



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO.**

---

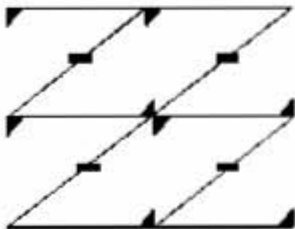
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

Detección del gen *SRY* en pacientes con  
Síndrome de Turner mediante Hibridación  
*in situ* con fluorescencia (FISH)

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
**P R E S E N T A:**  
REBOLLAR RODRÍGUEZ MARÍA DEL CARMEN  
DIRECTOR DE TESIS: M.C. Ma. DOLORES VERGARA

MÉXICO, D.F.

JUNIO DEL 2006





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE  
GENÉTICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL  
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DE  
LA M.C. Ma. DOLORES VERGARA.**

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A la M.C. Ma. Dolores Vergara y a la  
Biol. Cristina Alvarado Domínguez  
por el apoyo y asesoramiento para  
realizar esta tesis.

A la M.C. Sonia Chávez Ocaña,  
Q.B.P. Elvia García Jiménez y  
M. en C. Mónica Sierra Martínez  
por su apoyo y comprensión.

A la Biol. Concepción Yerena de Vega  
del Laboratorio de Genética del CMN  
"20 de NOVIEMBRE"

A la Biol. Karem Nieto Martínez del  
Laboratorio de Genética del Hospital  
General de México.

Por su colaboración en la realización  
de esta tesis.

A los miembros del jurado:

M.C. Ma. Dolores Vergara  
M.C. Raúl Zavala Chavero  
Biol. Cristina Alvarado Domínguez  
M. en C. Rosalva Rangel Corona  
Dra. Elía Roldán Reyes  
Por sus comentarios y sugerencias  
en la revisión de este trabajo

---

---

## **A MI FAMILIA**

En especial a mis padres por su apoyo para llegar al término de un ciclo más en mi preparación, por su esfuerzo para ser de mí una profesionalista y por la dedicación que siempre recibí.

CON CARIÑO Y RESPETO

CARMEN

---

## INDICE

RESUMEN .....	1
I. INTRODUCCIÓN .....	2
1. SÍNDROME DE TURNER .....	2
2. DIAGNÓSTICO: RELACIÓN CON LA EDAD .....	4
3. SIGNOS CARDINALES.....	5
4. CARIOTIPO .....	7
5. DISGENESIA GONADAL .....	9
6. RIESGO DE GONADOBLASTOMA .....	10
7. CROMOSOMA Y .....	11
8. GEN SRY .....	14
9. GENÉTICA MOLECULAR.....	16
10. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON FLUORESCENCIA .....	17
II. JUSTIFICACIÓN .....	23
III. HIPÓTESIS.....	24
IV. OBJETIVO GENERAL.....	24
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
VI. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	25
VII. CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	25
VIII. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	25
IX. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
XI. CORRELACIÓN .....	48
XII. CONCLUSIONES .....	50
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	51
XIV. ANEXO DE REACTIVOS .....	58

I

## RESUMEN

El Síndrome de Turner (ST), es considerado como un trastorno de la diferenciación sexual siendo su principal característica la ausencia de uno de los cromosomas X, es solo un ejemplo de alteración numérica de los cromosomas sexuales; se presenta con una frecuencia aproximada entre el 1-2% de los nacimientos, el resultado es un fenotipo femenino, también a ésta patología se le denomina disgenesia gonadal y se presenta aproximadamente en 1 de cada 2.500-3.000 nacimientos de niñas vivas.

Del 50-60% de los pacientes con ST tienen un cariotipo 45,X, el otro porcentaje presenta alteraciones estructurales de uno de los cromosomas X o frecuentemente más de una línea celular (mosaicismo), formando parte de la línea celular 45,X, estos mosaicismos también pueden presentar anomalías estructurales del cromosoma X o del cromosoma Y. Además en un 3% de los ST existen marcadores cromosómicos no identificados, la mitad de los cuales son derivados del cromosoma Y, la presencia de estos derivados pueden inducir a un tipo de malignización de las gónadas como es el denominado gonadoblastoma.

Para poder detectar la presencia de éste tipo de marcador es necesario auxiliarnos de técnicas moleculares, un ejemplo de ellas es la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la cual utiliza sondas fluorescentes específicas para los cromosomas (en este caso, sonda centromérica del X y la del gen *SRY*), lo que permite detectar el origen del material que por citogenética habitual no se observaba y se desconocía.

Por lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo el estudio en aquellas pacientes que a la valoración clínica presentaron características de Síndrome de Turner (ST), incluyendo para este estudio a 50 pacientes, con un rango de edad entre 3 meses y 41 años con una media de 18 años, de las cuales por análisis citogenético, 42% presentó un cariotipo normal y el 58% restante un cariotipo alterado, de este último correspondiendo el 74% a alteraciones numéricas, siendo el más frecuente en un 53% el complemento cromosómico 45,X, mosaicos con una línea normal y una anormal en un 34% y con marcadores cromosómicos el 13%; en el caso de las alteraciones estructurales fueron con menor frecuencia 24%, de las cuales el 17% de los casos correspondió a isocromosomas de brazos largos del X, con el mismo porcentaje a deleciones del X y en el 66% restante a mosaicos.

En 12 pacientes (53%) que presentaron un complemento cromosómico 45,X, se procedió a la identificación de secuencias del cromosoma Y, mediante la detección del gen *SRY*. Se utilizaron las sondas: centromérica del X (*CEPX* espectro green) y la sonda del gen *SRY* (LSI *SRY* DNA FISH espectro orange) y de igual forma en 3 pacientes (13%) que presentaron marcadores cromosómicos de origen desconocido.

El gonadoblastoma fue detectado en 3 pacientes (25%), donde dos pacientes (15 y 18 años) presentaron monosomía del X por citogenética convencional, y a la aplicación de la FISH se detectó un mosaicismo, en el cual el cromosoma Y era el involucrado, ya que se observaron secuencias del gen *SRY*. En el tercer paciente (13 años) presentaba mosaico con un marcador desconocido por citogenética y a la aplicación de la FISH este fue identificado, su origen fue del cromosoma Y; este marcador y mosaicos en bajo porcentaje solo fueron detectados por la FISH.

El porcentaje de gonadoblastoma que se observó en este estudio se encuentra similar a lo reportado en la literatura. La identificación de secuencias del cromosoma Y nos permite diagnosticar en etapas tempranas el desarrollo de cáncer gonadal (gonadoblastoma) y por lo tanto ofrecer una sobrevida mayor y una mejor calidad de vida, evitando que desarrollen este tipo de cáncer con la extirpación quirúrgica oportuna de las gónadas.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. SÍNDROME DE TURNER

A diferencia de algunas alteraciones numéricas en autosomas las aneuploidías en cromosomas sexuales son viables, debido a que el cromosoma Y contiene muy pocos genes informativos y por otro lado el mecanismo de inactivación del cromosoma X permite que sólo exista un cromosoma X activo para cada complemento diploide. Se ha estimado que aproximadamente 1 de cada 400 recién nacidos vivos presenta una anomalía de los cromosomas sexuales y el mosaicismo de éstos es frecuente e implica anomalías estructurales del cromosoma X o Y dando como consecuencia variabilidad en el fenotipo, en éstos casos no se observa ambigüedad de genitales y la principal causa de consulta generalmente es por infertilidad (Guizar, 2001).

El Síndrome de Turner (ST) es un ejemplo de alteración de los cromosomas sexuales, se describió por primera vez en 1768 por el anatomista Giovanni Morgagni, quien reportó que las mujeres con este síndrome tenían asociada la baja estatura, malformaciones renales y disgenesia gonadal. En 1902 Funke describió en una niña de 15 años, disgenesia gonadal, baja estatura, ausencia de caracteres sexuales secundarios, linfedema congénito y cuello halado. En 1930, Ullrich Turner dio la descripción definitiva de las características clínicas del ST y 57 años más tarde el diagnóstico fue confirmado con el estudio del cariotipo. Posteriormente el síndrome fue llamado Síndrome de Ullrich Turner por las aportaciones que realizó para ésta patología (Tesch y Rosenfeld, 1995).

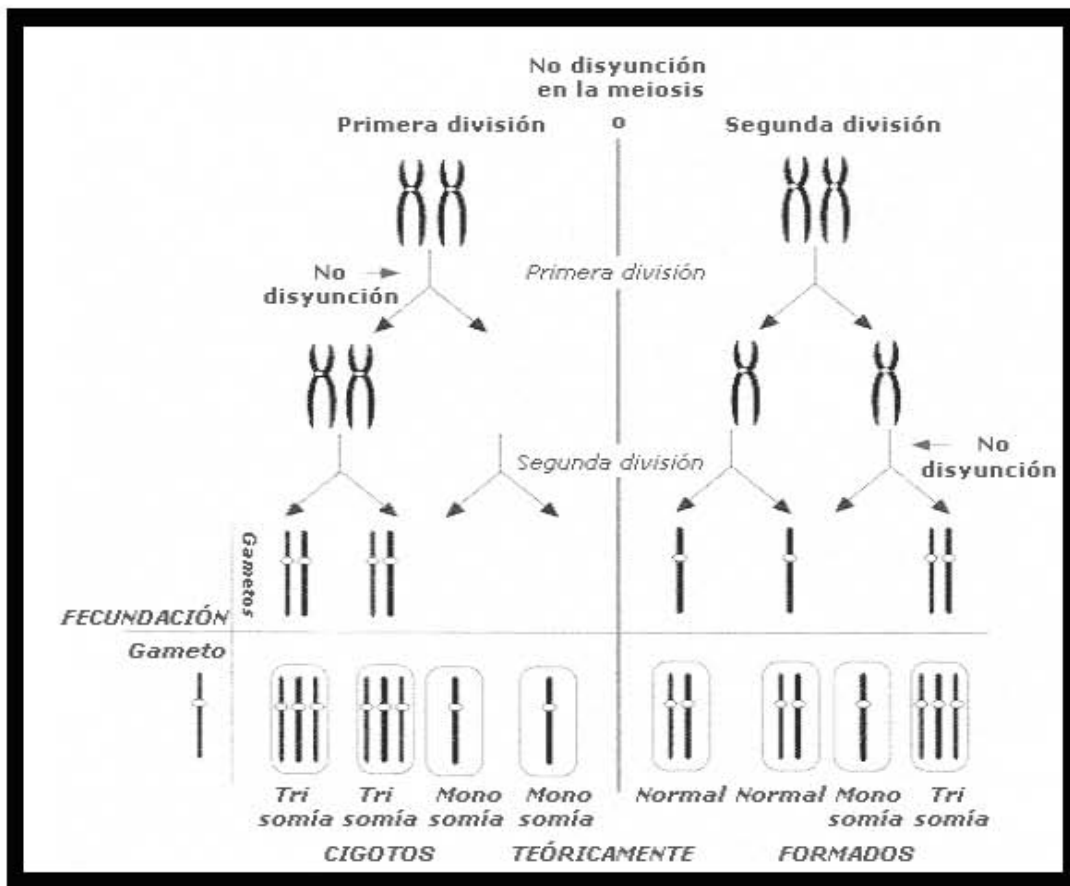
El ST es un trastorno de la diferenciación sexual; siendo este el más frecuente en el humano, presentándose aproximadamente del 1-2% de los nacimientos (Hassold y cols, 1992), a ésta anomalía cromosómica también se le denomina disgenesia gonadal y está presente en aproximadamente en 1 de cada 2.500-3.000 nacimientos de niñas vivas (De la Chapelle, 1990; Gicquel y cols, 1998; Elsheikh y cols, 2002).



Existen dos teorías que intentan explicar esta anomalía cromosómica:

1. La teoría mitótica afirma que la pérdida de este cromosoma no se origina en los gametos, sino durante las primeras etapas del desarrollo embrionario.
2. La teoría meiótica dice que durante la gametogénesis se pierde uno de los cromosomas sexuales y el individuo que se forme a partir de la fertilización portará este error cromosómico (fig. 1).

**Fig. 1 TEORÍA MEIÓTICA**



(Tomado de Gil y cols., 2003)

## 2. DIAGNÓSTICO: RELACIÓN CON LA EDAD

### 2.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico se basa en el reconocimiento del cuadro clínico, que debe ser confirmado mediante la realización de un cariotipo, con la finalidad de facilitar el diagnóstico es conveniente junto con el conocimiento del cuadro clínico, destacar las principales características del ST en las distintas etapas de la vida; desde el nacimiento hasta la edad adulta (Lippe, 1990; Saenger, 1993).

La frecuencia de los hallazgos cardinales en el síndrome son: talla baja (100%), disgenesia gonadal, amenorrea primaria y esterilidad (>90%), linfedema en dorso de manos y pies que se puede observar desde el nacimiento (40%), tórax ancho algunas veces con pectus excavatum, pezones invertidos, hipoplásticos y con mayor separación (<80%), pabellones auriculares anormales, frecuentemente prominentes (80%), implantación baja de cabello, cuello corto (80%), micrognatia (>70%), cubitus valgus (70%), uñas angostas hiperconvexas y profundas (70%), anomalías renales (las más frecuente, riñón en herradura) (60%), piel redundante en la nuca y/o cuello alado (50%), metatarsianos y metacarpianos del cuarto dedo cortos (50%), nevus pigmentados (50%), defectos en la aorta (20-40%) e hipertensión de etiología desconocida (27%).

Las características menos frecuentes en el síndrome incluyen la ptosis palpebral, hipertelorismo y anomalías esqueléticas (Buyse, 1990).

Los signos clínicos más importantes que deben de ser tomados en cuenta en función de las distintas etapas de la vida son los siguientes:

❖ **RECIÉN NACIDO:** del 10-25% presentan en el período neonatal, linfedema de manos y pies, pliegue cutáneo laxo bilateral en cuello (pterygium colli).

❖ **LACTANTE:** el diagnóstico se realiza con la presencia de linfedema en manos y pies, separación de los pezones y anomalías cardíacas.

❖ **INFANCIA:** el signo principal es la talla baja tomando en cuenta la variabilidad fenotípica del síndrome, aunque en algunos casos la talla baja puede ser de diferente etiología, no encontrándose relacionada con este síndrome.

❖ **PUBERTAD:** es importante considerar el diagnóstico en pacientes que presenten talla baja y ausencia de las características sexuales secundarias.

El cuadro clínico más semejante al Síndrome de Turner, es el Síndrome de Noonan, la presentación clínica y fenotípica de este síndrome en esta etapa es muy similar ya que, puede existir duda diagnóstica, por lo que es indispensable el estudio del cariotipo el cual en estos pacientes es normal (Noonan, 1963; Van de Burgt y cols, 1993; Noonan, 1994).

## **2.2 EDAD AL DIAGNÓSTICO**

A pesar de que su cuadro clínico es bien conocido, nos encontramos con la paradoja de comprobar el diagnóstico, ya que en algunos casos es tardío. La distribución de la edad al diagnóstico es bimodal, es decir, con un pico en la edad neonatal y otro en la etapa puberal. El 15% de las pacientes son diagnosticadas durante el período neonatal, a la edad de 4 años aumenta un 8% de casos diagnosticados, el resto de estas pacientes son diagnosticadas en periodos más tardíos de la infancia o bien hasta la adolescencia (Massa y Vanderschueren, 1991), otro grupo con un promedio de 5.3 años de edad al que se le denomina de diagnóstico tardío (Sävendahl y Davenport, 2000).

Este hecho corrobora, que cualquier niña que presente características inexplicables asociadas al ST debe ser evaluada para descartar dicha patología.

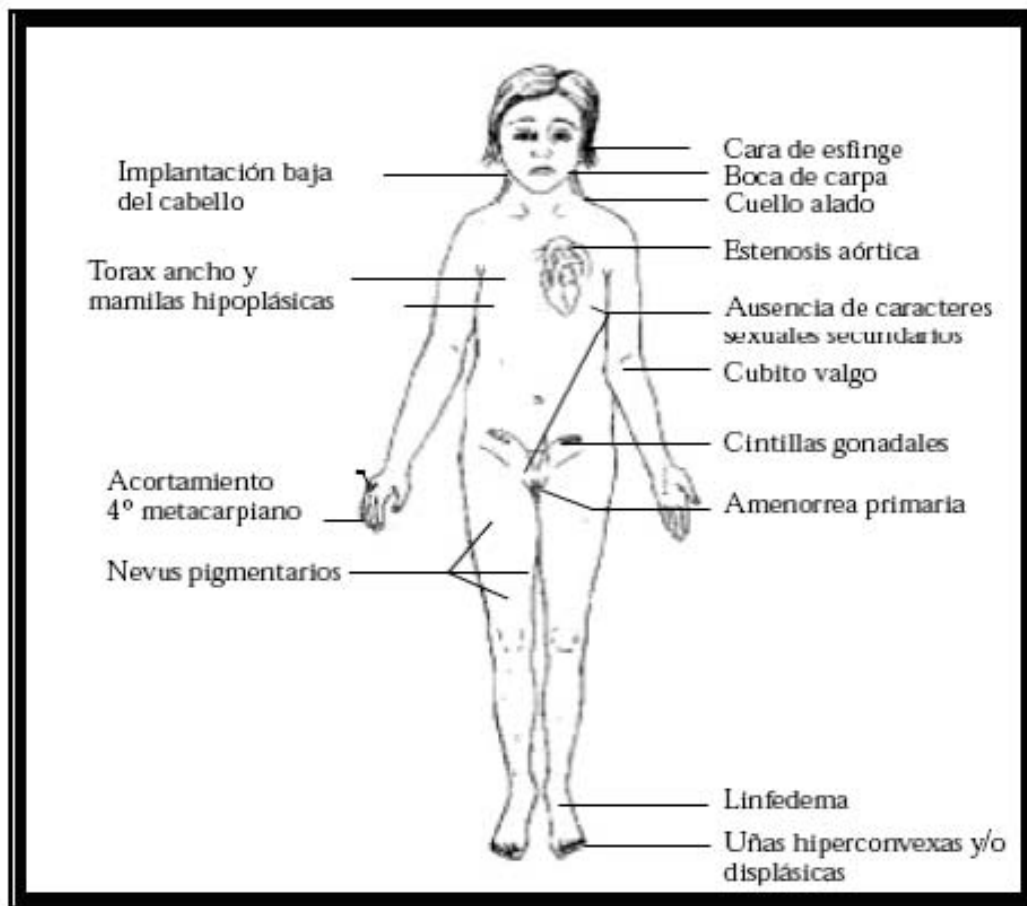
## **3. SIGNOS CARDINALES**

Hoy día no se puede explicar la gran variabilidad del fenotipo del ST, ya que se desconoce dónde se sitúan con exactitud los genes candidatos que caracterizan a dicho síndrome. Las alteraciones fenotípicas se correlacionan con la extensión de la pérdida del brazo corto de uno de los cromosomas X, la presencia de la función ovárica se pierde, si la deleción abarca hasta la región Xp11. La talla alta se explica por la ausencia de alteraciones en el brazo corto y la talla baja implica que los genes responsables están localizados en el brazo corto de dicho cromosoma, probablemente, en una zona vecina del gen SHOX ( Short stature homeobox-

containing gene). Un ejemplo de ello son las pacientes con cariotipo 46,Xi(Xq) (isocromosoma del brazo largo del X) que presentan un fenotipo similar al 45,X.

Los estudios de biología molecular han demostrado que en el 80% de los casos, el cromosoma X faltante es de origen paterno. En los mosaicos se detecta que el origen de la monosomía corresponde a un 50% materno y un 50% paterno. El origen materno o paterno del cromosoma X presente, no influye en el fenotipo, no se ha encontrado relación significativa entre el origen parental del cromosoma X que pueda explicar el fenotipo (Tsezou y cols, 1999) (fig. 2).

**Fig. 2. FENOTIPO DEL SÍNDROME DE TURNER**



(Tomado de Delgado y Galan, 1998).

#### 4. CARIOTIPO

El cariotipo del ST es variable al igual que ocurre con su fenotipo, las pacientes presentan diferencias, no sólo en la magnitud y frecuencia de sus anomalías somáticas, sino también en el grado de afectación de su función ovárica. Los distintos cariotipos con que se relaciona el ST se muestran en la tabla 1.

De acuerdo con los análisis citogenéticos, del 50-60% de los pacientes con ST tienen un cariotipo 45,X (fig. 3). El resto presenta alteraciones estructurales de uno de los cromosomas X o más frecuente un mosaico, entendiéndose como mosaico a la presencia de dos o más líneas celulares en un cariotipo, procedentes del mismo cigoto, dando como resultado una pérdida cromosómica posterior a la fertilización. Frecuentemente al lado de una línea celular 45,X, se ha observado otra línea con un número normal de cromosomas. En otros casos, se observa que la línea celular "normal" en número puede presentar alteraciones estructurales y que estas pueden ser del cromosoma X o del Y. Además, en un 3% de los casos de ST, existen marcadores cromosómicos no identificados, la mitad de los cuales están asociados al cromosoma Y.

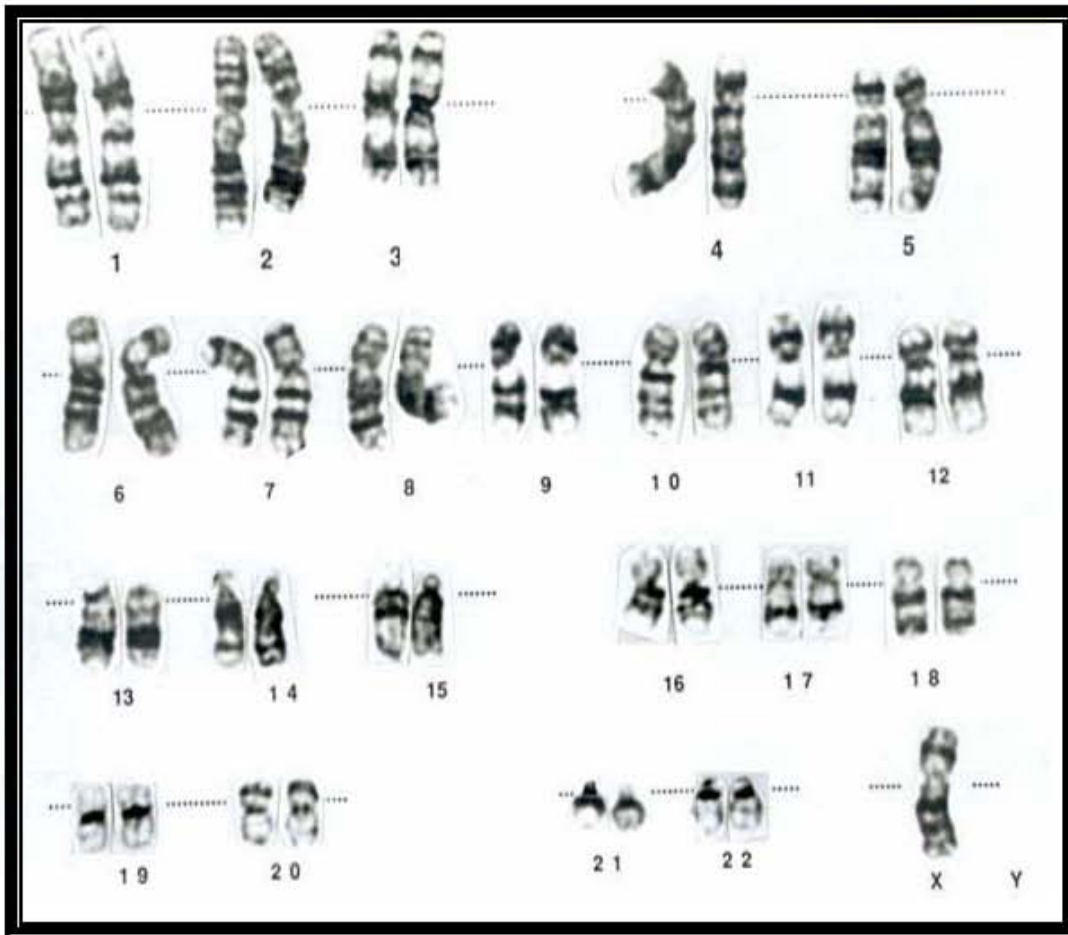
**TABLA 1. CARIOTIPOS RELACIONADOS CON EL SÍNDROME DE TURNER**

<b>ALTERACIONES NUMÉRICAS</b>	
Monosomía del X (55-60%). Mosaicos (24%)	45,X 45,X/46,XX ; 45,X/47,XXX ; 45,X/46,XY ; 45,X/46,XX/47,XXX
<b>ALTERACIONES ESTRUCTURALES</b> Con material del brazo corto del cromosoma X	Isocromosoma de brazos cortos, 46,Xi(Xp). Delección del brazo corto del X, 46,Xdel(Xp)
Con pérdida de material del brazo largo del X.	Delección del brazo largo 46,del(Xq) Translocaciones X-autosoma, X-X Cromosoma X en anillo, 46,Xr(X)
Delección del brazo corto (Yp)	46,Xdel(Yp)
Isocromosoma del Y	46,Xi(Yp)

(Tomado de Guizar, 2001)

Del 6 al 15% de los casos con Síndrome de Turner presentan un cariotipo en mosaico, con una línea celular 45,X, y otra con un pequeño cromosoma marcador de origen no determinado, la identificación de su origen se dificulta por la falta de resolución de las técnicas citogenéticas, siendo de vital importancia su identificación, ya que, si provienen del cromosoma Y, la paciente tendrá un riesgo elevado de desarrollar gonadoblastoma (González del Ángel y cols, 1995).

**Fig. 3. MONOSOMÍA DEL CROMOSOMA X,  
CARIOTIPO DEL SÍNDROME DE TURNER**



El porcentaje de mosaicos que presentan una línea celular con un cromosoma Y normal o anormal (45,XO/46XY) ha sido estimado en un 5.5% mediante análisis citogenéticos (Magenis y cols, 1980).

La posibilidad de detectar mosaicos dependerá, del número de células examinadas, del tipo de tejido estudiado y de la sensibilidad del método aplicado. Los análisis citogenéticos convencionales pueden fracasar en la detección de cromosomas con anomalías estructurales si estas son pequeñas o escasas.

La citogenética convencional no permite establecer el diagnóstico en todos los casos. Si el resultado es negativo a pesar de que el cuadro clínico presente las características del ST, es necesario realizar un cariotipo a partir de fibroblastos (Limal, 2000). Recientemente, la biología molecular del cromosoma X y Y han permitido confirmar el diagnóstico, en pacientes con algunos signos clínicos y cariotipo normal.

## **5. DISGENESIA GONADAL**

De forma general podemos decir que, dentro de los mecanismos de la diferenciación sexual, desconocemos los genes responsables del desarrollo ovárico. El concepto de disgenesia ovárica, en el contexto del ST, es el más difícil de comprender.

En pacientes con ST se pueden observar diversos grados de desarrollo puberal, que se asocian a deleciones del brazo corto del cromosoma X, de lo que se deduce que existe una correlación entre la disgenesia ovárica y el grado de deleción. Este hecho, confirma la existencia de genes candidatos que pueden explicar la variabilidad del grado de desarrollo del tejido ovárico (Marozzi y cols, 2000).

Por otra parte, el estudio de las alteraciones fenotípicas relacionadas con deleciones en el brazo largo del cromosoma X se encuentran en sus primeras etapas, el único hallazgo del que se tiene conocimiento es que la falla de la función ovárica se encuentra relacionada con la región q13-q26, un reporte en mujeres con falla precoz de la función ovárica se ha observado relacionada con esta región.

También se han identificado dos locus independientes en el brazo largo del cromosoma X (Xq), que parecen estar implicados en la función ovárica (Marozzi y cols, 2000), estos locus, se encuentran localizados en Xq26-q28 y Xq13.3-q22 (Zinn y Ross, 2000).

## **6. RIESGO DE GONADOBLASTOMA**

Basándose en que estadísticamente sólo el 1% de los fetos con dotación 45,X llegan a término, se ha especulado que la mayor parte de los pacientes de ST son en realidad mosaicos no detectados (Hassold y cols, 1992; Battin, 1998). Numerosos investigadores postulan que la supervivencia de fetos con ST y con solo una línea celular 45,X necesitan tener un mosaico, al menos en algún órgano o tejido para poder sobrevivir (Limal, 2000; Guizar, 2001). En los casos de mosaicos donde se observa un fragmento cromosómico de etiología desconocida, aunque son en porcentaje bajo, representan un peligro por la posibilidad de malignización que presentan (Magenis y cols, 1980; Hassold y cols, 1988; Jacobs y cols, 1997).

La detección de fragmentos cromosómicos y/o mosaicos donde se encuentra involucrado el cromosoma Y en pacientes con ST (45,X/46XY) tiene una importancia clínica trascendental, debido a que esta combinación se acompaña de un elevado riesgo en el desarrollo del gonadoblastoma, la cual es una neoplasia excepcional que se desarrolla exclusivamente en gónadas disgenéticas de pacientes que tienen un mosaico de cromosoma Y y su estirpe celular puede ser de células estromales o de células germinales (Gravholt y cols, 2000; Elsheikh y cols, 2002; Mazzanti y cols, 2004).

El riesgo de tener gonadoblastoma se incrementa con la edad, se ha estimado que a la edad de 10 años es del 2% y del 25-30% a la edad de 30 años. La transformación maligna ocurre en el 60% de estos tumores, donde el 50% desarrolla disgerminomas y 10% otro tipo de tumores malignos de células germinales. El gonadoblastoma puede producir estrógenos o andrógenos y como resultado de ello grados de virilización o feminización respectivamente, se ha sugerido que las hormonas sexuales juegan un rol importante, facilitando el desarrollo de este tipo de tumores. Desafortunadamente aún se desconoce la patogénesis exacta del gonadoblastoma,



para evitar esta complicación se recomienda la extirpación quirúrgica de las gónadas en las pacientes con alto riesgo (Teter, 1967; Scully, 1970; Simpson, 1976; Page, 1987; Ostrer y Clayton, 1989; Gravholt y cols, 2000; Elsheikh, 2002; Mazzanti y cols, 2004).

## **7. CROMOSOMA Y**

El cromosoma Y contiene más de 200 genes, está constituido por ADN de 40 mm de longitud (60 megabases), de los cuales el 95% no recombina y el 5% llamada porción pseudoautosómica, puede recombinar su contenido con el cromosoma X. Se considera hoy en día que en este cromosoma tenemos ADN cuyo origen es exclusivamente masculino (fig. 4). De igual manera se ha postulado que el ADN contenido en las mitocondrias por fuera del núcleo de todas nuestras células, es de origen exclusivamente femenino, puesto que el espermatozoide pierde todas sus mitocondrias en el momento de penetrar en el óvulo. Además de determinar el sexo, algunas enfermedades asociadas a aberraciones de este cromosoma son la azospermia y la disgenesia gonadal (Quintana-Murci y Fellous, 2001).

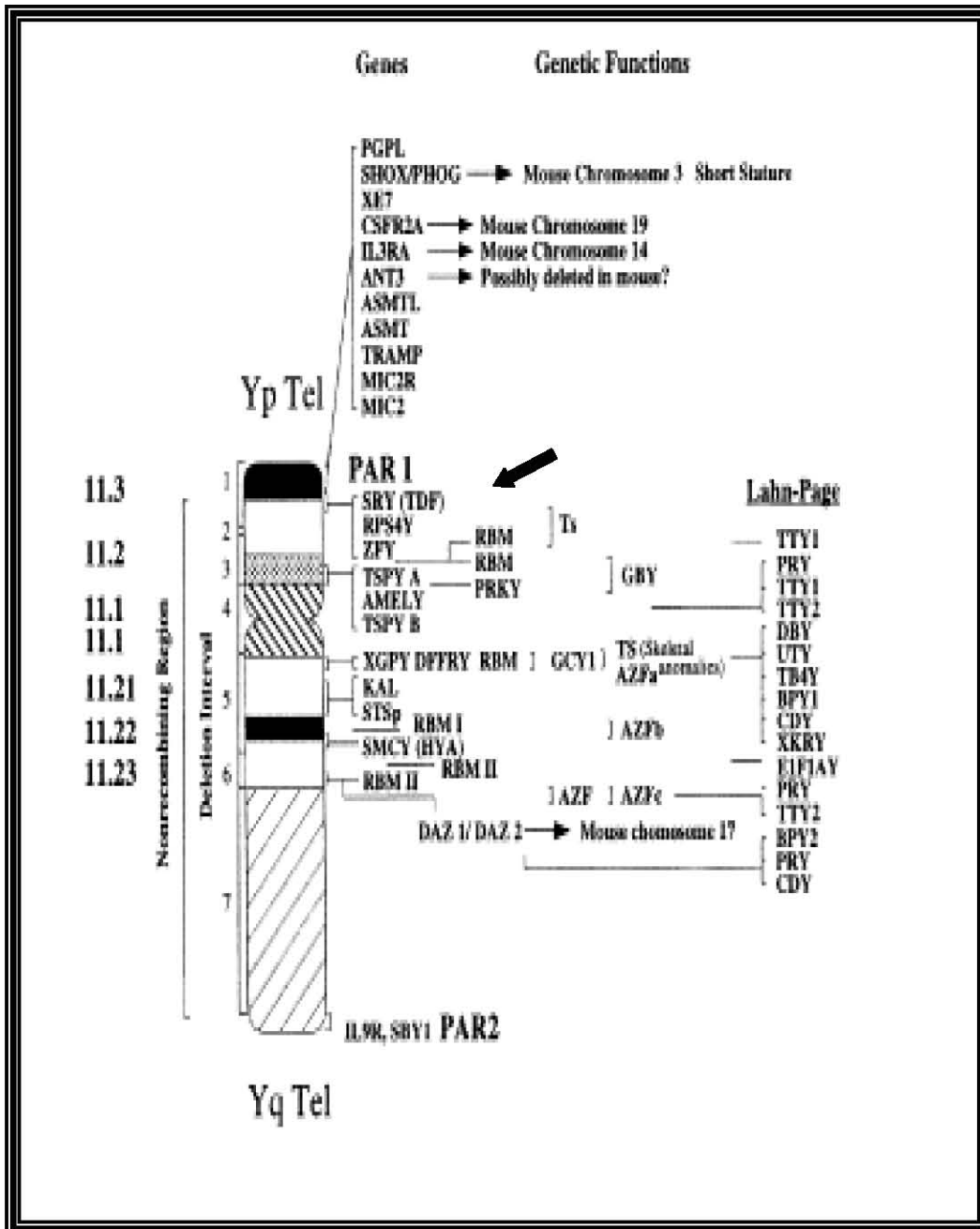
La presencia del cromosoma Y y más específicamente del gen *SRY* (del inglés sex determining region of the Y chromosome), localizado en la parte pseudoautosómica del brazo corto del cromosoma Y, compuesto de un solo exon que codifica a una proteína de 204 aminoácidos, presenta su DNA conservado y se ha sugerido que esta proteína regula la expresión del gen, es esencial para iniciar el desarrollo sexual, por lo que se le ha denominado como el gen maestro para la regulación en la cascada de la diferenciación sexual (Quintana-Murci y Fellous, 2001), la identificación de la región *SRY* es muy importante para el análisis de individuos que presentan Síndrome de Turner, infertilidad, ambigüedad de genitales, hombres 46,XX o individuos que tengan secuencias de cromosoma Y, toda vez que en éstos, el gen *SRY* se encuentra presente por un error en la cascada de diferenciación sexual, aunque el gen *SRY* no sea el responsable de desarrollar gonadoblastoma la presencia de material del cromosoma Y puede ser causa de la neoplasia (Grumbach, 1998; Teraoka y cols, 1998).

El papel del cromosoma Y en la oncogénesis de este tipo de cáncer en el humano aún es desconocido ya que existen genes tumor-supresores y oncogenes en el mismo cromosoma que pueden actuar en diferentes etapas durante el proceso de la tumorigénesis.

Se ha sugerido que la expresión aberrante de un oncogen favorece la proliferación de células que se activan en estados tempranos de la tumorigénesis, en estos eventos tempranos puede estar involucrado parte del cromosoma Y o bien todo el cromosoma.

La pérdida o represión de un gen tumor-supresor resulta esencial ya que cuando existe esta alteración, da lugar a la aceleración del proceso del cáncer. Desafortunadamente aún no se tienen los suficientes estudios que confirmen el papel de los diferentes locus, relacionados con cáncer en humanos donde esta involucrado el cromosoma Y (Abeliovich y cols, 1994T; Kirk y cols, 1994; Konig y cols, 1994; Dave y cols, 1996; Jackson-Cook y cols, 1996; Watanabe y cols, 1996; Brothman 1997; Geburek y cols, 1997; Mertens y cols, 1997).

**Fig. 4 CROMOSOMA Y**



(Tomado de Robinson, 1999).

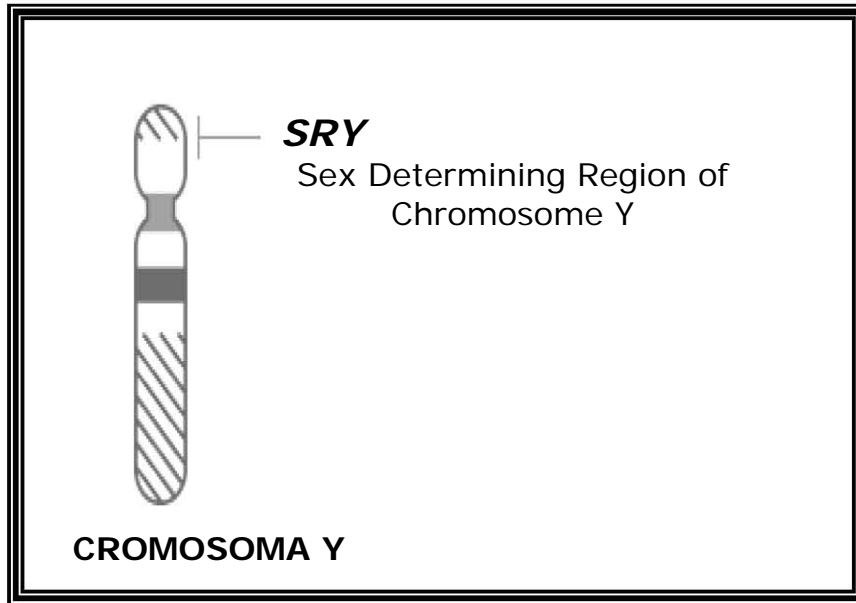
## 8. GEN SRY

Mediante el análisis de las alteraciones estructurales del cromosoma Y fue posible, en la década de 1980, identificar al gen responsable de la diferenciación testicular. Fue así como se postuló que correspondía al gen ZFY (del inglés Zinc Finger Chromosome Y), codificante de una proteína reguladora de transcripción y localizado en el brazo corto del cromosoma Y. Sin embargo, el locus del verdadero gen responsable de la diferenciación testicular, sólo se identificó a finales del siglo XX, después de estudios complejos basados en análisis genéticos moleculares de secuencias de traslocación y deleción, en pacientes 46XX y 46XY con inversión sexual. El locus propuesto estaba en Yp11.3, inmediatamente proximal a la región pseudoautosómica del brazo corto del cromosoma Y. Este gen hipotético fue nombrado como TDF (del inglés Testes Determining Factor), posteriormente mediante estudios más específicos de este gen fue denominado *SRY* (del inglés Sex Determining Region of Chromosome Y) (fig. 5) (Berta y cols, 1990; Teixeira y cols, 2001; Jairo y cols, 2005).

El factor de transcripción codificado por el gen *SRY* tiene un sólo exon de 850 kilobases. Su dominio funcional, denominado también grupo de alta movilidad (HMG), tiene 79 aminoácidos y se une al ADN para dar inicio a la transcripción del gen (fig. 6) (Jairo y cols, 2005).

La secuencia del extremo 5' no contiene cajas TATA o CCAT, es rica en dobletes GC y contiene dos sitios de reconocimiento Sp1 que se encuentran en tandem (Sp1 es considerado como un factor de transcripción para Zinc Finger) (Pinsky, 1999).

**Fig. 5 LOCALIZACION DEL GEN *SRY*  
EN EL CROMOSOMA Y**

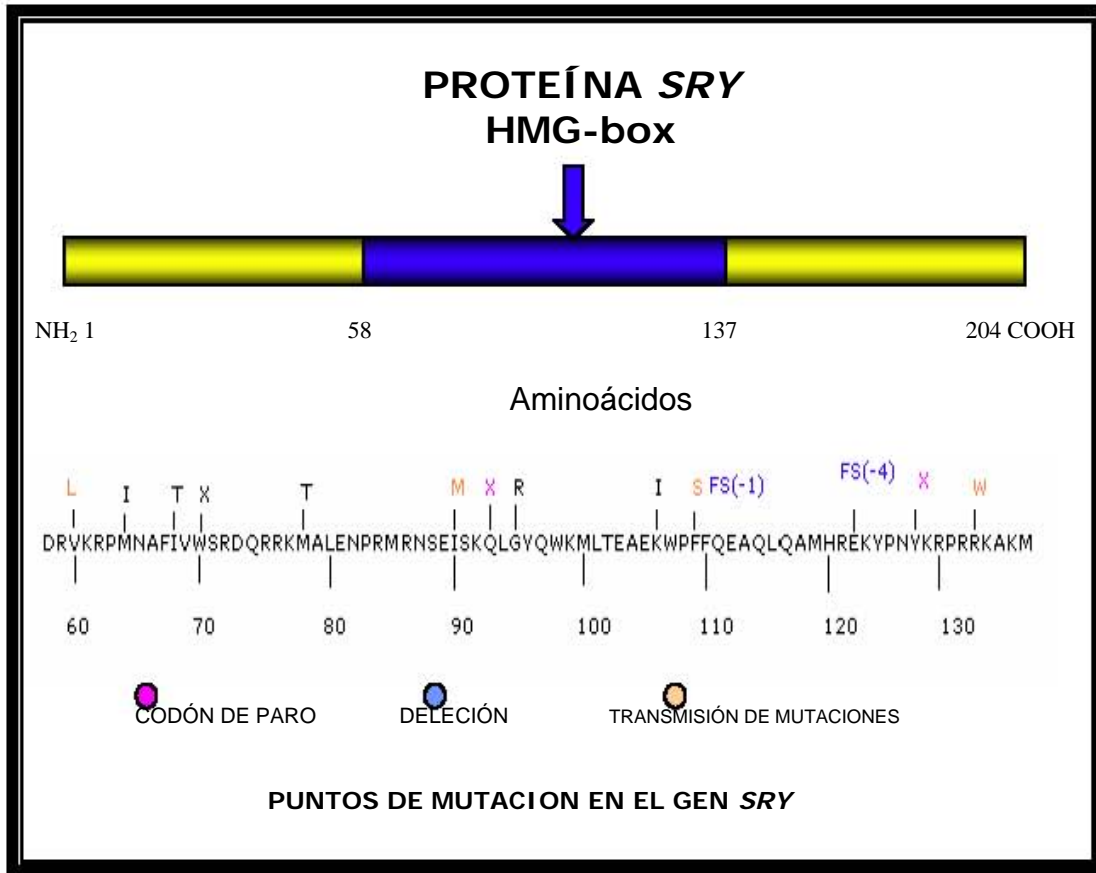


(Tomado de Sinclair y cols., 1990).

Desde el punto de vista evolutivo, la caja HMG del *SRY* es altamente conservada. Por fuera de la caja HMG existen ciertas regiones que podrían ser homologadas entre especies de animales (con secuencias de *SRY*) y seres humanos. Este hecho sugiere que dichas regiones no tienen significado funcional o bien, pueden ser muy específicas (Teixeira y cols, 2001).

La ausencia de *SRY* y la doble dosis de los genes del cromosoma X aseguran el desarrollo y la permanencia de los ovarios, el desarrollo ovárico es más tardío que el testicular (Jairo y cols, 2005).

**Fig. 6 PROTEÍNA SRY  
(SEX DETERMINING REGION OF CHROMOSOME Y)**



(Modificado de Eberhard, 2001).

## 9. GENÉTICA MOLECULAR.

El estudio de los cromosomas ha sido convencionalmente limitado a la visualización de los mismos e identificación de sus brazos cortos o largos. La utilización de técnicas de tinción ha permitido la numeración de pequeñas áreas (bandas) de los mismos. En la actualidad la utilización de las modernas técnicas de biología molecular, nos permite reconocer pequeñas cantidades de material genético, desde niveles inferiores hasta un gen individual. Estas técnicas han permitido establecer relación entre el cuadro clínico y la pérdida de material genético del cromosoma X o Y (Ogata y cols, 2000).

Para llevar a cabo este tipo de investigaciones es necesario aplicar técnicas de biología molecular que ayuden a integrar un buen diagnóstico, en este caso particular para el S. Turner. Un estudio que apoya a la citogenética tradicional es la Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), con sondas específicas para los cromosomas X y Y lo que permiten ampliar los estudios genéticos.

## **10. HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA**

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) es una nueva metodología que combina técnicas de hibridación del DNA con la utilización de un microscopio de fluorescencia. Durante la FISH un único fragmento de DNA o fragmentos de DNA son marcados con un compuesto que fluoresce (fluorocromo) (Jackson, 2002; McDonald, 2002).

El empleo rutinario de la técnica FISH permite detectar mosaicos en muy bajo porcentaje así como el origen de pequeños fragmentos cromosómicos como son: anillos, deleciones y derivados del cromosoma Y, etc.

La hibridación *in situ* es una metodología que se basa en la propiedad de apareamiento de las bases A-T y G-C de los ácidos nucleicos, utiliza una secuencia de nucleótidos marcada químicamente con una molécula reportera que sirve como sonda para localizar un DNA complementario blanco, este puede ser de cromosomas en metafase o de células en interfase.

Los primeros en realizar hibridación *in situ* fueron Pardue Grall y Jonh en 1969, quienes utilizaron sondas marcadas con medios radioactivos, la detección se realizaba por medios de autorradiografía. En 1986 Pinkel utilizó sondas que obtuvo de la clonación de fragmentos de DNA, modificados por medios químicos para remplazar los radioisótopos con moléculas fluorescentes, a ésta modificación se le llamo hibridación *in situ* con fluorescencia (Guizar, 2001).

### **10.1 TIPOS DE SONDAS**

Las sondas son segmentos de DNA que se modifican químicamente, la secuencia de una sonda es complementaria a una secuencia que se encuentra en el DNA blanco (Guizar, 2001).

En la citogenética molecular existen diferentes tipos de sondas como son:

- ❖ Sondas que detectan los centrómeros específicos de cada cromosoma. Gran parte de estas secuencias son ADN  $\alpha$ -satélite, que consiste en secuencias repetidas en tándem que miden cerca de 171 pb. También pueden ser familias de ADN satélite III compuestas de monómeros de 5 pb.
- ❖ Sondas que reconocen un cromosoma completo, las cuales se componen de una mezcla de sondas que reconocen muchos elementos a lo largo de un cromosoma determinado; se obtienen de bibliotecas genómicas a partir de cromosomas aislados por citometría de flujo, luego se someten a una digestión total, con lo cual se obtienen fragmentos recombinantes que se insertan en una fago y luego en un plásmido. Esto permite la hibridación de cromosomas completos y se le conoce como tinción de cromosoma completo ó painting completo.
- ❖ Las sondas de secuencia única o locus específicas. Que identifican locus determinados que reconocen secuencias entre 15 y 500 kb por lo que son útiles en la detección de regiones que por citogenética no pueden ser reconocidas (Le Beau, 1993; Pinkel, 1993; Schad y Dewald, 1995; Swiger y Tucker, 1996).

La longitud de la sonda varía entre 250 pb y 1kb dependiendo de la aplicación, para las sondas de cromosomas completos la longitud óptima es de 200 a 800 pb (Brenemam y cols, 1994; Swiger y Tucker, 1996).

Cuando una sonda excede de 1kb resulta en un incremento en la hibridación inespecífica. En contraste, las sondas con menos de 200 pb pueden tener pocos enlaces de hidrógeno para hibridar con el blanco (Brenemam y cols, 1994).

## **10.2 MARCAJE DE LAS SONDAS**

### **10.2.1 MARCAJE INDIRECTO**

Gran parte de los métodos incluyen sondas de DNA marcado no fluorescentes por sí mismas, que contienen una molécula reportera como biotina o digoxigenina, unidas de manera covalente a un nucleótido por extensión del “cebador o primer” al azar,



reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y “nick translation” al que fueron incorporadas por una variedad de métodos. Para detectar la sonda se utilizan macromoléculas reporteras conjugadas con una marca fluorescente como fluoresceína, rodamina o rojo Texas. Cuando la sonda esta marcada con biotina, se detecta mediante avidina conjugada con isotiociano y fluoresceína (avidina-FITC), la señal fluorescente puede amplificarse con capas sucesivas de anticuerpo antiavidina biotina y avidina-FITC. Un anticuerpo anti-digoxigenina amplifica la digoxigenina y puede ser amplificada con un segundo anticuerpo específico para el primero. La ventaja principal de utilizar sondas marcadas indirectamente es la facilidad de la amplificación de la señal (fig. 7).

### **10.2.2 MARCAJE DIRECTO**

Las sondas marcadas directamente tienen el fluorocromo unido covalentemente al DNA (FITC, rodamina y tintes ciano). La ventaja de estas sondas es que no requieren de avidina o anticuerpos para su detección. Este tipo de marcaje proporciona una alta resolución y aumento de la intensidad de la señal (Pinkel, 1993; Döhner y cols, 1995; Schad y Dewald, 1995; Swiger y Tucker, 1996; Guizar, 2001) (Fig. 7).

### **10.3 CONTRATINCIONES Y COLORANTES**

En la FISH, la identificación de los cromosomas es muy importante, ya que se debe reconocer la metafase o el núcleo sobre el cual híbrida la sonda, lo cual se consigue utilizando una contratinción, entre las más utilizadas se encuentra el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y el yoduro de propidio.

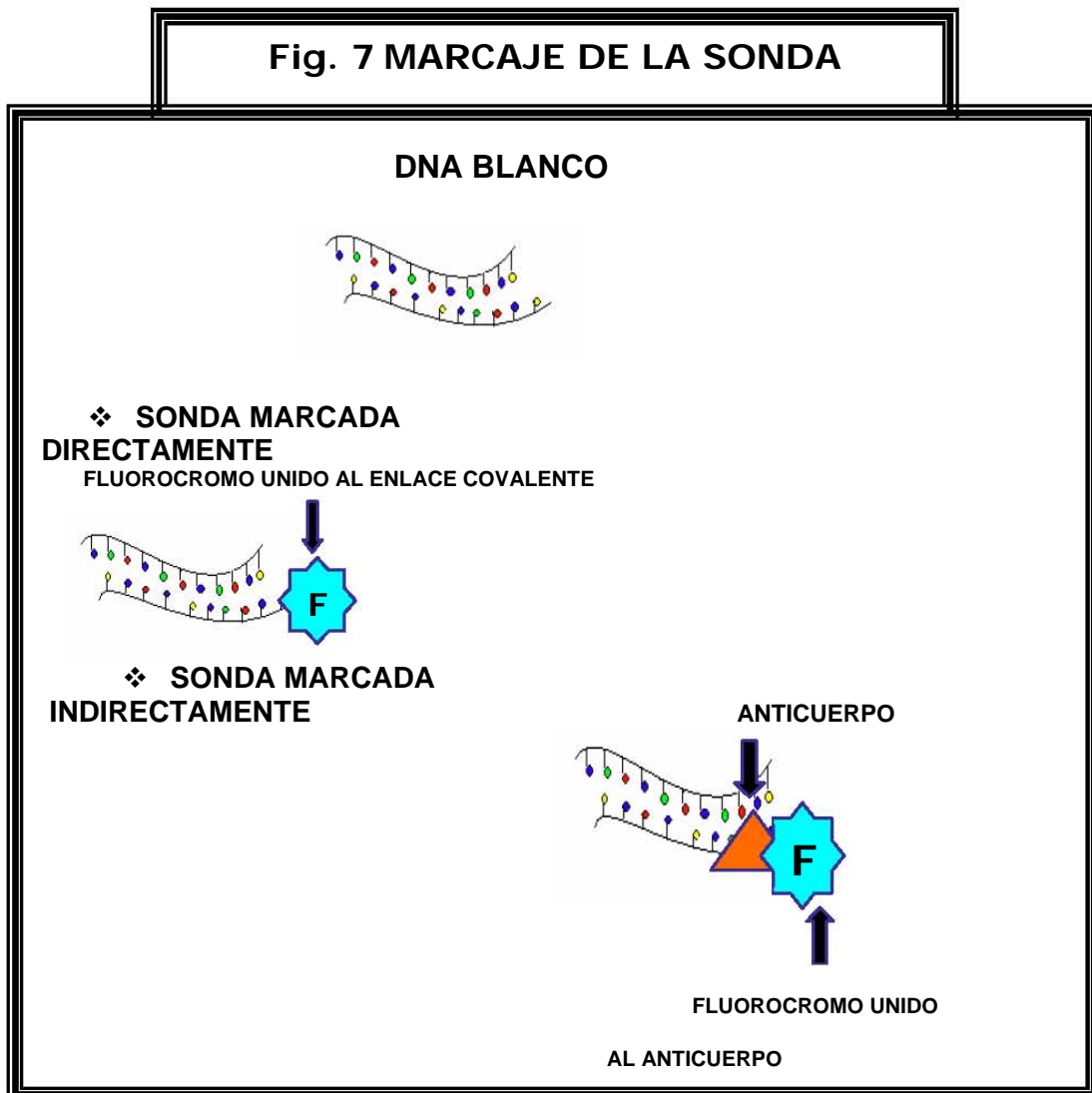
El DAPI se une con gran afinidad al surco menor del ADN, de 3 a 4 pb en secuencias A-T, permitiendo la identificación de cromosomas por bandeado (Pinkel, 1993; Schad y Dewald, 1995; Swiger y Tucker, 1996; Jackson, 2002; McDonald, 2002).

### **10.4 APLICACIONES Y VENTAJAS**

La principal aplicación es la caracterización de aberraciones cromosómicas, que facilita la identificación de dos o más cromosomas implicados en el rearrreglo, cuando se tienen marcadores cromosómicos de origen desconocido la FISH permite identificarlos y así precisar el diagnóstico citogenético, que en algunos casos tiene

implicaciones importantes, como ocurre con los marcadores de cromosomas sexuales. Los cromosomas pueden identificarse de manera rápida con sondas específicas para cromosoma completo o para centrómeros específicos.

La técnica de FISH tiene numerosas ventajas: a) Identifica alteraciones numéricas y estructurales en muestras con escaso material o de mala calidad, permite analizar células que se encuentran en cualquier fase del ciclo celular, b) Las sondas son específicas y pueden ser identificadas como señales fluorescentes en el núcleo o en la longitud del cromosoma, c) Es un método con alta especificidad y sensibilidad, d) Permite analizar del orden de cientos o miles de células en muestras donde hay poco material.



De esta manera, la técnica de FISH tiene una aplicación importante en aquellos casos, donde las alteraciones son muy pequeñas y pasan desapercibidas por citogenética tradicional, además, de que detecta múltiples alteraciones simultáneamente en una sola muestra utilizando diferentes fluorocromos, permitiendo obtener un diagnóstico más rápido y preciso (Jackson, 2002; McDonald, 2002).

## **11. RELACIÓN GENOTIPO/FENOTIPO**

Los recientes avances en biología molecular, han permitido identificar diferentes genes localizados en el cromosoma X, dando nuevo impulso a los trabajos que tratan de relacionar las diferentes alteraciones génicas con los distintos fenotipos del ST.

Existen varias teorías para explicar las consecuencias fenotípicas de la ausencia de uno de los cromosomas sexuales. La más simple, la haploinsuficiencia que nos dice que hay genes en el cromosoma X que escapan a la inactivación y que la dosis diploide (dos copias) de estos genes es necesaria para un desarrollo normal. La haploinsuficiencia es generalmente aceptada como explicación de los signos físicos del ST. Una segunda hipótesis se debe al imprinting genómico, es decir, que ciertos genes se expresarían, exclusivamente, en uno de los cromosomas de origen parental. En este caso, la pérdida del cromosoma X que contiene los alelos activados da por resultado una ausencia completa de los genes correspondientes. La hipótesis del imprinting genómico implica que el fenotipo 45,X, depende del origen parental del único cromosoma X presente; sin embargo, se ha visto que el fenotipo es el mismo independientemente del origen parental del cromosoma X (Tsezou y cols, 1999). Finalmente, efectos cromosómicos no específicos, más que la expresión reducida o ausente de genes específicos, se ha propuesto como explicación de la disgenesia gonadal en el ST.

Estudios realizados con numerosos marcadores en pacientes con pequeñas deleciones y alteraciones específicas del fenotipo Turner, han permitido relacionar determinadas alteraciones del ST con las regiones críticas y genes correspondientes. Así, se han definido regiones críticas que pueden explicar algunos aspectos del

fenotipo del ST. La identificación de regiones críticas del ST, utilizando los marcadores moleculares, simplifica el asesoramiento genético en las pacientes con deleciones parciales del cromosoma X, lo anterior otorga bases para la investigación sistematizada de microdeleciones asociadas con fenotipos específicos de ST y facilita la selección racional de genes candidatos para análisis mutacionales (Zinn y Ross, 2000).

## II. JUSTIFICACIÓN

Hoy día se tiene conocimiento amplio sobre los diversos tipos de cáncer, numerosas investigaciones han contribuido al entendimiento de los procesos de malignización en las células, determinando que fenómenos ocurren para esta transformación maligna, si embargo, se le ha dado más interés a aquellas neoplasias que tienen una mayor frecuencia en la población normal, como son el cáncer de mama, cáncer cérvico uterino, leucemias, cáncer de colon, etc., y restándole importancia a aquellas neoplasias que se presentan con menor frecuencia, pero sin embargo, son de interés clínico, un ejemplo de ello es cáncer gonadal (gonadoblastoma).

En el caso de las pacientes con Síndrome de Turner el riesgo de presentar esta neoplasia es mayor, como sabemos el ST es la anormalidad cromosómica más común en abortos espontáneos durante el primer trimestre de gestación, pero se ha observado que cuando los productos presentan algún tipo de mosaico la mortalidad es mucho menor, por lo tanto todos los productos con diagnóstico de ST y con complemento cromosómico 45,X realmente son mosaicos con una segunda línea celular, esta segunda línea celular puede presentar marcadores cromosómicos de origen no determinado, la identificación de su origen se dificulta por la falta de resolución de las técnicas citogenéticas, siendo de vital importancia su identificación, ya que, si provienen del cromosoma Y, la paciente tendrá un riesgo elevado de desarrollar gonadoblastoma.

Una herramienta útil para poder detectar oportunamente estos marcadores es la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), este estudio utiliza sondas fluorescentes específicas para los cromosoma (en este caso la sonda del gen *SRY* y centromérica del cromosoma X), permitiendo un análisis rápido, identificando oportunamente material cromosómico de origen desconocido en pacientes con Síndrome de Turner y poder diagnosticar a etapas tempranas el desarrollo de cáncer gonadal (gonadoblastoma) con el propósito de brindar una mejor atención para que la pacientes tengan una sobrevivida mayor, evitando el desarrollo de este tipo de cáncer por medio de la extirpación quirúrgica oportuna de las gónadas.

### **III. HIPÓTESIS**

La mayoría de las pacientes con Síndrome de Turner con una línea celular 45,X realmente son mosaicos no detectados por citogenética habitual, ya que necesitan de éste mosaico para poder sobrevivir.

Si en las pacientes con ST se detecta la presencia del gen *SRY*, en núcleos interfásicos de linfocitos de sangre periférica, por medio de la técnica de FISH, entonces tendrán un riesgo elevado de desarrollar cáncer en gónadas (gonadoblastoma).

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Detectar la presencia del gen *SRY* en aquellos pacientes con Síndrome de Turner con una línea celular (45,X) y marcadores cromosómicos de origen desconocido por medio de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), que acudieron al Servicio de Genética del Hospital Juárez de México y Centro Medico Nacional “20 de Noviembre” durante el periodo comprendido del año 2002 al 2004.

#### **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

- ❖ Realizar el diagnóstico clínico a pacientes que acudan a los Servicios de Genética y presenten características clínicas de Síndrome de Turner.
- ❖ Aplicación del estudio citogenético convencional a las pacientes que presentaron características clínicas de Síndrome de Turner.
- ❖ Aplicación de la técnica molecular (FISH) para la detección del gen *SRY* en pacientes con diagnóstico clínico y citogenético de Síndrome de Turner.
- ❖ Correlación de los resultados obtenidos del diagnóstico clínico, citogenético e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

## **VI. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Aquellos pacientes que a la valoración clínica presentaron características asociadas al Síndrome de Turner, y que acudieron al Servicio de Genética del Hospital Juárez de México y al Centro Medico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE, durante el periodo comprendido del año 2002 a 2004 (n=50).

## **VII. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

1. Pacientes que a la valoración clínica presentaron características asociadas al Síndrome de Turner.
2. Pacientes que a la realización del cariotipo estuvieron relacionadas con el Síndrome de Turner.
3. Presentaron una línea celular 45,X.
4. De cualquier edad.

## **VIII. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

1. Aquellos pacientes que presentaron cariotipo y fenotipo diferente al Síndrome de Turner.



## **IX. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se seleccionaron 50 pacientes entre 3 meses y 41 años de edad, con características fenotípicas de Síndrome de Turner, que acudieron al Servicio de Genética del Hospital Juárez de México y del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, a todas se les realizó valoración clínica, estudio citogenético (técnica convencional y con bandas GTG) y en todas aquellas pacientes que presentaron un complemento cromosómico 45,X y/o marcadores cromosómicos, se les realizó estudio molecular para la detección del gen SRY, utilizando la técnica de Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH).

### **1. ESTUDIO CITOGENÉTICO**

#### **1.1 CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

##### **1.1.1 SIEMBRA**

Con una jeringa heparinizada se extrajeron 5ml de sangre periférica por punción venosa, en condiciones estériles para cada muestra de sangre se prepararon 2 tubos cónicos (con la finalidad de tener una repetición de cada cultivo); 10ml de medio RPMI-1640 (Sigma Chemical CO. St. Louis), suplementado al 20% de suero fetal de ternera (SFT) (Sigma Chemical CO. St. Louis), 0.13 ml de antibióticos (estreptomina y penicilina).

A cada tubo se le agrego 1ml de sangre (8-15 gotas, sin aguja), 0.2ml de fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO, Invitrogen Corporation, USA). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 72 horas a 5% de CO<sub>2</sub>

##### **1.1.2 COSECHA**

A cada tubo se le agrego 0.1ml de colcemida ó 0.2ml de colchicina (Sigma Chemical CO. St. Louis) (1mg/10ml de H<sub>2</sub>O) y se dejo incubar a 37 °C por 20 minutos, transcurrido el tiempo se centrifugo la muestra a 1500 rpm durante 5’.

Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 6ml de solución hipotónica de cloruro de potasio (KCl 0.075M Merck, México) previamente calentada a 37 °C y se resuspendió el paquete celular, se resuspendió nuevamente y se incubó por 8-10 minutos a 37 °C. Se adicionaron 3ml de fijador de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) frío, se resuspendió y se centrifugó a 1500 rpm durante 5'.

Se desecharon el sobrenadante, se agregó fijador y se volvió a centrifugar; éste paso se repitió hasta que el botón o pastilla quedara de coloración blanca.

Las pastillas o botones se mantendrán en refrigeración y se guardaran con la finalidad de tener muestra para la aclaración de cualquier duda que se tenga con respecto al resultado obtenido anteriormente.

## **1.2 PREPARACIÓN DE LAMINILLAS**

Para hacer las preparaciones, se eliminó el sobrenadante dejando solo aproximadamente 0.5 ml de fijador. Se resuspendió el paquete celular y se dejaron caer 2 o 3 gotas sobre la laminilla, se dejaron secar y posteriormente se analizaron en un microscopio de contraste de fases para monitorear el índice mitótico (OLYMPUS CH2).

## **1.3 PROCEDIMIENTO TÉCNICA DE BANDAS (GTG)**

Se dejaron las laminillas deshidratar a 60° C en estufa durante 48-78hrs.

Se trataron las laminillas con NaCl al 0.9% durante 1 min.

Posteriormente se colocaron en la solución de tripsina durante 1 ó 2 min, éste tiempo varía según las condiciones.

Se enjuagaron las laminillas en agua destilada.

Se introdujeron en solución Wright (1:1) durante 2 ó 5 segundos.

Se enjuagaron las laminillas nuevamente.

Se tiñeron en solución de Giemsa de 3 a 4 minutos y se volvió a enjuagar

## **2. ANÁLISIS**

Se analizaron las laminillas por bandas GTG, 25 metafases para cada caso, aquellos que presentaron alguna alteración (numérica y/o estructural) se observaron de 50 hasta 100 metafases, los cariotipos se reportarán según el Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana (ISCN, 1995), y se tomaron las microfotografías de casos especiales y/o de las mejores metafases y se procedió a armar el cariotipo.

## **3. TOMA DE FOTOGRAFÍAS**

### **3.1 REVELADO DE PELÍCULA**

Revelar con 300-500ml de revelador KODAK para película blanco y negro (2:1) durante tres minutos se agito vigorosamente, se retiro el revelador y se lavo con agua corriente, posteriormente se coloco 500 ml de fijador (KODAK blanco y negro) se agito y se enjuago la película, se dejo secar y se procedió a la impresión de la película.

Nota: cuidando de no exponerse a la luz

### **3.2 IMPRESIÓN DE PELÍCULA**

Se eligió la mejor toma de fotografía y se imprimió en papel, colocando los reactivos en cuatro recipientes, en el primero se colocará el revelador (KODAK), después detenedor (Ac. acético-agua), fijador (KODAK) y por último agua, ya impresas las fotografías en papel se dejaron secar y se procedió a armar los cariotipos.

Teniendo los resultados de los estudios citogenéticos, todas aquellas pacientes que presentaron un complemento cromosómico 45,X se procedió a la realización de la FISH.

## **4. HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)**

### **4.1 PREPARACIÓN DE LAMINILLAS**

Se siguió el procedimiento de cultivo, siembra y preparación de laminillas de linfocitos en sangre periférica, posteriormente se guardaron en condiciones de congelación para su posterior estudio.

### **4.2 PRETRATAMIENTO**

Se sumergieron las laminillas en un vaso de copplin que contenía la solución 2 X SSC (pH 7) a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente en vasos de copplin que contenían etanol al 70%, 80% y 100% durante 2 minutos en cada uno.

(2xSSC= solución de citrato de sodio 1:10)

### **4.3 DESNATURALIZACIÓN**

Se sumergieron las laminillas en un vaso de copplin que contenía la solución desnaturizadora (formamida al 70%/ solución 2X SSC (pH 7)) a  $73 \pm 1$  °C, durante 2 minutos, se deshidrataron en etanol frío (-20°C) a 70%, 80% y 100%, durante 1 minuto en cada uno.

### **4.4 HIBRIDACIÓN**

Se agregaran 10 µl de sonda (sonda LSI *SRY* espectro orange y sonda *CEPX* espectro green) por un área de 22x22 mm., se le colocó un cubre objetos y se sellaron los extremos con Rubber cement se incubó a 37 °C durante toda la noche en una cámara húmeda y sin luz.

### **4.5 LAVADOS POST-HIBRIDACIÓN**

Se removió el Rubber cement y el cubre objetos con un palillo de madera e inmediatamente se sumergió en solución 0.4 X SSC/ 0.3% NP-40 a  $73 \pm 1$ °C y se incubó por 2 minutos.

Posteriormente se introdujo en solución 2XSSC/0.1% de NP-40 durante 1 minuto a temperatura ambiente y se agito el vaso durante 30 segundos, todo ello se llevo a cabo en condiciones de oscuridad.

Se aplicaron 3-4µl de DAPI II (4',6-diamidino-2-fenilindol), se coloco un cubre objetos y se sellaron los extremos.

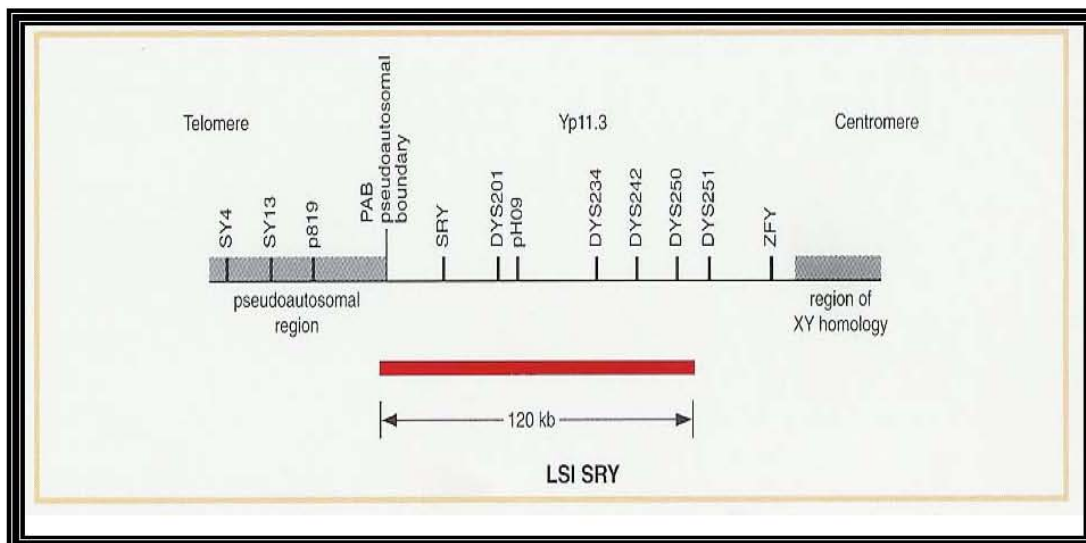
Se almacenaron las laminillas a -20°C en condiciones de oscuridad, para análisis posteriores.

(NOTA: ver anexo para la preparación de los reactivos de análisis citogenético, fotografía y FISH).

## 5. PREPARACIÓN DE LA SONDA

Las sondas de hibridación de DNA que se utilizaron fueron las del gen *SRY* (LSI *SRY* DNA FISH) marcada espectro Orange en aproximadamente 120 kb, mezclada con la sonda centromérica del cromosoma X (CEP X) espectro Green, ambas de la marca comercial Vysis Inc. Co. (Fig. 8).

**Fig. 8 MARCAJE DE LA SONDA LSI SRY PARA FISH**



(TOMADO DE VYSIS PRODUCT CATALOG, 2004).

Antes de la preparación se hibrida la sonda a 37°C durante 5 minutos

- ❖ 7µl de solución de hibridación.
- ❖ 1µl de la sonda a utilizar (sonda del gen *SRY* espectro orange y sonda centromérica del cromosoma X espectro green)
- ❖ 2µl de H<sub>2</sub>O estéril

## 6. ANÁLISIS DE HIBRIDACIÓN

El análisis se llevo a cabo en un microscopio de fluorescencia (BH2, OLYMPUS) de tres filtros (green, orange, aqua), donde se analizaron por lo menos 100 núcleos, tomando en cuenta los siguientes criterios:

- 1.- La célula analizada debió de ser visible completamente y no debe de estar sobrelapada.
- 2.- El borde de la célula debe de estar intacto.
- 3.- Las señales deben de estar dentro de la célula.
- 4.- La célula analizada debe de estar en un área donde el 90% de las células muestren señales claras.
- 5.- Las señales deben de ser del mismo tamaño, intensidad, separadas al menos por la mitad o por un diámetro de señal.

## 7. TOMA DE IMÁGENES

Las imágenes fueron capturadas usando un microscopio Olympus BX60 applied Imaging con los filtros orange, green, aqua, gold, DAPI, F-red, green-orange, DAPI-green-orange.

## 8. CONTROLES

Para determinar el valor de corte o basal del gen *SRY* en sangre periférica se realizó el estudio en cinco donadores sanos del sexo femenino y un donador masculino. Se analizaron 1000 núcleos por donador (6000 núcleos en total) y se aplicó la siguiente fórmula estadística para determinar el valor de corte o basal en controles.

$$VB = (\text{media de células alteradas} + (3SD))100.$$

SD= desviación estándar

Obteniendo de la fórmula un valor de corte o basal de **0%**

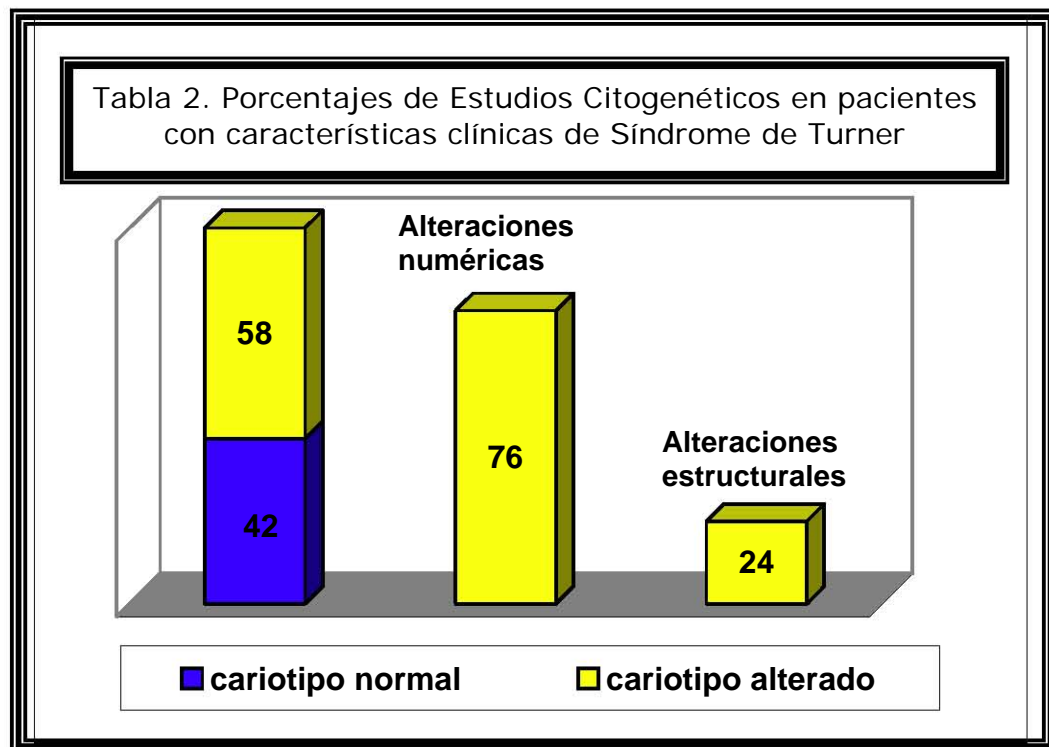
## X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Se captaron 50 pacientes que acudieron al Servicio de Genética del Hospital Juárez de México y Centro Medico Nacional "20 de Noviembre", todas cumplían con los criterios de inclusión, presentando un rango de edad de 3 meses a 41 años, con una media de 18 años, la mayoría de las pacientes se encontraban entre los 10 y 20 años (36%) y solo una paciente tenía 41 años.

### 2. ANÁLISIS CITOGENÉTICO

A todos los pacientes se les realizó estudio citogenético por medio de bandas GTG analizando 25 metafases en cada caso, mostrando que 21/50 pacientes (42%), presentaron un cariotipo normal, el 58% restante correspondió a alguna alteración de tipo estructural o numérica (Tabla 2).





## 2.1 ALTERACIONES ESTRUCTURALES

Dentro de las alteraciones estructurales que tuvieron una menor incidencia (6/29-24%), un paciente presentó isocromosoma de brazos largos del cromosoma X, otro presento delección del cromosoma X y cuatro presentaron mosaicos (tabla 3).

**TABLA 3. ALTERACIONES ESTRUCTURALES**

No. de Casos	Edad Promedio	Cariotipo
1	26	46,X,i(X)(q10)[25]
1	22	46,XX,del X(q21.3)[25]
4	12	45,X[85]/46,X,i(X)(q10)[15]

Una paciente de 26 años presento isocromosoma de brazos largos del cromosoma X y cuatro casos presentaron mosaico con una edad promedio de 12 años. El isocromosoma del X se presenta como una de las anormalidades más frecuentes en el ST, la peculiaridad de estas pacientes es que presentan características fenotípicas similares a las pacientes 45,X, como lo es baja estatura y disgenesia gonadal.

Por lo que respecta a la paciente con delección del brazo largo 46,X,del X(q21.3), ésta presentó rasgos clínicos menos severos y amenorrea, ya que los genes candidatos para el desarrollo ovárico se encuentran presentes en esta zona alterada, su estatura es superior a las pacientes que presentaron monosomía del X, pero tampoco es normal, se deduce que la estatura resulta menos afectada por los genes de Xq que por los genes de Xp (Boucher y cols, 2001).

En comparación con la incidencia de características somáticas de las pacientes 45,X y aquellas que presentan estigmas Turner menos severos, es que estos por lo general al presentar delecciones parciales en el cromosoma X, su fenotipo se ve menos afectado lo que ha llevado a proponer varias hipótesis, sugiriendo que existen genes que juegan un papel importante en la determinación de las características somáticas de éste síndrome, involucrando las regiones terminales del cromosoma X, lo que permite observar una amplia variación en el fenotipo (Boucher y cols, 2001).

## 2.2 ALTERACIONES NUMÉRICAS

Dentro de las alteraciones cromosómicas, las numéricas fueron las que tuvieron mayor incidencia (23/29-76%) (Tabla 4).

De las pacientes que presentaron alteraciones numéricas, 12 tenían un complemento cromosómico 45,X (53%) con una edad promedio de 19 años; 8 pacientes con una línea celular normal y otra característica del S. Turner que correspondió al 34%, y tres pacientes (13%) con marcadores cromosómicos de origen desconocido que por técnicas convencionales de citogenética no pudieron ser diagnosticados; cabe mencionar que dos de estas pacientes tenían una edad inferior al un año, por lo que es importante poder diagnosticar el origen de este marcador en etapas tempranas para poder brindar un tratamiento más adecuado, estos resultados se encuentran semejantes a los reportados en la literatura (Guizar, 2001).

**TABLA 4. ALTERACIONES NUMÉRICAS**

No. de Casos	Edad promedio	Cariotipo
12	19	45,X [25]
1	32	45,X[71]/46,XX[29]
7	29	45,X[15]/ 46,XX[35]
1	5/12	45,X[76]/46,X,+mar[24]
1	9/12	45,X[36]/45,X,+mar[64]
1	13	46,XX [96]/46,X,+mar[4]

El complemento cromosómico 45,X, (53%) se encuentra entre las pacientes con rasgos clínicos más severos, presentaron cuello alado, cubitus valgus, disgnesia gonadal y talla baja; solo el 3% presentan menstruación y un 5% desarrollo sexual (fig. 9) (De la Chapelle, 1990; López, 2003).

De ellas 12 presentaron monosomía, observándose una amplia variación fenotípica, en 1990 De la Chapelle, estableció que estas variaciones en el fenotipo permiten en algunos casos tener descendencia; esto no es raro, ya que se conoce que desde el 3º mes de vida embrionaria el desarrollo ovárico puede ser normal, incluyendo la presencia de células gonadales numerosas y bien organizadas, no obstante, estas

células en su mayoría presentan atresia antes del crecimiento, de forma que al nacer no es raro que una paciente 45,X, tenga más de un 10% de ovocitos. Esta atresia continúa, de forma que en la pubertad la mayoría de las mujeres 45,X presentan estrías gonadales (López, 2003).

Por otra parte, observamos que el 34% de los casos presentaron mosaicismo 45,X/46,XX, con este tipo de alteración las pacientes que manifestaron menos anomalías que los casos 45,X, se sabe que las pacientes que presentan este tipo de mosaicismo 12% de ellas menstrúan, a diferencia del 3% de los casos 45,X y solo el 18% tienen desarrollo mamario frente a un 5% de las mujeres 45,X, también se refiere que la talla es generalmente superior.

El 13% restante de los resultados obtenidos corresponde a aquellos cariotipos en mosaico, donde una línea celular es característica del ST y la otra presenta un marcador cromosómico (un fragmento cromosómico de origen desconocido) (fig. 10). Los marcadores cromosómicos nos indican la presencia de un cromosoma anormal que no puede ser diagnosticado, la existencia de este marcador a través del ciclo celular se debe a la presencia del centrómero, por lo que se sigue segregando en las divisiones subsecuentes, este tipo de marcadores en muchas ocasiones no pueden ser identificados por técnicas de citogenética (ISCN, 1995).

La frecuencia prenatal de marcadores cromosómicos supernumerarios de *novo* han sido estimados en aproximadamente 1 en 2500 (Jackson, 2002; López S, 2003). Debido a que se desconoce el origen de estos marcadores fue necesario auxiliarnos de pruebas moleculares, como la FISH, ya que si estos marcadores derivan del cromosoma Y elevan el riesgo para desarrollar cáncer gonadal.



# HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

## LABORATORIO DE GENÉTICA INVESTIGACIÓN

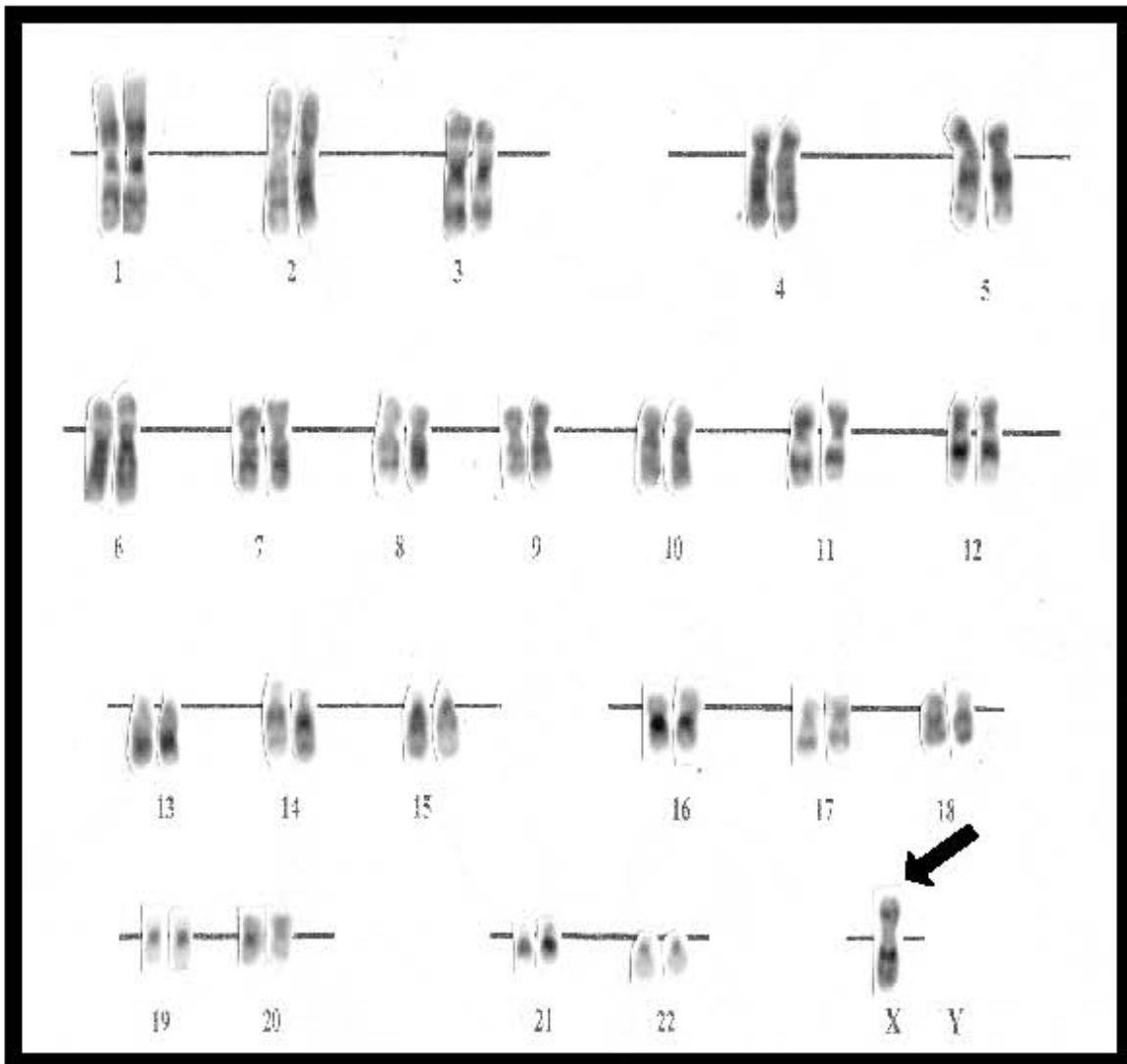


CARIOTIPO EN:

- XX SANGRE
- PERIFÉRICA
- MÉDULA ÓSEA
- PIEL
- OTROS

NOMBRE : González Fragoso Brigitt  
No. CASO : 19  
No. DE EXP: 549028  
DIAGNÓSTICO: 46,X (25)

Fig. 9





# HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

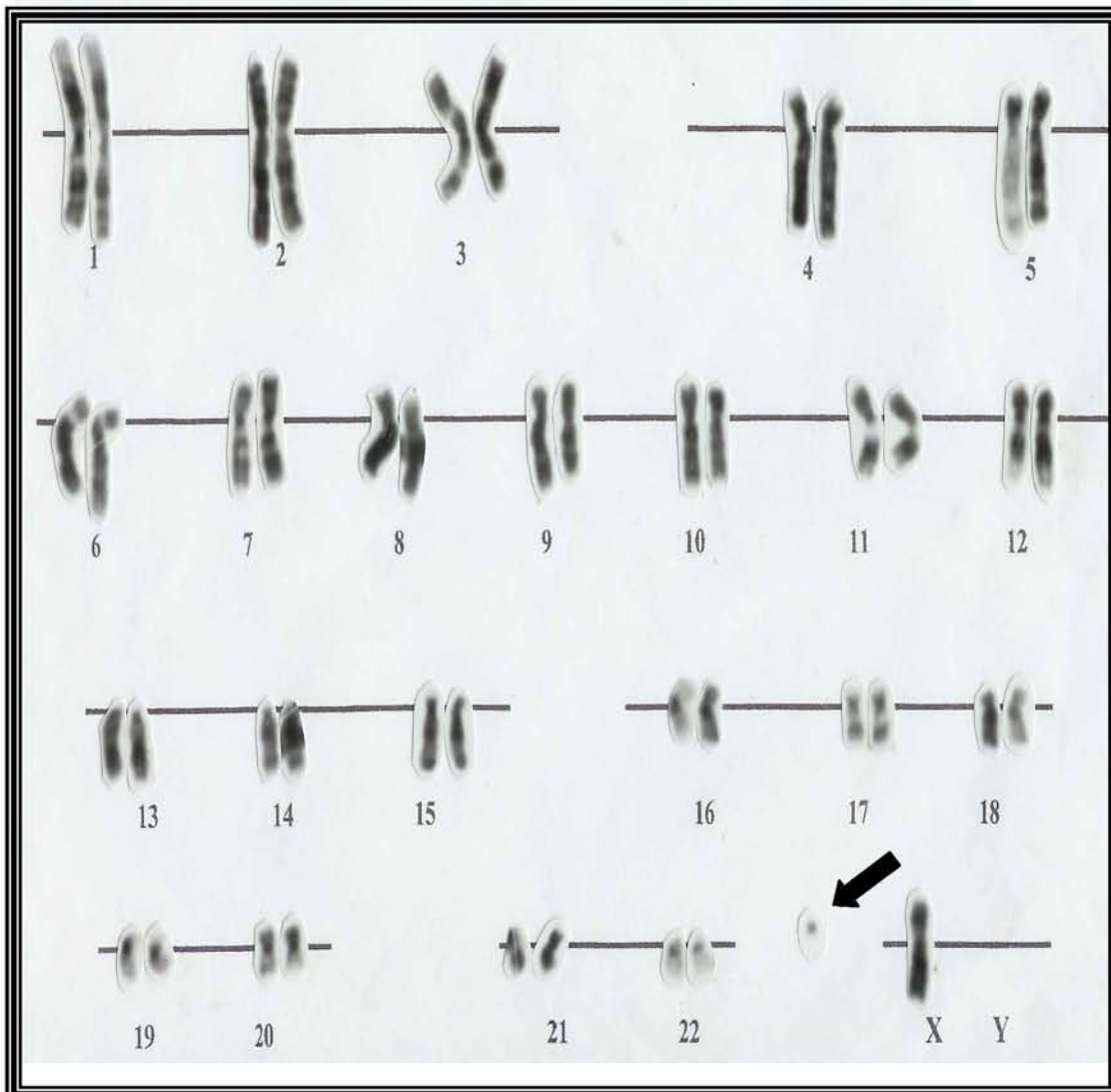
## LABORATORIO DE GENÉTICA INVESTIGACIÓN



### CARIOTIPO EN:

<input checked="" type="checkbox"/> SANGRE	<b>NOMBRE :</b>	Rodríguez Lozano Itzel Alejandra
<input type="checkbox"/> PERIFÉRICA	<b>No. CASO :</b>	50
<input type="checkbox"/> MÉDULA ÓSEA	<b>No. DE EXP:</b>	549028
<input type="checkbox"/> PIEL	<b>DIAGNÓSTICO:</b>	46, XX [ 96]/ 46,X+mar [4]
<input type="checkbox"/> OTROS		

Fig. 10



### 2.3 CARIOTIPOS NORMALES

En el caso de cariotipos normales es importante mencionar que las pacientes presentaban cuadro clínico del Síndrome de Turner, este fenotipo también lo presentan los pacientes con Síndrome de Noonan, por lo que la paciente Turner es tan semejante a la Noonan que pueden ser indistinguibles, también cabe mencionar que este tipo de Síndrome se presenta en el sexo masculino (Noonan, 1963; Van de Burgt y cols, 1993; Noonan, 1994).

Los pacientes afectados de uno u otro sexo, han recibido varias denominaciones: fenotipo Turner con cromosomas normales, XY con fenotipo Turner (varones), XX con fenotipo Turner (mujeres), síndrome de Ullrich, fenotipo de Turner familiar, síndrome seudoturner y síndrome de Noonan.

Entre las anomalías más comunes figuran: talla baja, pterigium colli, pectus carinatum o pectus excavatum y cúbito valgo, hipertelorismo, epicantus y hendidura palpebral antimongoloide, ptosis, micrognatia y anomalías de los pabellones auriculares, asociadas con menor frecuencia a lesiones vertebrales. Presentan el tórax excavado y criptorquidismo (Noonan, 1994).

A menudo se observan malformaciones cardiovasculares y estenosis pulmonar, esta última generalmente con una válvula displásica, que constituye el trastorno característico de dicho síndrome. Los varones suelen tener criptorquidia y testículos pequeños, (hipogonadales o no) (Guizar, 2001).

Al considerar el cuadro clínico es importante distinguir que pacientes presentan Síndrome de Turner y quienes presentan Síndrome de Noonan, por lo que en estos casos es necesario aplicar cariotipo para descartar cualquier paciente que presente cuadro clínico semejante al Síndrome de Turner pero con cariotipo normal.

### 3. HIBRIDACIÓN *in situ* CON FLUORESCENCIA

Para determinar los valores de corte o basales en células normales, se estudiaron cinco donadores sanos del sexo femenino (fig. 11) y un donador masculino (fig. 11),

este último se hizo con la finalidad de observar que el gen *SRY* fuera marcado correctamente, confirmando su presencia en el paciente.

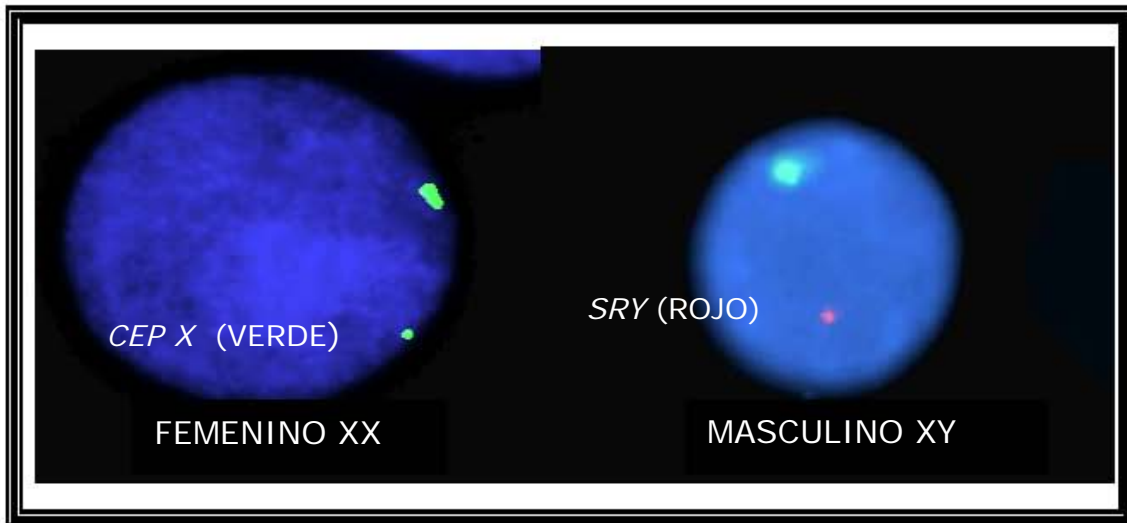
Se analizaron 1000 núcleos para cada donador. En la tabla 5 se muestra el resultado obtenido de la FISH con las dos sondas aplicadas (*SRY* y centromérica del X).

**TABLA 5. CONTROLES**

No. Casos	Edad/sexo	Cariotipo	% SONDA <i>SRY</i> (ROJA)	% SONDA CEP X (VERDE)
5	23/fem	46,XX[25]	0	100
1	28/mas	46,XY[25]	100	100

El resultado del valor de corte o basal obtenido para estos casos, tuvo un valor de 0% para la sonda *SRY* en el caso de los controles femeninos y del 100% en el control masculino, lo cual confirma que la sonda fue marcada correctamente.

**Fig. 11 FISH EN INTERFASE, CONTROL FEMENINO XX (VERDE) Y MASCULINO XY (ROJO)**



De acuerdo a los análisis citogenéticos, se observaron que 12 pacientes presentaron complemento cromosómico 45,X y tres un marcador cromosómico de origen desconocido, a todos ellos se les aplicó la técnica de Hibridación *in situ* con Fluorescencia, para poder determinar la presencia de mosaicos con bajo porcentaje, derivados del cromosoma Y mediante la detección del gen *SRY*.

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de la FISH en las pacientes con complemento cromosómico 45,X y con un marcador de origen desconocido, en cada caso se analizaron 1000 núcleos.

**TABLA 6. RESULTADOS FISH**

No. Caso	Edad	Cariotipo	%SONDA SRY(ROJA)	% SONDA CEP X (VERDE)
6	16	45,X[25]	0	100
9	15	45,X[25]	0	100
10	19	45,X[25]	0	100
12	19	45,X[25]	0	100
<b>17</b>	<b>18</b>	<b>45,X[25]</b>	<b>*0.3</b>	<b>99.7</b>
18	24	45,X[25]	0	100
19	18	45,X[25]	0	100
<b>20</b>	<b>15</b>	<b>45,X[25]</b>	<b>*0.7</b>	<b>99.3</b>
22	14	45,X[25]	0	100
23	9/12	45,X[36]/45,X+mar[64]	0	100
24	41	45,X[25]	0	100
30	3/12	45,X[25]	0	100
35	9	45,X[25]	0	100
38	5/12	45,X[76]/46,X+mar [24]	0	100
<b>50</b>	<b>13</b>	<b>46,XX[96] /46,X+mar[4]</b>	<b>**10.7</b>	<b>89.3</b>

**VB= 0%**, \* mayor que el valor basal, \*\* valor clínicamente significativo

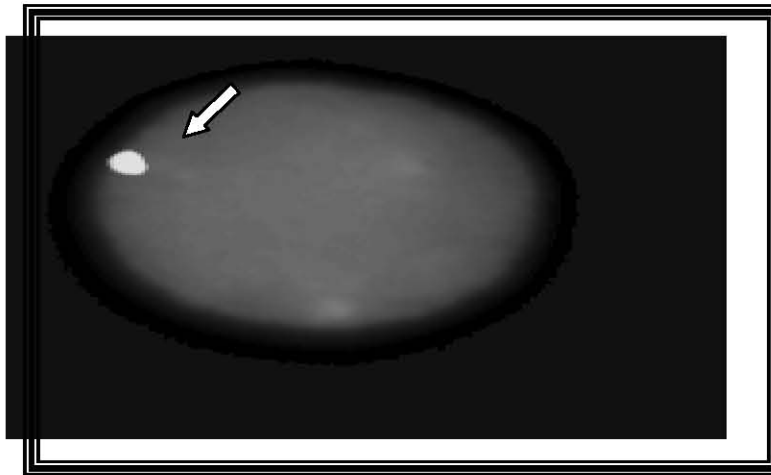
De acuerdo con este análisis se observó que 10 pacientes presentaban monosomía del cromosoma X (fig. 12 y 13), cabe mencionar que las muestras fueron tomadas de sangre periférica, estudios semejantes a éste llevados a cabo por Reddy y cols. en 1998, sugieren que el tejido hematopoyético es de origen mesodérmico lo que demuestra que al comparar diferentes tejidos como son células germinales y otros,



pueden existir variaciones en los niveles de mosaicos, debido a lo anterior en este estudio solo se observó una línea celular donde no existía un mosaico de bajo porcentaje, el cual es necesario para la supervivencia (Reddy y Sulcova, 1998).

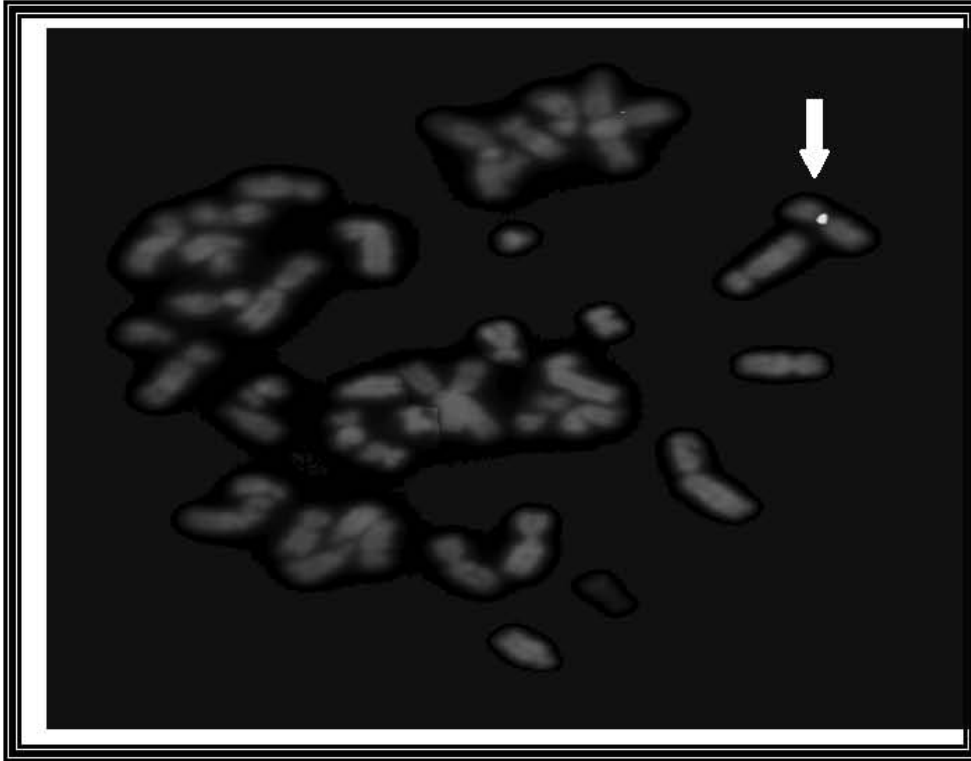
Held y cols sugieren que el mosaicismo en el ST es un prerrequisito para su supervivencia, en sus resultados muestran que en uno de sus pacientes solo 2 de 500 células presentaron material derivado del cromosoma Y demostrando que algunos pacientes quienes aparentemente son 45,X, una segunda línea celular puede estar presente en muy pequeña proporción; como conclusión a sus resultados Held y cols sugieren que el mosaicismo puede ser distribuido desigualmente entre diferentes tejidos en el mismo individuo (Held y cols 1992).

**Fig. 12. NÚCLEO INTERFÁSICO CON MONOSOMÍA DEL CROMOSOMA X.**



\*Sonda centromérica del cromosoma X (CEP X),

**Fig. 13. METAFASE CON MONOSOMÍA  
DEL CROMOSOMA X.**



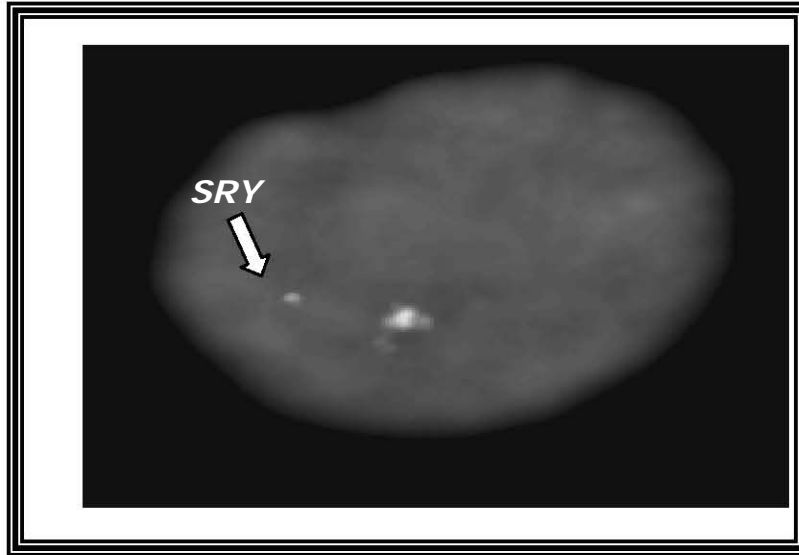
\*Sonda centromérica del cromosoma X (CEP X), espectro verde

Por otra parte, en dos pacientes que presentaron un complemento 45,X, por estudio citogenético (caso 17 y 20), se detectaron secuencias del gen *SRY* y en los tres pacientes con marcadores de origen desconocido se observó que dos de ellos (caso 23 y 38) provenían del cromosoma X y uno (caso 50) tuvo su origen en el cromosoma Y.

En el caso 17 una paciente de 18 años que a la valoración clínica presentó características de Síndrome de Turner y a la realización del estudio citogenético se observó un cariotipo 45,X, se procedió a la realización de la FISH para detectar secuencias del cromosoma Y, observando que en el 0.3% de sus células presentaba secuencias del gen *SRY* (fig. 14).

Aunque el porcentaje de secuencias del cromosoma Y es bajo, este valor está por arriba del VB.

**Fig. 14. FISH EN INTERFASE, PACIENTE CON SRY**



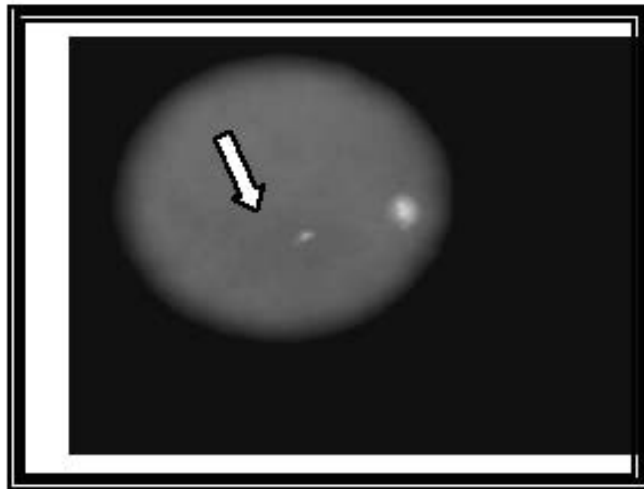
\*Caso 17, Sonda SRY espectro rojo y CEPX espectro verde

En el caso 20 una paciente de 15 años, la cual a la realización de la FISH observamos que en el 0.7% de sus células presentaron secuencias del gen *SRY* (Fig. 15).

Medlej y cols en 1992, realizaron estudios semejantes al nuestro, analizaron en 40 pacientes con ST (37 con cariotipo 45,X y 3 con 45X/46XX), la posible presencia del gen *SRY* y sólo encontraron positivo en un caso, de igual manera Binder y cols, estudiaron a 53 niñas con ST, estudiando la presencia de marcadores del cromosoma Y y solo encontraron positivo en dos casos. Gravholt y cols en 2000, examinaron 114 mujeres con ST en busca de material del cromosoma Y, encontrando positivos en 14 pacientes (12.2%). Analizando los resultados anteriores observamos que la frecuencia de gonadoblastoma en estos estudios es baja ( $\approx 7-10\%$ ), estos autores consideran que el riesgo ha podido ser sobreestimado en estudios previos, quizá debido a una selección inadecuada de pacientes o al tipo de tejido que se utilizó en los estudios.

Tanto en el caso 17 como en el 20, el porcentaje se encuentra por arriba del VB y el bajo porcentaje de células en presencia del gen *SRY* es debido, como se menciono anteriormente al tipo de muestra, por lo que en estas pacientes es recomendable la realización de estudios a partir de una biopsia de gónada, ya que este tipo de estudios nos permitirá determinar de manera más exacta el porcentaje del gen y por lo tanto poder prevenir la malignización gonadal.

**Fig. 15. FISH EN INTERFASE, PACIENTE CON SECUENCIAS DEL GEN *SRY***



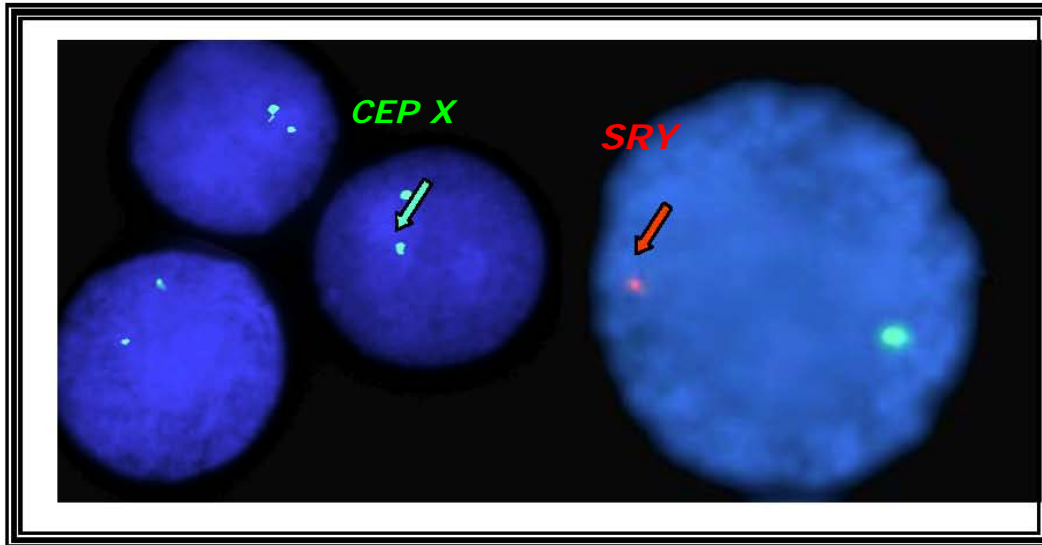
\*Caso 20, espectro verde *CEPX*, espectro

En el caso 50 una paciente de 13 años que a la valoración clínica presentó características clínicas de Síndrome de Turner y por análisis citogenético se observo la presencia de dos líneas celulares, una línea normal (46,XX) y la otra con un marcador cromosómico (46,X+mar), a la realización de la FISH observamos que en el 10.7% de sus células presentaba secuencias del cromosoma Y mediante la detección del gen *SRY*, es decir, que el marcador que por citogenética se desconocía su origen, provenía del cromosoma Y (Fig. 16).

La frecuencia de características de ST en pacientes con anomalías del cromosoma Y está relacionado con la coexistencia de una línea celular 45,X (Hsu L, 1999). En una serie de 82 pacientes, se presentaba la talla baja como única característica del ST,

13 de ellos tuvieron un mosaico con una línea celular con un cromosoma Y isodicéntrico. Sin embargo, Giltay y cols en 2001, informaron de un paciente similar en quién se encontró gonadoblastoma.

**Fig. 16. FISH EN INTERFASE, PACIENTE CON SRY POSITIVO**



\*Caso 50, paciente con dos líneas celulares, *CEPX* espectro verde, *SRY* espectro rojo.

Sabemos que el brazo corto del cromosoma Y contiene el gen para iniciar la diferenciación testicular conocida como región determinante del sexo del cromosoma Y (*SRY*) (Giltay, 2001). Una anomalía en el brazo corto del cromosoma Y daría lugar a la presencia de estrías gonadales o disgenesia testicular; ya que no se produciría el organizador testicular y los genitales internos y externos serían ambiguos, pues las secreciones del factor inhibidor de Müller y de testosterona estarían alterados por los testículos anormales, es decir, con la pérdida del brazo corto del cromosoma Y no se forman los testículos y por eso se desarrolla un fenotipo femenino.

La pérdida parcial del cromosoma X en algunas células (X0/XY) produciría disgenesia gonadal mixta, la que daría lugar a una de estas variantes: un testículo inmaduro de un lado y una gónada rudimentaria del otro; agenesia gonadal unilateral; gónadas hipoplásicas bilaterales intrabdominales con elementos rudimentarios

testiculares en una de ellas o gonadoblastoma unilateral o bilateral (Hughes y cols, 1999). Por la posibilidad tan alta de malignización de la gónada disgenética, es que se hace necesario el correcto y temprano diagnóstico, para evitar la posibilidad de que se transformen en gonadoblastoma (Abeliovich y cols, 1994; Lau, 1999). Lieppe en 1996, realizó estudios en 205 pacientes con diagnóstico de síndrome de Turner encontrando uno solo con fórmula cromosómica 45,X/46,X+mar, este marcador provenía del cromosoma Y, en el que al extirpársele la gónada se diagnosticó gonadoblastoma (Lieppe, 1996). Un paciente con fenotipo turner y fórmula cromosómica similar a la de nuestra paciente fue informado por Hashimoto y cols en 1997, este paciente también presentó secuencias del cromosoma Y, diagnosticando oportunamente el desarrollo de un cáncer gonadal.

Aunque la frecuencia de gonadoblastoma es baja en pacientes con fenotipo y cariotipo de ST, varios autores recomiendan la búsqueda de material del cromosoma Y en aquellos que presenten signos de virilización (Hashimoto y cols, 1997; Hughes y cols, 1999).

## XI. CORRELACIÓN

Sabemos hoy día que el ST es considerado como la anomalía cromosómica más común en abortos espontáneos durante el primer trimestre de gestación (99%), sin embargo, existen productos 45,X que llegan a término, que corresponden al 1% de todas las concepciones, son realmente mosaicos con una segunda línea celular que por técnicas citogenéticas habituales no se detecta, cuando en esta línea celular se encuentra involucrado el cromosoma Y, las pacientes tienen un elevado riesgo de desarrollar cáncer gonadal (gonadoblastoma).

Al correlacionar los resultados obtenidos del análisis por citogenética convencional y de la FISH de los 50 pacientes, se observó lo siguiente: a) 21 (42%) pacientes presentaron un cariotipo normal; b) 29 (58%) presentaron alteraciones de tipo estructural o numérica; donde c) 6 (24%) con alteraciones estructurales; d) 23 (76%) con alteraciones numéricas; donde e) 12 (41%) pacientes presentaron monosomía 45,X y f) 3 (10%) pacientes presentaron marcadores cromosómicos.

La citogenética convencional no detectó el origen de mosaicos de bajo porcentaje en las pacientes con cariotipo 45,X y/o marcadores, el estudio de FISH con las sondas *SRY* y *CEPX* identificó en 3 pacientes 45,X secuencias del cromosoma Y y en 2 pacientes con marcadores secuencias del cromosoma X. Al reunir los datos de ambos estudios, se encontró que solo 10/15 pacientes presentaron monosomía 45,X, aunque no podemos descartar que estas pacientes puedan presentar algún mosaico en otro tejido, ya que se ha observado que en muestras de gónada se eleva el porcentaje de mosaicos no detectados en sangre periférica, pero debido a que es difícil la toma de muestra en gónada es que realiza en sangre periférica, por ello nuestro trabajo toma en cuenta cualquier porcentaje de mosaicismo como diagnóstico de riesgo para desarrollar gonadoblastoma.

Al aplicar la citogenética convencional nos damos cuenta de que sigue siendo una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico en este tipo de pacientes, ya que ofrece ventajas con respecto a otras metodologías, permitiendo el análisis completo de todos los cromosomas y además de tener un bajo costo. No obstante, a pesar de que es una de las técnicas de mayor importancia, puede omitir alteraciones

importantes que serían necesarias para otorgar un diagnóstico más preciso, como lo son deleciones a nivel de gen y mosaicos en bajo porcentaje.

La técnica de FISH, además de ser una metodología relativamente rápida ofrece muchas ventajas sobre la citogenética ya que, puede ser usada en células en metafase para detectar microdeleciones específicas, más allá de la resolución de la citogenética de rutina o para identificar material extra de origen desconocido. Puede también, ser de ayuda en casos donde es difícil determinar mediante la citogenética de rutina si un cromosoma tiene una deleción simple o está implicado en una reorganización.

La FISH también puede ser usada en células en interfase para determinar el número de copias de uno o varios cromosomas, así como para la detección de algunas traslocaciones. La ventaja principal de llevar a cabo la FISH en núcleos en interfase es porque, es fácil y rápida de realizar, aproximadamente en 24 horas ya que no se requiere crecimiento celular.

De esta manera, el empleo de ambas metodologías nos permite complementar un diagnóstico de forma precisa y oportuna.



## XII. CONCLUSIONES

- La frecuencia de los diferentes tipos de alteraciones cromosómicas obtenidos en este trabajo se encuentra dentro de los intervalos referidos tanto para las alteraciones numéricas como para las estructurales.
- Las pacientes que presentaron cariotipo normal a pesar del cuadro clínico tan semejante al Síndrome de Turner, es conveniente hacer un diagnóstico diferencial con otros síndromes o bien descartar genes involucrados que puedan dar las mismas características.
- El método de la FISH es una herramienta útil, ya que permitió identificar alteraciones cromosómicas en pacientes que por citogenética no se observaron o eran desconocidas.
- Las pacientes que por análisis citogenético y FISH seguían presentando monosomía del cromosoma X en sangre periférica, es importante considerar que los resultados son variables de acuerdo al tipo de tejido.
- Las pacientes que presentaron secuencias del cromosoma Y se les recomienda la extirpación quirúrgica de las gonadas, ya que tienen elevado riesgo de desarrollar cáncer gonadal.
- Es importante evaluar a todas las pacientes con características de ST con el estudio de cariotipo y se sugiere la búsqueda del gen *SRY* para detección de mosaicismos en bajo porcentaje mediante la técnica de FISH.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abeliovich D, Yehuda O, Ben-Neriah S. (1994). Loss of Y chromosome: an age-related event or a cytogenetic marker of a malignant clone. *Cancer Genet Cytogenet* 76:70-71.
2. Battin, J. (1998). Variabilité du phénotype turnérien. In *Journées Parisiennes de Pédiatrie*. Flammarion Médecine-Sciences; 49-56.
3. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH. (1990). Genetic evidence equating *SRY* and the testes-determining factor. *Nature*, 348: 448-450.
4. Boucher, C, A, Carole A; Ogata, T; Affara, N,A. (2001). Breakpoint analysis of Turner patients with partial Xp deletions: implications for the lymphoedema gene location. *Journal of Medical Genetics*, 38(9); 591-598
5. Breneman J, Ramsey M, Lee D. (1994). The development of chromosome-specific composite DNA probe for the mouse and their application to chromosome painting. *Chromosoma* 102: 591-598.
6. Brothman AR. (1997). Cytogenetic studies in prostate cancer: are we making progress? *Cancer Genet Cytogenet* 95:116-121
7. Buyse ML. (1990). *Birth Defects Encyclopedia*. Blackwell Scientific Publications, Inc. Vol. II; 1717-1719.
8. Dave BJ, Hopwood VL, Spitz MR, Pathak S. (1996). Sex chromosome abnormalities in lung cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet* 87:24-28
9. De la Chapelle A. (1990). Sex chromosome abnormalities. In: Emery AEH, Rimoin DL, eds. *Principles and practice of medical genetics*. London: Churchill Livingstone, 273-299.
10. Delgado A, Galan E. (1998). *Patología Cromosómica, Grandes Síndromes en Pediatría*. Volumen 8. Bilbao, 268-275.

11. Eberhard P. (2001). "Color Atlas of Genetics", Edit. Thieme 2da. edición. Germany; 391.
12. Elsheikh M, Dunger D. B., Conway G. S. and Wass J. A. H. (2002). Turner's Syndrome in Adulthood, *Endocrine Reviews* 23 (1): 120-140.
13. Geburek BM, Kollmorgen TA, Qian J, D'Souza-Gburek SM, Lieber MM, Jenkins RB. (1997). Chromosomal anomalies in stage D1 prostate adenocarcinoma primary tumors and lymph node metastases detected by fluorescence in situ hybridization. *J Urol* 157:223-227.
14. González-del-Angel A, Blanco B, Del Castillo V, Carnevale A. (1995). Identificación de cromosomas sexuales marcadores mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH) *Rev Invest Clin*; 47(2): 117-125.
15. Gicquel Christine, Véronique Gaston, Sylvie Carbol. (1998). Assessment of Turner's Syndrome by Molecular Analysis of the X Chromosome in Growth-Retarded Girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:5 1472-1476.
16. Gil F.B., Moreno I.A., Fernandez M., Moreno G.M., Ramos M., Gómez M.J. (2003). "Atlas de Genética y Citogenética en Oncología y Hematología" Edit. Bilbao, España. 236-249.
17. Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW, Muller J. (2000). Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:3199-202.
18. Grumbach, MM. (1998). Disorders of sex differentiation. *Williams Textbook of Endocrinology*, 9<sup>th</sup> Ed, W.B.Saunders; 1347-1348.
19. Guizar, V. (2001). Diagnostico y manejo de las enfermedades hereditarias. Edit. Manual Moderno. 225-239.
20. Hashimoto H, Maruyama H, Koshida R, Okuda N, Murayama K, Katsumi T. (1997). Presence of Turner stigmata in a case of dysgenetic male pseudohermaphroditism with 45,X/46,X+mar karyotype. *Arch Dis Child*; 76:268-71.

21. Hassold TB, Dorothy Pettay, Robinson Arthur. (1992). Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. *Human Genetics* 89: 647-652.
22. Hassold, Terry, Benham F, Leppert M. (1988). Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am J Hum Genet.* 42:534-541.
23. Held KR, Keber S, Kaminsky E, (1992). Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depends on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet.* 88:288-294.
24. Hsu LYF. (1994). Phenotype karyotype correlation of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in post-natally diagnosed cases. *Am J Med Genet:* 53; 108-14.
25. Hughes IA, Coleman N, Faisal Ahmed S, Ng K-L, Cheng A, Lim HN. (1999). Sexual dimorphism in the neonatal gonad. *Acta Paediatr (Suppl);* 428:23-30.
26. ISCN (1995). Guidelines for cancer cytogenetics, supplement to an international system for human cytogenetics nomenclature. Basel: Karger 30-60
27. Jacobs P, Dalton P, James R. (1997). Turner Syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Am Hum Genet.* 61: 471-483.
28. Jackson, L. (2002). Cytogenetics and Molecular Cytogenetics. *New Genetics For Clinical Practice.* 45(3) 622-639
29. Jackson-Cook C, Bae V, Edelman W, Brothman A, Ware J. (1996). Cytogenetic characterization of the human prostate cancer cell line P69SV40T and its novel tumorigenic sublines M2182 and M15. *Cancer Genet Cytogenet* 87:14 23
30. Jairo JR, Jubiz W, Isaza C. (2005). Gen *SRY* y ausencia de tejido testicular en una mujer 47,XYY con disgenesia gonadal. *Colombia Médica* 36:40-43.

31. Kirk JA, VanDevanter DR, Biberman J, Bryant EM. (1994). Y chromosome loss in chronic myeloid leukemia detected in both normal and malignant cells by interphase fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 11:141-145
32. Le Beau M. (1993). Detecting genetic changes in human tumor cells: Have Scientists "Gone FISHing?" *Blood* 81: 1979-1983.
33. König JJ, Teubel W, van Dongen JW, Romijn JC, Hagemeyer A, Schroder FH. (1994). Loss and gain of chromosomes 1, 18, and Y in prostate cancer. *Prostate* 25:281-291
34. Lau YFC. (1999). Sex chromosome genetics '99. Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY gene. *Am J Hum Genet*; 64:921-7.
35. Limal JM. (2000). Syndromes de Turner et de Klinefelter. *Diagnostic. Rev Prat*; 50:1011-1017.
36. Lippe BM. (1996). Turner Syndrome. En: Sperling MA, ed. *Pediatric Endocrinology*. Chicago: WB Saunders Co. P. 387-421
37. Lippe BM. (1990). Primary ovarian failure. In Kaplan SA, ed. *Clinical Pediatric and Adolescent Endocrinology*. Philadelphia; WB Saunders Company; 325-366.
38. López S. (2003). Manual sobre el tratamiento y diagnóstico del Síndrome de Turner. Edit. Bilbao, España; 108-125
39. McDonald, D. (2002). *Cytogenetics*. Dynagene Cytogenetics Laboratory, Seattle, W.A. USA.
40. Magenis RE, Breg WR, Clark KA. (1980). Distribution of sex chromosome complements in 651 patients with Turner's syndrome. *Am J Hum Genet*; 32:79A.
41. Massa G, Vanderschueren Lodewyckx M. (1991). Age and height at diagnosis in Turner syndrome: influence of parental height. *Pediatrics* 88: 1148-1152.

42. Marozzi A, Manfredini E, Tibiletti. (2000). Molecular definition of Xq common-deleted region in patients affected by premature ovarian failure. *Hum. Genet.* 107: 304-311.
43. Mazzanti L. Ciccognani A. Baldazzi L. (2004). Risk of gonadoblastoma in Turner Syndrome with Y-Chromosome mosaicism. 4<sup>th</sup> European Cytogenetics Conference, September 6-9. Italy
44. Medlej R, Lobaccaro JM, Berta P. (1992). Screening for Y-derived sex determining gene *SRY* in 40 patients with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 75:1289-1292.
45. Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F. (1997). Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 57:2765-2780
46. Noonan JA, Ehmke DA. (1963). Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease. *Midwest Soc Pediatr Res*, 63:468-470.
47. Noonan JA. (1994). Noonan syndrome: An update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)*, 33:548-555.
48. Ogata T, Muroya K, Matsuo N. (2000). Structure function relation of the X chromosome in Turner syndrome. En: Saenger P, Pasquino AM, eds. *Optimizing health care for Turner patients in the 21<sup>st</sup> century*. Amsterdam, Elsevier 9-18.
49. Ostrer H, Clayton CM. (1989). Y chromosome mosaicism in 45,X Turner syndrome. *Am J Med Genet* 34:294-296
50. Page DC. (1987). Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenic gonads. *Development Suppl*;101:151-155.
51. Patsalis PC, Hadjimarco MI, Velissariou V. (1997). Supernumerary marker chromosomes (SMCs) in Turner syndrome are mostly derived from the Y chromosome. *Clin Genet.* 51:184-190
52. Pinkel, D. (1993). Chromosomes analysis by multicolor in situ hybridization using direct-labeled fluorescent probe. *Clinical Chemistry* 39: 709-711.

53. Pinsky, L. (1999). Genetic Disorders of Human Sexual Development. Oxford University Press Inc. USA. 11-38.
54. Quintana-Murci L, Fellous M. (2001). The human Y chromosome: the biological role of "functional Wasteland". J Biomed Biotechnol; 1:18-24
55. Reddy KS, Sulcova V. (1998) Pathogenetics of 45,X/46,XY gonadal mosaicism. Cytogenet Cell Genet 82:52–
56. Robinson, DO, Dalton, P, Jacobs, PA, Mosse K, Power MM, Skuse DH, Crolla JA. (1999). A molecular and FISH analysis of structurally abnormal Y chromosomes in patients with Turner syndrome. Med Genet;36:279-284
57. Saenger, P. (1993). The current status of diagnosis and therapeutic intervention in Turner syndrome. J Clin Endocrinol Metab;77:297-301.
58. Säwendahl L, Davenport ML. (2000). Delayed diagnoses of Turner's syndrome: proposed guidelines for change. J Pediatr, 137:455-459.
59. Scully RE. (1970). Gonadoblastoma: a review of 74 cases. Cancer 25: 1340-1356.
60. Schad R, Dewald W. (1995). Building a new clinical test for fluorescence in situ hybridization. Applied cytogenetics 21:1-4.
61. Simpson JL. (1976). The relationship of neoplasia to disorders of abnormal sexual differentiation. Birth Defects 12:1 15-50.
62. Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 346: 240-244.
63. Swiger R, Tucker, D. (1996). Fluorescence in situ hybridization. A brief review. Environm and Mol Mut. 27:245-254.
64. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe P. (2001). Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. Endocr Rev; 22:657-674.

65. Teraoka M, Narahara K, Yokoyama Y, Tsuji K, Kikkawa K, Ito S, Koyama K, Seino Y. (1998). 45,X/46,X,idic(Yq) mosaicism: clinical, cytogenetic, and molecular studies in four individuals. *Am J Med Genet*;78:424–8.
66. Tesch LG, Rosenfeld RG. (1995). Morgagni, Ullrich and Turner: the discovery of gonadal dysgenesis. *Endocrinologist* 5:327–328
67. Teter J. (1967). Occurrence of tumors in dysgenetic gonads. *Cancer*. 20; 1301-1310.
68. Tsezou A, Hadjiathanasiou C, Gourgiotis D. (1999). Molecular genetics of Turner syndrome: correlation with clinical phenotype and response to growth hormone therapy. *Clin Genet*. 56:441-446.
69. Tsuchiya K, Reijo R, Page DC, Distèche CM. (1995). Gonadoblastoma: molecular definition of the susceptibility region on the Y chromosome. *Am J Hum Genet*, 57:1400-1407
70. Van de Burgt I, Berends, Lommen. (1993). Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome. *Am J Med Genet*, 3:187-191
71. Watanabe A, Kawachi Y, Nishihara T, Uchida T, Setsu K, Hikiji K. (1996). Extra Y chromosome in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 89:85 87
72. Zinn A, Ross JL. (2000). Critical regions for Turner syndrome phenotypes on the X chromosome. En Saenger P, Pasquino AM, eds. *Optimizing health care for Turner patients in the 21<sup>st</sup> century*. Amsterdam; Elsevier.19-28.



## XIV. ANEXO REACTIVOS

### 1. ESTUDIOS CITOGENÉTICOS

- **MEDIO RPMI-1640(GIBCO)**

En 1000ml de medio con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se lleva a un pH = 7, se filtra en membrana de  $0.22\mu\text{c}$ , se suplementa con 20 ml de suero fetal de ternera (SFT), 1.3 ml de antibióticos (bencilpenicilina 1,000000 U/ml / estreptomicina 1gr diluidas en 96 ml)

- **FITHEMAGLUTININA (GIBCO)**

Se rehidrata con 10 ml de agua estéril o destilada y se mantiene en refrigeración de -5 a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$

- **COLCHICINA STOCK**

Se toman 0.10 g y se aforan en 100 ml, se toman alícuotas de 1 ml y se diluyen en 10 ml de agua destilada. Las alícuotas se mantienen en refrigeración.

- **SOLUCIÓN HIPOTÓNICA KCl 0.075M**

Se pesan 0.59 g de KCl y se diluyen en 100 ml de agua destilada.

- **FIJADOR CARNOY**

Se toma un volumen de 3:1 de metanol- Ac. Acético.

### 2. REACTIVOS BANDAS G

- **TRIPSINA**

Se toman 0.5 g de Tripsina posteriormente se diluyen en 10 ml de agua estéril, se toman alícuotas de 0.5 ml.

- **COLORANTE GIEMSA**

Se pesan 2.5 g de Giemsa, 1.25 ml de glicerina se agitan durante 1 hora a  $60\text{-}70^\circ\text{C}$ , se deja enfriar y se le agrega 250 ml de metanol.

### BUFFER GIEMSA

SOL. A 45.36 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

SOL. B 59.32 g/l de  $\text{NaHPO}_4$

- **BUFFER WRIGTH**

Se pesan 2.5g de  $\text{NaHPO}_4$  y 6.63g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se diluyen en 1000 ml de agua

### **3. REACTIVOS PARA MICROFOTOGRAFÍAS**

#### **Película**

- **REVELADOR (KODAK)**

Para preparar 500 ml de revelador se pesan 72.5 g se diluyen en 437 ml de agua y posteriormente se ajusta el volumen a 500 ml, la disolución se debe llevar a cabo a 38°C.

- **FIJADOR (KODAK)**

Para preparar 500 ml de fijador se toman 124.46 ml de la solución A (Marca Kodak) 13.68 ml de la solución B (Marca kodak), 373.68 ml de agua y se ajusta volumen a 500 ml.

#### **Papel**

Para revelado de papel solo se hace una dilución 2:1

### **4. REACTIVOS PARA FISH**

- **SOLUCIÓN STOCK 20XSSC (para 1 litro)**

Se pesan 175.3 gr de  $\text{NaCl}$ , 88.2 gr de Citrato de Sodio en 800 ml de agua destilada, ajustando su pH a 5.3 con  $\text{HCl}$  concentrado y aforarlo hasta llegar al volumen deseado.

Para disoluciones:

4XSSC DISOLUCIÓN 1:5

2XSSC DISOLUCIÓN 1:10

- **SOLUCIÓN 0.3% NP-40 EN 0.4XSSC (para 500 ml)**

En 488.5 ml de agua destilada se agregan 10 ml de solución stock 20XSSC y 1.5ml del detergente NP-40 se ajusta el volumen, la solución debe presentar un pH de 7-7.5 ajustándolo con NaOH 1N.

- **SOLUCIÓN 0.1% DE NP-40 EN 2XSSC (para 500 ml)**

En 449.5 ml de agua destilada se adicionan 50 ml de 20XSSC y 0.5 ml de NP-40 ajustando el pH 7-7.5 con NaOH 1N.

- **FORMAMIDA (50 ml)**

En 28 ml de formamida se le agregaran 8 ml de agua inyectable y 4 ml de 20XSSC, ajustando el pH a 7.

NOTA: Esta preparación debe de realizarse en la campana de extracción, con guantes y cubre bocas debido a que la formamida es altamente carcinogénica.