telocentromérica) del brazo largo; y finalmente Y1 y Y2 una región de 170 bp correspondiente al centrómero de Y. Se incluyeron además los primers X1 y X2 para identificar una secuencia de 170 bp correspondiente al centrómero de X, y que fue utilizada como un control interno para cada paciente, así como para los

controles masculino y femenino. Cada una de las secuencias fue amplificada de acuerdo a los protocolos establecidos para cada set de primers.

Se empleó la enzima polimerasa (Platinum Taq DNA Polymerase; Cat. No. 10966-010, Lot. No. RBDB1a, Invitrogen life technologies; incluyendo buffer 10X para PCR sin Mg y cloruro de Mg 50 mM) y dNTP premezclados (10mM dNTP mix Cat. No. 10380-012; Lot. No. 1075252; Invitrogen life technologies) y los oligonucleótidos correspondientes a cada una de las secuencias (PABY1, PABY 2; SRY 1, SRY 2; amely 1, amely 2; Y1.1, Y1.2; Y-1, Y-2; X-1, X-2). La amplificación de estas secuencias se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2400, Applied Biosystems.

Posterior a la amplificación mediante PCR, los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% con un marcador de peso molecular (Ready-Load 100bp DNA Ladder conc. 0.1µg/ml, Cat. No. 10380-012). En todos los procesos se incluyeron los controles masculino y femenino.

La lectura del gel se llevó a cabo mediante una lámpara de luz ultravioleta (Electronic Dual Light Transilluminator Ultra Lum Pat. 5434478). Se tomaron fotografías de los resultados obtenidos en cada paciente.

En aquellos casos en los que hubo contaminación o pérdida de las reacciones durante el termociclado, se repitió el proceso de preparación de las mismas, así como la lectura en gel, con el fin de evitar errores en la interpretación de los resultados (falsos positivos o negativos).

Los resultados se expresaron como frecuencia simple y mediante estadística descriptiva.

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 21 pacientes del servicio de Endocrinología Pediátrica del Hospital General de Centro Médico "La Raza" con diagnóstico de síndrome de Turner, el cual fue sugerido inicialmente por los estigmas clínicos que presentaban las pacientes y confirmado posteriormente mediante estudio citogenético (cariotipo) en el departamento de Genética del mismo hospital, con edades de 3 años 10 meses a 16 años (promedio 9 años 9 meses). Quince pacientes recibían ya tratamiento con hormona de crecimiento biosintética, con una duración del tratamiento variable (desde 6 meses hasta 4 años).

Los cariotipos iniciales de cada una de las pacientes y la frecuencia de los mismos, se muestran en el cuadro 1. Como se observa, en el mayor porcentaje de pacientes (71.4%) se reportó 45,XO, mientras que los diferentes mosaicos ocuparon un 28.6%. No se detectaron cromosomas marcadores.

CARIOTIPO	No. PACIENTES	%
45,XO	15	71.4
46,XiXq	1	4.77
46,Xi/45,XO	1	4.77
45,XO/47XXX	1	4.77
46,(isoXq)	1	4.77
46,X1Xq/45,XO	1	4.77
46,XX(r)/45,XO	1	4.77
Total	21	100

Cuadro 1. *Cariotipos iniciales de las pacientes incluidas en el estudio*

Previa a la realización de la toma de muestras para el estudio molecular, se practicó una exploración física minuciosa a todas las pacientes, registrando los estigmas físicos que en cada una de ellas estuvieron presentes para la sospecha clínica de síndrome de Turner, procediendo posteriormente a registrar la frecuencia de cada uno de ellos para compararla con la frecuencia reportada en la literatura, con el único fin de detectar las características más comunes en nuestra población de pacientes con esta patología. En el cuadro 2, se enlistan las características de las pacientes y la frecuencia de presentación de cada una de ellas.

Como era de esperarse, se detectó talla baja en el 100% de las niñas; sin embargo, en lo que respecta a la falla gonadal, no ocupó un porcentaje tan alto debido a que el 76% de las pacientes estudiadas eran prepúberes, por lo que aún no se había evidenciado retardo en la pubertad. De las 5 niñas en edad puberal, sólo una presentó brote espontáneo; pero no tuvo una adecuada progresión de la pubertad, por lo que requirió manejo sustitutivo con estrógenos y posteriormente con progestágenos, al igual que las 4 niñas que mostraron retardo en la aparición de caracteres sexuales secundarios.

De las pacientes que presentaron alteraciones cardiovasculares, 4 de ellas eran portadoras de coartación aórtica (CoAo); una más de CoAo asociada a comunicación interventricular; y la otra paciente tenía sólo una comunicación interventricular.

En lo que respecta a las tres pacientes con alteraciones renales, dos de ellas habían padecido infecciones de vías urinarias de repetición, con mínima alteración funcional renal, y la otra era portadora de un doble sistema pielocalicial.

En cuanto a las alteraciones gastrointestinales, una paciente padecía constipación crónica, mientras que otra era portadora de una malformación vascular en colon.

PARÁMETROS A EVALUAR	No. DE PACIENTES	%.
Talla baja	21	100
Cuello corto	21	100
Teletelia/hipoplasia	21	100
Cuello alado	20	95.2
Implantación baja de cabello	19	90.4
Cubitus valgus	19	90.4
Acortamiento de metacarpianos	20	90.4
Nevos pigmentados	18	85.7
Micrognatia	17	80.9
Genu valgo	17	80.9
Implantación baja de orejas	15	71.4
Paladar ojival	13	61.9
Deformidad de pabellones auriculares	11	53.3
Escoliosis	6	47.6
Displasia de uñas	9	42.8
Hipotiroidismo	7	33.3
Ptosis	7	33.3
Alteraciones cardiovasculares	6	28.5
Tiroiditis	5	23.8
Linfedema de manos y pies	4	19
Estrabismo	4	19
Dermatoglifos	4	19
Alteraciones renales	3	14.2
Defectos auditivos	3	14.2
Alteraciones gastrointestinales	2	9.5
Alopecia	1	4.7
Vitiligo	1	4.7
Intolerancia a carbohidratos	0	0

Cuadro 2. Frecuencia de características fenotípicas detectadas en las pacientes estudiadas

En tres pacientes se encontró defecto auditivo, el cual consistió en hipoacusia. Todas las pacientes que cursaban con tiroiditis y/o hipotiroidismo, recibían manejo con levotiroxina sódica.

Una vez que se realizó la toma de muestras de sangre, se extrajo el DNA de cada una de ellas y se sometió a la amplificación mediante PCR para las secuencias mencionadas previamente en la descripción del estudio (PABY, SRY, Amely, Yqh, Ycen, Xcen), realizándose el procedimiento simultáneamente con controles masculino y femenino. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (figura 1). Como era de esperarse, en los controles masculinos estuvieron presentes las 5 secuencias de Y estudiadas además de Xcen (figura 2). En cambio, en los controles femeninos sólo estuvo presente Xcen, y ninguna de las demás secuencias (figura 3).

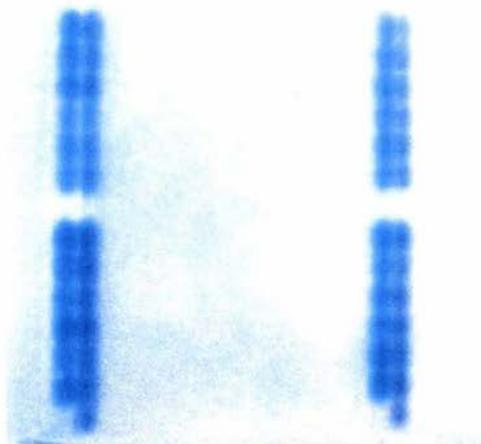


Figura 1. *Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR para 5 secuencias de Y y una de X, en 2 pacientes y 2 controles*

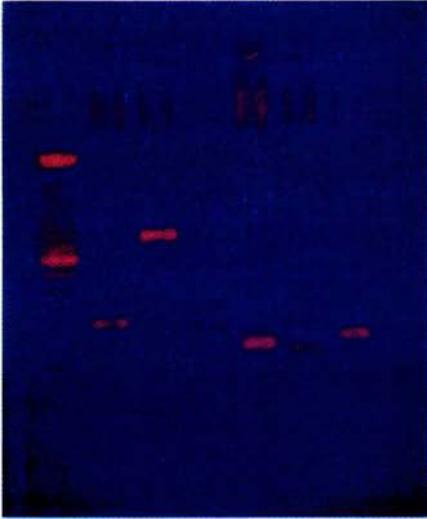


Figura 2. Control masculino. Tras la visualización mediante luz UV se pueden observar de izquierda a derecha: en la 1ª columna, las bandas correspondientes al marcador de peso molecular (ladder) empleado. De la columna 2 a la columna 7, se observan bandas de diferentes pesos moleculares, que corresponden a las secuencias PABY, SRY, Amely, Yqh, Ycen y Xcen, respectivamente; esto es, todas las secuencias de Y estudiadas y la correspondiente al centrómero de X.

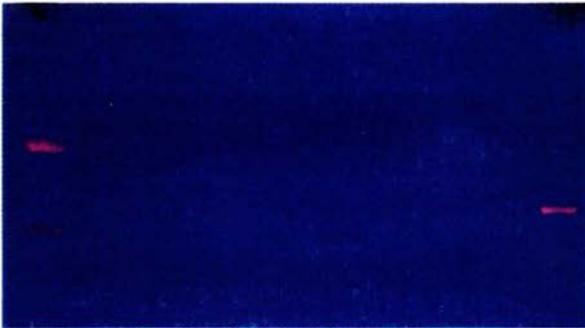


Figura 3. Control femenino. En la primera columna se observa el marcador de peso molecular; en las siguientes 5 no hay imagen alguna. En la última columna se observa una banda correspondiente a Xcen. Como se esperaba, no se detectó secuencia alguna de Y.

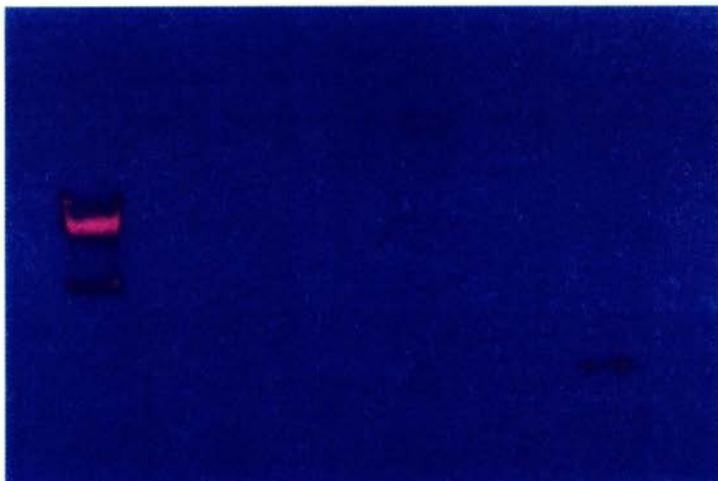


Figura 4. Esta es la imagen que en general se observó en las reacciones de PCR de las 21 pacientes estudiadas, en donde sólo se logra observar una banda cuyo peso molecular corresponde a Xcen (última columna). Prácticamente es igual a la imagen observada en la figura 3 (control femenino).

Como se indicó en la descripción del estudio, para el análisis de las muestras se realizaron 5 grupos; cuando se analizaron los productos de la reacción del grupo 4 tras la electroforesis de los mismos, se observaron algunas bandas que, si bien no correspondían al peso molecular de las secuencias estudiadas (aproximadamente 500 bp), sí llamaba la atención su presencia. Cuando se reprodujo nuevamente el procedimiento con nuevos sets de primers para cada una de las secuencias, no se identificó banda alguna en ellas (sólo Xcen). Se logró detectar contaminación de los oligonucleótidos que habían sido utilizados durante el primer proceso, por lo que fueron desechados para evitar errores en la interpretación de los resultados del último grupo de muestras.

Así, la frecuencia de secuencias de Y en la población de pacientes con síndrome de Turner incluida en este estudio, fue del 0%, considerando a las pacientes tratadas con hormona de crecimiento y a las que no la recibían (figura 4). En ninguna paciente hubo necesidad de proponer la realización de gonadectomía.

DISCUSION

Como se ha citado ya, el síndrome de Turner es una entidad compleja que resulta de la ausencia total o parcial de un segundo cromosoma sexual; clínicamente se caracteriza por fenotipo femenino, talla baja, disgenesia gonadal, infertilidad, y una constelación variable de anomalías físicas conocidas como estigmas somáticos del síndrome ^(1,4). Se ha logrado establecer una frecuencia promedio de cada una de las características del síndrome de Turner con base en los hallazgos de los diferentes estudios realizados.

En nuestro estudio, se detectó una frecuencia de estigmas clínicos muy similar a la reportada en la literatura ^(1,2,4); y en esta ocasión la talla baja no fue la excepción en relación a que fue la característica presente en el 100% de las pacientes. Existieron algunas diferencias en relación a la presencia de algunos datos tales como el cuello corto, que en nuestro estudio se encontró en el 100% de las pacientes, a diferencia del 50% descrito; la teletelia se encontró también en el 100%, mientras que el reporte es 75%. El acortamiento de metacarpianos fue detectado en el 90%, contra un 50% reportado. Por el contrario, se describe una frecuencia de alteraciones renales del 45%, mientras que en este estudio se detectó sólo un 14.2%. Es importante señalar que, en relación al linfedema congénito pudimos percatarnos que los padres no recordaban con precisión si habían observado esta característica en sus hijas en la etapa neonatal, por lo que la frecuencia del 19% encontrada en nuestro estudio puede ser inferior a la real. Por otra parte, las 5 pacientes mayores de 12 años que fueron incluidas en el estudio presentaron datos de falla gonadal, ya que 4 de ellas tuvieron ausencia total de brote puberal, mientras que otra paciente presentó telarca, la cual se mantuvo en Tanner II sin evolucionar al siguiente estadio; todas ellas requirieron manejo sustitutivo con estrógenos, y en aquellas en las que se había logrado una adecuada evolución de los caracteres sexuales secundarios, se agregó

progestágeno para inducir ciclos menstruales artificiales, lo cual se logró exitosamente.

Es bien sabido que el análisis citogenético (cariotipo) proporciona el diagnóstico definitivo en estas pacientes; sin embargo, existe una gran variabilidad de los mismos, lo cual explicaría los diferentes fenotipos expresados y por ende, una amplia gama de características físicas; sin embargo, con estos métodos diagnósticos no se ha logrado aún identificar las regiones de los cromosomas X o Y responsables de esta variabilidad.^(4,6)

Con el desarrollo de las técnicas de estudio molecular, ha sido posible identificar material cromosómico de Y que no había sido evidenciado mediante el estudio citogenético, ya que existen numerosas aberraciones estructurales en la región eucromática que pueden llevar a la inestabilidad de Y con pérdida en los ciclos celulares subsecuentes con la formación de líneas 45,XO y variantes⁽¹⁷⁾

Existen estudios previos en pacientes con síndrome de Turner con distintos cariotipos (45,XO, mosaicos o pacientes con un cromosoma marcador) en quienes se ha demostrado mediante métodos moleculares la presencia de material cromosómico de Y, con frecuencias que suelen variar ampliamente desde 0% hasta 61%^(7, 13, 14, 18, 19, 20) incluyendo estudios realizados en población mexicana.

La presencia de material de Y en pacientes con síndrome de Turner en quienes se encuentran característicamente gónadas disgenéticas, incrementa el riesgo de desarrollo de tumores gonadales en ellas (específicamente, gonadoblastomas)⁽²¹⁾

Se han descrito algunos casos de gonadoblastoma en pacientes sin presencia de cromosoma Y en el análisis citogenético, y en quienes este material logró evidenciarse sólo mediante las técnicas de estudio molecular^(13,22,23), por lo

que se han realizado estudios posteriores dirigidos a identificar secuencias de Y en pacientes con síndrome de Turner con el fin de prevenir la presentación del gonadoblastoma ^(7,22,24,25). Se ha detectado un riesgo de desarrollo de gonadoblastoma que varía desde un 10% hasta un 30% ⁽¹¹⁾

En el caso particular de la población incluida en nuestro estudio, encontramos cariotipo 45,XO en el 71.4%, con mosaicos en el 28.6%; y cromosomas marcadores en el 0% .

Tras la amplificación de DNA mediante PCR, ninguna de las secuencias estudiadas (PABY, SRY, Amely, Yq, Y cen) en cada una de las pacientes fue detectada, por lo que la frecuencia de presentación de material de Y en las pacientes con cariotipo 45,XO en nuestro estudio, fue de 0%; resultado similar al obtenido por Larsen et. al., 1995 ⁽²⁶⁾ en 40 pacientes. Sin embargo, otros estudios reportan frecuencias de secuencias de Y en pacientes 45,XO de 3.3% ⁽¹⁸⁾ en 50 pacientes; 26.6% en 15 pacientes ⁽¹⁹⁾, 9.1% en 11 pacientes ⁽²⁷⁾ y 11.1% en 36 pacientes ⁽¹³⁾

Cuando consideramos al total de las pacientes, es decir, incluyendo los mosaicos, nuestra frecuencia de Y se mantiene en 0%, mientras que en los estudios citados previamente, se reportan 5.7% ⁽¹⁸⁾, 61% ⁽¹⁹⁾, 4% ⁽²⁷⁾ y 12% ⁽¹³⁾.

Al referirnos a la presencia de cromosomas marcadores, cabe señalar que en ninguna de nuestras pacientes se detectó algún cromosoma marcador, lo cual, se correlacionó con la ausencia de las secuencias de Y estudiadas. Nuevamente, encontramos que la frecuencia de Y derivado de cromosomas marcadores difiere significativamente entre los diferentes estudios, refiriéndose frecuencias de 87%⁽⁹⁾, 56% ⁽²⁸⁾, 33.3% ⁽²⁹⁾, 100% ⁽¹⁹⁾, 92% ⁽³⁰⁾ y 25% ⁽¹³⁾. Por tanto, se resalta la importancia de caracterizar inequívocamente el origen (X o Y) del cromosoma marcador en el síndrome de Turner, lo cual en ocasiones es difícil cuando se

utilizan sólo las técnicas citogenéticas convencionales, siendo posible sólo mediante métodos moleculares ^(29, 31)

Se ha postulado la existencia de un gen del gonadoblastoma (GBY) que predispone a las gónadas disgenéticas para desarrollar malignidad en fenotipos femeninos con presencia de Y; este GBY actuaría como oncogene en dichas gónadas ⁽¹²⁾. Por este motivo, los estudios más recientes han realizado la búsqueda de secuencias de Y en las que pueda estar contenido el GBY. Hay trabajos que proponen la localización de este gen dentro ó cerca de Yqh (región heterocromática del brazo largo de Y) ⁽³²⁾; mientras que otros proponen que se localiza en una pequeña región de Yp cerca del centrómero ⁽³³⁾. Incluso hay quienes lo han mapeado específicamente en el intervalo 4B (que contiene el centrómero de Y) al intervalo 5E (en la porción proximal del brazo largo) ⁽³⁴⁾ Como se mencionó previamente, ninguna de las secuencias de Y estudiadas en nuestras pacientes, y en las cuales se incluían las regiones de Y comentadas antes, y en las que pudiera estar contenido el GBY, fue identificada. En algunos estudios se han identificado secuencias de Y fuera de la región del GBY, sin embargo, su significado en relación a los tumores gonadales aún no está claro ⁽³⁵⁾. En nuestro estudio, tampoco se identificó ninguna secuencia de este tipo. Evidentemente, al no encontrar en nuestras pacientes material de Y, no se planteó a necesidad de realizar gonadectomía en ninguna de ellas.

Es importante señalar que, a pesar de que existen múltiples estudios previos en los cuales se han identificado las frecuencias de Y en distintas poblaciones de pacientes con síndrome de Turner, nuestro interés por realizarlo en nuestra unidad radica en que ésta es un centro hospitalario de tercer nivel, que concentra una gran población de pacientes con patologías relativamente poco frecuentes y que requieren manejos específicos.

En el caso del grupo de pacientes con síndrome de Turner del servicio de Endocrinología Pediátrica, todas ellas son pacientes con edades de 0 a 15 años

de edad y, tomando en cuenta que la característica relevante común en todas ellas es la talla baja, un gran porcentaje de estas niñas serán candidatas a recibir manejo con hormona de crecimiento biosintética. Es bien conocido el efecto de esta hormona en el crecimiento de todos los tejidos del cuerpo, y aunque no existen reportes previos en los cuales el uso de la misma tenga una relación directa con el desarrollo de gonadoblastomas, sí se ha encontrado correlación entre su uso y la aparición de otras neoplasias. Por ello, sería de gran utilidad determinar si el uso de la misma en pacientes con síndrome de Turner con secuencias de Y en las cuales está contenido el GBY, pudiera favorecer la expresión del mismo. En este caso, de las 21 pacientes incluidas en el estudio 16 de ellas reciben ya tratamiento con hormona de crecimiento; sin embargo, dado que no se detectó material de Y en ninguna de estas pacientes, así como tampoco en el grupo que no recibe tratamiento (n=5), no fue posible establecer alguna correlación.

Estamos de acuerdo con lo señalado por otros autores en el sentido de que es muy difícil comparar la frecuencia de secuencias de Y en pacientes con síndrome de Turner detectada en nuestro estudio, con las reportadas en estudios previos; esta limitación está dada por varios factores, dentro de los que se incluyen: la variabilidad del número de pacientes estudiadas, los diferentes cariotipos de las mismas (algunos estudios realizaron análisis molecular en pacientes con presencia de Y por citogenética); el número de mosaicos con cromosomas X normales o anormales, y el número de casos con cromosomas marcadores.

Además, también existen diferencias en las técnicas moleculares empleadas y en el número y tipo de secuencias estudiadas. Así, hay estudios en los cuales sólo se realizaron análisis moleculares (PCR y Southern blot) para el centrómero de Y (Y cen) en las pacientes en quienes se detectó un cromosoma marcador ⁽⁹⁾; en otros casos se empleó sólo PCR para amplificar SRY en pacientes 45,XO y mosaicos sin cromosoma marcador ⁽³⁶⁾. En otros más, se

realizó la búsqueda de SRY y Y cen mediante PCR y posteriormente con Southern blot en los productos de PCR en pacientes 45,XO y mosaicos con un cromosoma X, encontrando positividad para SRY en 3 pacientes mediante PCR y de 6 con Southern blot, mientras que Y cen fue negativo con ambas técnicas ⁽²²⁾. Por otra parte, en estudios en los cuales se utilizó PCR anidado, se observó que ésta no era una técnica útil para la detección de secuencias de Y, ya que sobreestimaba la frecuencia de las mismas en las pacientes con síndrome de Turner estudiadas ⁽²⁾. En el estudio realizado por López et. al. 98 se encontró una frecuencia de Y en el 12% tras el examen mediante PCR y Southern Blot de las secuencias Y cen, SRY, ZFY y Yqh en todas las muestras. En todas las pacientes en quienes se detectó material de Y, la región centromérica (Y cen) estuvo presente en el 100% de ellas; además, se encontró que tanto PCR como Southern blot mostraron una alta sensibilidad para la detección de material de Y; y a diferencia de los hallazgos de Kokova, se demostró la existencia de correlación y consistencia entre los resultados obtenidos con ambas técnicas, ya que todas las secuencias identificadas para cada paciente mediante PCR, fueron las mismas que se detectaron tras el análisis mediante Southern blot ⁽¹³⁾.

En este mismo trabajo, el estudio citogenético inicial se realizó en 100 metafases; en los casos en los que inicialmente se había reportado 45,XO y que tras el análisis molecular se identificó material de Y, se decidió analizar 400 metafases más en cada paciente (500 metafases en total). Se encontró que en uno de los casos (25% del total de pacientes con cariotipo inicial 45,XO, con Y positivo) se presentó un cromosoma marcador en 2 de las 500 células estudiadas ⁽¹³⁾.

Con todos los datos anteriormente señalados, podemos comentar que, a pesar de que en el grupo de pacientes estudiadas en nuestro centro no se detectó ninguna de las secuencias de Y estudiadas, es de crucial importancia realizar la búsqueda intencionada de material de Y mediante métodos moleculares en todas las pacientes en quienes se realice el diagnóstico de síndrome de Turner,

independientemente del cariotipo que se obtenga en el estudio inicial. Debemos tomar en cuenta que el estudio citogenético en las pacientes de nuestro hospital generalmente se realiza analizando 20-50 metafases, lo cual conduce a un gran porcentaje de sub-diagnóstico por este método. Por otra parte, no contamos con la infraestructura para la realización de estudios moleculares, lo cual limita la precisión diagnóstica no sólo en síndrome de Turner, sino en otras patologías de origen genético.

De contar con la posibilidad de realizar estudios de este tipo, en aquellas pacientes en quienes se detectaran secuencias de Y, podría ampliarse el estudio citogenético, incrementando el número de metafases estudiadas, con lo cual se posibilitaría la detección de mosaicismos hasta en un 25% de la población que inicialmente no hubiese sido detectada.

CONCLUSIONES

1. Las pacientes con síndrome de Turner pueden tener cariotipos 45,XO puros; sin embargo, existe un importante número de mosaicismos, dentro de los cuales el 2° cromosoma puede ser un Y normal o anormal.
2. El estudio citogenético no permite identificar un gran porcentaje de casos en los que puede estar presente material cromosómico de Y; en las pacientes con síndrome de Turner puede ser en un 0%-61%
3. Las técnicas de estudio molecular tienen una gran utilidad dentro del abordaje de varias patologías de origen genético, ya que comparadas con el estudio citogenético, son rápidas y permiten el análisis de varias muestras simultáneamente; por otra parte, su sensibilidad es mayor.
4. La importancia de detectar material cromosómico de Y en las pacientes con síndrome de Turner, radica en que su presencia puede sugerir la existencia del gen del gonadoblastoma, el cual puede actuar como oncogene en las gónadas disgenéticas que característicamente se encuentran en estas pacientes y favorecer el desarrollo de tumores germinales (gonadoblastoma, disgerminoma, coriocarcinoma).
5. Las pacientes con síndrome de Turner en edad pediátrica, son candidatas a recibir hormona de crecimiento para el manejo de su talla baja; dentro del cuidadoso escrutinio que debe realizárseles para iniciar el tratamiento, debe incluirse la identificación temprana de secuencias de Y mediante estudios moleculares, con el fin de realizar una gonadectomía oportuna y prevenir con ello la expresión tumoral que podría verse favorecida con el uso de esta hormona.

6. Toda unidad de atención de tercer nivel, en la cual maneja una gran gama de patologías poco frecuentes debe contar con los recursos e infraestructura necesarios que le permitan la realización de un diagnóstico preciso y proporcionar un tratamiento especializado. En nuestro hospital no se cuenta con los medios para la realización de estudios moleculares, por lo que se debe insistir en la importancia de incluirlos dentro de los auxiliares de diagnóstico, dada la gran utilidad de los mismos para el diagnóstico de múltiples patologías.

BIBLIOGRAFIA

1. Rosenfeld RG, Tesch L-G, Rodríguez-Rigau LJ, et al. Recommendations for diagnosis, treatment and management of individuals with Turner syndrome. *Endocrinologist* 1994; 4:351-358.
2. Nishi MY, Domenice S, Medeiros MA, Mendonca BB, Billerbeck AE. Detection of Y-specific sequences in 122 patients with Turner syndrome: Nested PCR is not a reliable method. *Am J Med Genet* 2002;107:299-305
3. Saenger P, Albertsson Wikland K, Conway GS, Davenport M, et al. Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome. *J Clin Endoc and Metab* 2001; 86: 3061-3069
4. Guizar Vázquez JJ. *Genética clínica: Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*. 3° ed. México. Ed. El Manual Moderno, 2001. pp. 137-144
5. Huang B, Thangavelu M, Bhatt S, Sandlin CJ, Wang S.. Prenatal diagnosis of 45,X and 45,x mosaicism: the need for thorough cytogenetic and clinical evaluations. *Prenat Diagn* 2002; 22:105-110
6. Hall J, Gilchrist D. Turner syndrome and its variants. *Pediatric Clin North Am* 1990; 37:1421-1440
7. Patsalis PC, Sismani C, Hadjimarcon MI, et al. Detection and incidence of cryptic Y chromosome in Turner syndrome patients. *Clin Genet* 1998; 53(4):249-257

8. Fernández-García R, García Doval S, Costoya S, Pasaro E. Análisis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: a study of "hidden" mosaicism. *Clin Genet* 2000; 58(3):201-208
9. Held KR, Keber S, Kaminsky E, et al. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depends on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet* 1992; 88:288-294
10. Hojbjerg C, Fedder J, Weis Naeraa R, Muller J. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. *J Clin Endoc Metab* 2000; 25(9): 3199-3202
11. Verp MS, Simpson JL. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genetics Cytogenetics* 1987; 25:191-218
12. Page DC. Hipótesis: a y chromosomal gene causes gonadoblastoma in disgenetic gonads. *Development (Suppl)* 1987; 101:151-155
13. López M, Canto P, Aguinaga M, et al. Frequency of Y chromosomal material in mexican patients with Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Gen* 1998; 76:120-124
14. Alvarez Nava F, Soto M., Sánchez MA, Fernández E, Lanes R. Molecular analysis in Turner síndrome. *J Pediatr* 2003; 142(3):336-340
15. Eisenstein BI: The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 1990; 322: 178-183
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky KF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16:1215

17. Jakubowski L, Jeziorowska A, Constantinou M, Kaluzewski B. Molecular analysis of Y chromosome long arm structural instability in patients with gonadal dysfunction. *Clin Genet* 2000; 57(4):291-295
18. Binder G, Koch A, Wajs E, Ranke M. Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's syndrome: Is cytogenetically undetected Y mosaicism common? *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3532-3536
19. Coto E, Toral J, Menéndez M, Hernando I, Plascencia A, Benavides A, López Larrea C. PCR-Based study of the presence of Y-chromosome sequences in patients with Ulrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 57:393-396
20. Quilter CR, Taylor K, Conway CS, Nathwani N, Delhanty JDA. Cytogenetic and molecular investigation of Y chromosome sequences and their role in Turner syndrome. *Ann Hum Genet* 1998; 62:99-106
21. Scully RE. Gonadoblastoma: a review of 74 cases. *Cancer* 1970; 26:1340-1356
22. Kokova M, Siegel SF, Wenger SL, Lee PA, Trucco M. Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *Lancet* 1993; 342:140-143
23. Lobaccaro JM, Lumbroso S, Belon C, Medlej R, Berta PH, Sultan C. Genes du chromosome Y et syndrome de Turner. *Ann Endocrinol* 1993; 54:323-329
24. Jacobs P, Dalton P, James R, Mosse K, Power M, Robinson D, Skuse D. Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 1997; 61:471-483

25. Damiani D, Guedes DR, Fellous M, Barboux S, McElreavery K, Kalil J, Goldberg ACK, Moreira-Filho CA, Barbosa A, Manna TD, Dichtchekenian V, Setian N. Ullrich-Turner syndrome: relevance of searching of Y chromosome fragments. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999; 12:827-831
26. Larsen T, Gravholt CH, Tillebeck A, Larsen H, Jensen MB, Nielsen J, Friedrich U. Parental origin of the X chromosome, X chromosome mosaicism and screening for the "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. *Clin Genet* 1995; 48:6-11
27. Fernández R, Méndez J, Pásaro E. Turner syndrome: A study of chromosomal mosaicism. *Hum Genet* 1996; 98:29-35
28. Nagafushi S, Tamura T, Nakahori Y, Takano K, Nishi Y, Iwatani N, Kitao M, Hori Y, Konda S, Hasegawa T, Numabe H, Fujieda K, Tanaka T, Hibi I, Nakagome Y. The majority of the marker chromosomes in Japanese patients with stigmata of Turner syndrome are derived from Y chromosomes. *Hum Genet* 1992; 89:590-592
29. López M, Torres LC, Méndez JP, Cervantes A, Canto P, Pérez-Palacios G, Kofman-Alfaro S. Detección molecular de secuencias de ADN derivadas del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner. *Rev Inv Clín* 1993; 45:233-239
30. Patsalis PC, Hadjimarcou MI, Velissariou V, Kitsiou-Tzeli S, Zera C, Syrrou M, Lyberatou E, Tsezou A, Galla A, Skordis N. Supernumerary marker chromosomes (SMCs) in Turner syndrome are mostly derived from the Y chromosome. *Clin Genet* 1997; 51: 184-190
31. Cooper C, Crolla JA, Laister C, Johnston DI, Cooke P. An investigation of ring and dicentric chromosomes found in three Turner's syndrome patients

- using DNA analysis and in situ hybridization with X and Y chromosome specific probes. *J Med Genet* 1991; 28:6-9
32. De Arce MA, Gosden C, Lawler M, Humphries P. Further evidence consistent with Yqh as an indicator of risk of gonadal blastoma in Y-bearing mosaic Turner syndrome. *Clin Genet* 1992; 41:28-32
33. Tsuchiya K, Reijo R, Page D, Disteche C. Gonadoblastoma: Molecular definition of the susceptibility region of the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1400-1407
34. Salo P, Kaariainen H, Petrovic V, et al. Molecular mapping of the putative gonadoblastoma locus on the Y chromosome. *Genes Chrom and Cancer*. 1995; 14:210-214
35. Chu C. Y chromosome mosaicism in girls with Turner Syndrome (commentary). *Clin Endocrinol* 1999; 50(1):17-18
36. Medlej R, Lobaccaro JM, Berta P, Belon C, Leheup B, Toyblanc JE, Weill J, Chevalier C, Dumas R, Sultan C. Screening for Y-derived sex determining gene SRY in 40 patients with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1289-1292