



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

PERFIL DE LAS ABERRACIONES NUMÉRICAS Y ESTRUCTURALES
DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES DE PACIENTES ATENDIDOS
EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
DE 2002 A 2012 Y SU CORRELACIÓN CON ALTERACIONES DEL
DESARROLLO SEXUAL. ANÁLISIS DE UNA FAMILIA.

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN: GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA:

DRA. ALEJANDRA DEL PILAR REYES DE LA ROSA



DIRECTOR DE TESIS : DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

**ASESOR DE TESIS: DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO
M. EN C. ALICIA BEATRIZ CERVANTES PEREDO**

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015



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.

**DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**


**TUTORA: DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**


**ASESOR DE TESIS: DRA. CONSTANZA GARCÍA DELGADO
MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**


**ASESOR DE TESIS: M. EN C. ALICIA BEATRIZ CERVANTES
PEREDO
SERVICIO DE GENÉTICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO DR. EDUARDO LICEAGA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

Resumen

Introducción: Las alteraciones en los cromosomas sexuales son consideradas las aberraciones cromosómicas más comunes con una frecuencia de 1:400 recién nacidos vivos. El fenotipo de los pacientes es variable y en general no se observa ambigüedad de genitales por lo que su diagnóstico se puede retrasar. Los trastornos del desarrollo sexual (TDS) se presentan en 1:4 500 recién nacidos vivos y sólo en el 20% de los casos es posible llegar a un diagnóstico molecular de precisión. El TDS 46,XX testicular se caracteriza por presentar grado variable de ambigüedad de genitales, testículos, ausencia de derivados Mülllerianos y complemento cromosómico 46,XX. La mayoría de los casos son esporádicos y se deben a la presencia del gen *SRY* en el cromosoma X paterno, sin embargo, en muy pocos de los restantes, incluyendo algunos casos familiares, no se conoce su etiología.

Material y métodos: Se hizo una revisión del registro de resultados de cariotipo con bandas GTG realizados en el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez del año 2002 al 2012, para la identificación de los casos con aberraciones numéricas y estructurales de los cromosomas sexuales y correlacionarlas con la presencia de un trastorno del desarrollo sexual. Posteriormente se realizó el análisis estadístico y se identificó un caso familiar para ampliar su estudio y otorgar asesoramiento genético. Criterios de inclusión: Casos con reporte de cariotipo entre enero de 2002 a diciembre de 2012. Cariotipos realizados con bandas GTG. Presentación de alteración numérica o estructural de los cromosomas sexuales. Con nomenclatura clara y letra legible. Criterios de exclusión: No se cuente con la nomenclatura clara. No legibles. Criterios de eliminación: Casos sin resultados. El análisis estadístico fue un estudio retrospectivo, observacional y descriptivo, en el cual se utilizaron medidas de tendencia central para el análisis de la población y de los resultados obtenidos. En el análisis del caso clínico se tuvieron los siguientes criterios; criterios de inclusión: Pacientes con alteraciones numéricas o estructurales de los cromosomas sexuales. Pacientes con reversión sexual y/o ambigüedad de genitales. Con resultado legible y con nomenclatura adecuada. Que acepten participar en el estudio. Que pueda ofrecerse beneficio de los estudios propuestos. Criterios de exclusión: Pacientes que no acepten participar. Que haya contraindicación de toma de muestra. No se encuentre en expediente clínico para confirmación de datos. Criterios de eliminación: No se pueda confirmar el resultado. No se obtenga resultado de la muestra.

Resultados: En el período establecido se reportaron 1 741 casos con una cromosomopatía, 199 (11.43%) correspondieron a una alteración de los cromosomas sexuales, de los cuales 137 (7.87%) presentaron una aberración numérica y 36 (2.07%) una estructural. El 21.11% de las alteraciones de los cromosomas sexuales estaban asociadas a un trastorno en el desarrollo sexual. Se identificó el caso familiar de dos hermanos con un TDS 46,XX testicular, en uno de ellos se efectuaron estudios adicionales incluyendo un cariotipo molecular. Los estudios de FISH y PCR demostraron que se trataba de un caso *SRY* negativo. En el análisis de los datos obtenidos del microarreglo no se detectaron ganancias ni pérdidas en ninguno de los genes implicados en el proceso de desarrollo sexual, entre ellos *SOX9*, *SOX3*, *DAX1* y *RSP01*, ni en región alguna del su genoma. Adicionalmente no se encontró alguna variación en la secuencia del gen *RSP01*, que pudiera tener efecto un efecto patogénico.

Discusión y conclusiones: Las aberraciones de los cromosomas sexuales en nuestra población, no son tan frecuentes, como lo reportado en la población general. Cabe señalar que la mayoría de los casos se diagnostican en la edad adulta por problemas de fertilidad. Sin embargo, si comparamos los datos obtenidos con estudios similares, donde se solicita el estudio de cariotipo a pacientes con alguna alteración clínica, sí hay coincidencia. El TDS 46,XX testicular es una entidad compleja con expresividad variable y heterogeneidad genética. En la actualidad, hay pocos casos familiares reportados en la literatura donde se conoce su causa. Por ello, es importante continuar con la búsqueda de genes implicados en el proceso de la diferenciación testicular para ampliar el conocimiento, poder ofrecer nuevas herramientas diagnósticas y poder brindar un mejor manejo a los pacientes y un asesoramiento genético adecuado a los familiares.

Índice

	Página
1. Marco teórico	
1.1 Bases cromosómicas	1-5
1.2 Ciclo celular	6-7
1.2.1 Mitosis	8-9
1.2.2 Meiosis	9-12
1.3 Características de los cromosomas humanos	13-14
1.3.1 Cromosoma X	15-25
1.3.2 Cromosoma Y	26-27
1.4 Aberraciones cromosómicas	28
1.4.1 Aberraciones numéricas	28-30
1.4.2 Aberraciones estructurales	31-36
1.5 Técnicas de citogenética convencional y molecular	37-49
1.6 Indicaciones para realizar estudios citogenéticos	50
1.7 Desarrollo sexual	51-52
1.7.1 Gónada indiferenciada	53-54
1.7.3 Testículo	55-57
1.7.4 Ovario	58
1.8 Alteraciones del desarrollo sexual	59
1.8.1 Clasificación	59-61
1.8.2 Abordaje de pacientes con alteraciones del desarrollo sexual	62-66
1.9 Tipo y frecuencia de aberraciones numéricas y estructurales de los cromosomas sexuales	67-68

2. Planteamiento	69
3. Justificación	70
4. Objetivos	71
5. Material y métodos	72-73
6. Plan de análisis estadístico	73
7. Descripción de variables	73
8. Resultados	
8.1 Estadística	
8.1.1 Resultados	74-78
8.2.2 Discusión	79-83
8.2 Caso clínico	84-92
8.2.1 Discusión	93-99
9. Conclusiones	100
10. Bibliografía	101-108
11. Anexos	
Anexo I: Cariotipo con técnica de bandas GTG	109-110
Anexo II: FISH (Hibridación in situ con fluorescencia)	111
Anexo III: PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	112
Anexo IV: Mapeo genómico con microarreglos de alta densidad	113
Anexo V: Secuenciación automática	114
Anexo VI: Consentimiento informado para toma de muestra de sangre	115
Anexo VII: Consentimiento informado para toma de muestra de DNA para evaluación diagnóstica	116

1. Marco teórico

1.1 Bases cromosómicas de la herencia

Los cromosomas fueron observados por primera vez en 1840 durante la descripción de la división celular en células somáticas, sin embargo fue hasta 1880 que se inició su estudio. El descubrimiento de que los cromosomas se teñían fácilmente con ciertos colorantes facilitó los análisis de microscopía y llevó a Waldeyer a acuñar el término cromosoma que proviene del griego *chromo* (color) y *soma* (cuerpo) (Paulson JR y Vagnarelli P, 2011).

Los cromosomas son estructuras dinámicas que contienen DNA unido a proteínas (Paulson JR y Vagnarelli P, 2011). En las células, las moléculas de DNA que miden dos metros de longitud deben compactarse dentro del núcleo que tiene un tamaño de micrómetros, siendo los cromosomas uno de los niveles de organización del material genético en donde este se encuentra más condensado y se caracterizan por su estabilidad ya que soportan las fuerzas generadas durante la segregación en la división celular (Thadani R, *et al.*, 2012).

El número de cromosomas es característico de cada especie y varía mucho de una a otra. Se habla de células haploides cuando cada cromosoma se encuentra en una sola copia como ocurre en las células germinales, identificándose el número total de cromosomas como $1n$. Las células diploides son aquellas en las que se tiene un número cromosómico $2n$, los cromosomas morfológicamente iguales se disponen por pares, a los miembros de un determinado par se les llama cromosomas homólogos (Moore CM y Best RG, 2007). En 1956 Joe-Hin Tjio y Albert Levan llevaron a cabo estudios en fibroblastos de pulmón de embriones para establecer el número de cromosomas en los seres humanos e informaron que el número diploide es de 46 (Tjio JH y Levan A, 1956) (Figura 1).

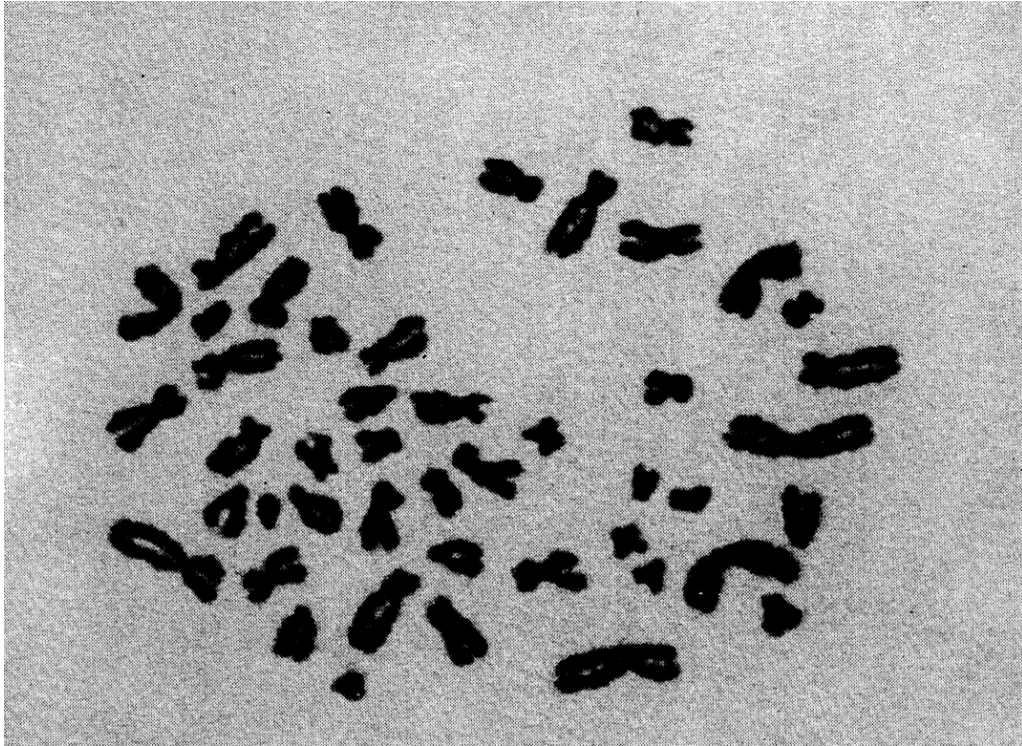


Figura 1. Metafase de fibroblastos de pulmón de embrión humano. Imagen tomada de Tijo JH y Levan A, 1956.

1.2 Estructura cromosómica

En los cromosoma se pueden identificar varias regiones o subestructuras con funciones altamente especializadas como el centrómero y los telómeros (Gilchrist S y Bickmore WA, 2005) El centrómero está implicado en la correcta segregación de las cromátidas hermanas durante la mitosis y la función de los telómeros es proteger los extremos de la molécula de DNA de la degradación. En conjunto estas estructuras aseguran que la información genética pase de una generación a la siguiente con alta fidelidad (Paulson JR y Vagnarelli P, 2011) (Figura 2).

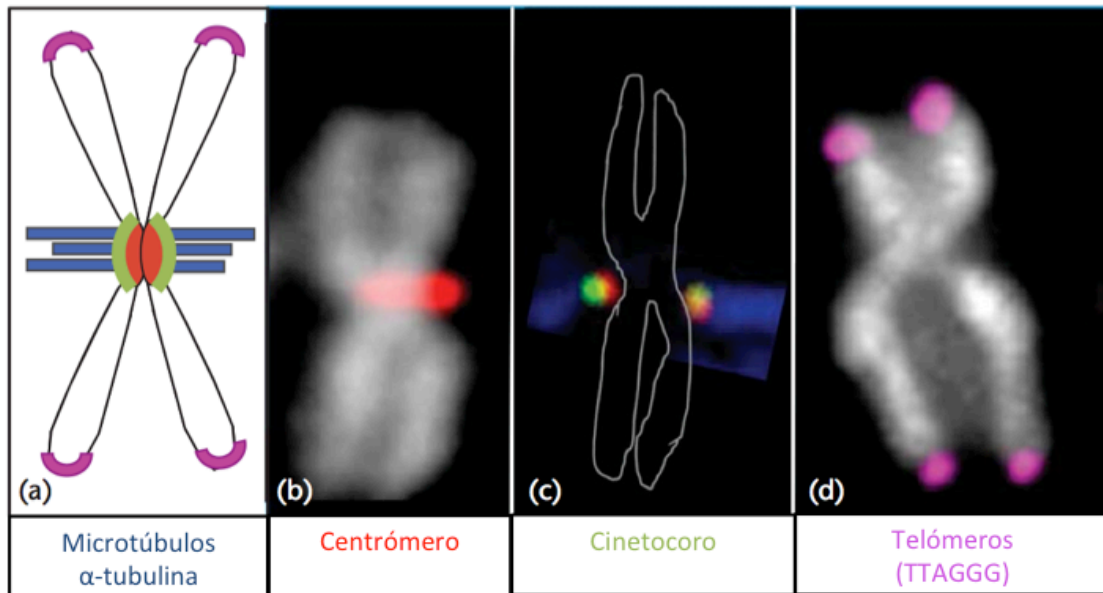


Figura 2. Regiones especializadas de los cromosomas. a) Representación esquemática de un cromosoma en mitosis; el cinetocoro interior (rojo) se encuentra por debajo del cinetocoro exterior (verde), el cuál media la interacción con los microtúbulos del huso (azul). b) y c) Localización por medio de inmunofluorescencia de las proteínas del cinetocoro interior (rojo), el cinetocoro exterior (verde) y los microtúbulos (azul) d) Hibridación fluorescente in situ (FISH) de regiones teloméricas. Imagen modificada de Paulson JR y Vagnarelli P, 2011 .

Centrómeros

El centrómero, constricción primaria o central, es la región más estrecha del cromosoma, por la que permanecen unidas las dos cromátidas hermanas. El centrómero delimita los brazos cromosómicos que se designan con la letra p (del francés *petit*) y los largos con la letra q (Gilchrist S y Bickmore WA, 2005). El cinetocoro es una estructura proteica que se encuentra en el centrómero e interactúa con los microtúbulos del huso mitótico. Los microtúbulos ejercen la tracción necesaria para separar las dos cromátidas durante la división, de esta forma se produce la segregación de los cromosomas y cada célula hija recibe una cromátida (Paulson JR y Vagnarelli P, 2011) (Figura 2a-c).

Las secuencias esenciales para la función de los centrómeros son ricas en adenina y timina, se componen de 170 pb y se repiten entre 2 mil y 30 mil veces en cada centrómero, forman parte del DNA repetitivo y representan una parte importante de la heterocromatina constitutiva (Gilchrist S y Bickmore WA, 2005) .

Telómeros

Corresponden a las regiones situadas en los extremos de los cromosomas, están constituidos por secuencias especializadas de DNA asociado a proteínas y tienen características estructurales y funcionales propias que los diferencian de otras regiones cromosómicas (Paulson JR y Vagnarelli P, 2011) (Figura 2d).

Los telómeros están formados por largas extensiones de repetidos de doble cadena con la secuencia TTAGGG, la cual se extiende entre 9-15 kb de longitud. El final real de los telómeros es perceptible por la presencia de una saliente de una sola cadena, con una longitud de 50 a 300 nucleótidos en el extremo 3' conocido como cadena G (Deng Y, *et al.*, 2008) esta cadena se pliega sobre sí misma dando lugar al bucle T o T-loop (O'Sullivan RJ y Karlseder J, 2010) (Figura 3).

El repetido TTAGG de los telómeros se asocia a un complejo proteico llamado shelterin, el cual está formado por 6 proteínas: factor 1 de unión al repetido telomérico (TRF1, del inglés *telomeric repeat-binding factor 1*), factor 2 de unión al repetido telomérico (TRF2), proteína 1 activadora y represora (RAP1, del inglés *repressor and activator protein 1*), proteína 2 nuclear que interactúa con TRF1 (TIN2, del inglés *TRF1-interacting nuclear protein 2*), proteína de interacción con POT1 y TIN2 (TPP1, del inglés *POT1-and TIN2-interacting protein*) y la proteína 1 de protección de telómeros (POT1, del inglés *protection of telomeres 1*) (O'Sullivan RJ y Karlseder J, 2010). Este complejo proteico tiene como función distinguir la terminación normal del cromosoma de una ruptura de DNA, reprimir los mecanismos de reparación de daño de DNA y regular a la telomerasa para el mantenimiento de los telómeros (Palm W y de Lange T, 2008).

En 1972 Jim Watson describió que había un problema con la replicación de los extremos del DNA debido a que la DNA polimerasa utiliza un cebador de RNA y sólo sintetiza en la dirección 5'-3', en la cadena rezagada la replicación no se lleva a cabo en el inicio ya que el cebador de RNA se debe de unir a la cadena molde (Watson JD, 1972) lo que supondría que con cada proceso de replicación los cromosomas se harían más cortos (Mason PJ y Perdighones N, 2013). Sin embargo, en 1987 Greider y Blackburn descubrieron que fragmentos repetidos son añadidos al final de los cromosoma (Greider CW y Blackburn EH, 1987) para evitar su acortamiento, a través de un complejo llamado telomerasa, el cual se encuentra formado por una transcriptasa reversa (TERT), un cebador de RNA (TR) y una proteína auxiliar llamada disquerina (O'Sullivan RJ y Karlseder J, 2010).

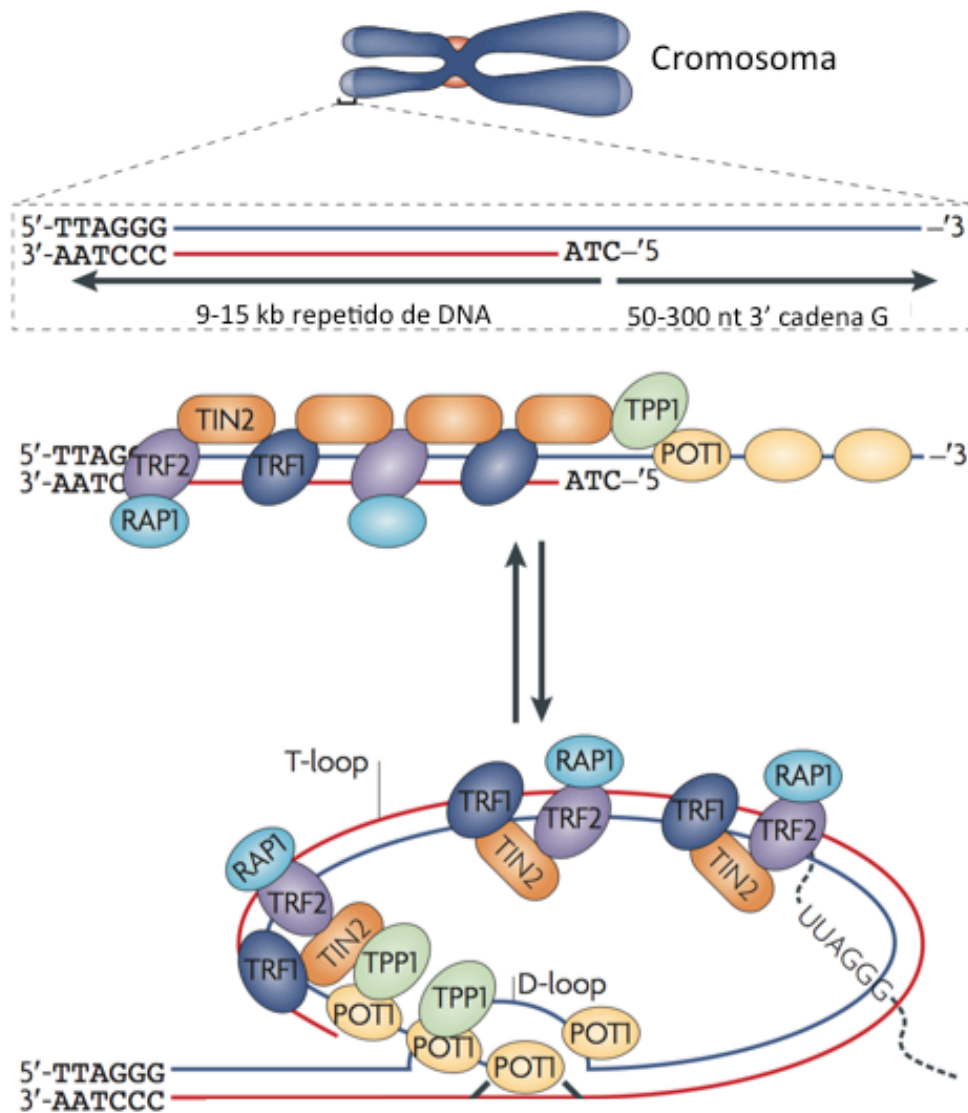


Figura 3. Estructura de los telómeros. Se muestra la presencia de la cadena G al final de los telómeros, así como la formación del bucle T con las proteínas que permiten el mantenimiento de los telómeros. Imagen modificada de O'Sullivan RJ y Karlseder J, 2010.

1.2 Ciclo celular

El ciclo celular consiste de una serie de etapas que permiten que una célula se duplique y se divida para dar origen a células hijas. Con base en las actividades celulares se ha establecido que el ciclo celular consta de dos fases principales: interfase y fase M o de división celular (Truman AW, *et al.*, 2012). La interfase incluye las fases G1, S y G2 en las que se llevan a cabo diversas actividades que se encargan del crecimiento celular y de la replicación del material genético. Cuando un organismo ya no requiere de la proliferación continua de un tipo celular, esas células abandonan el ciclo celular y entran en periodo de latencia llamado G0 (Figura 4) (McIntosh JR, *et al.*, 2012).

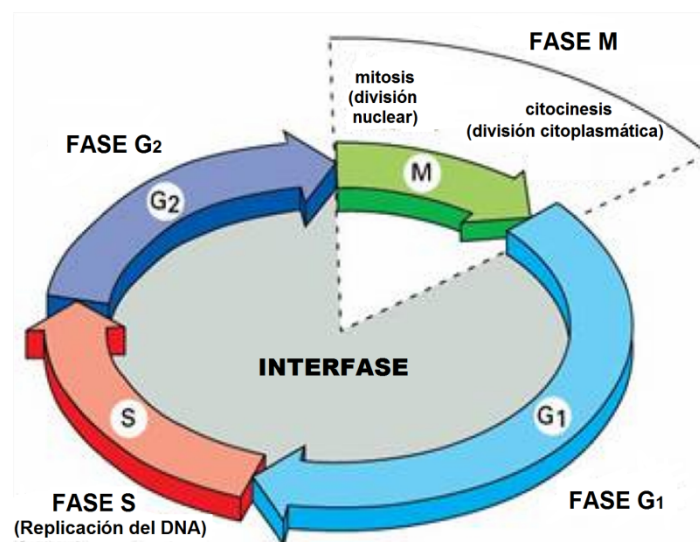


Figura 4. Fases del ciclo celular. Modificada de Tate S, Ferregino PK, 2005.

Las etapas del ciclo celular en la mitosis son:

- Fase G1. En esta etapa se lleva a cabo el crecimiento celular, los organelos se duplican y la célula mantiene un metabolismo normal. La síntesis de RNA y proteínas es muy activa lo que permite que la célula tenga las moléculas necesarias para que pueda progresar a la fase S y tenga el material necesario para la replicación del DNA. Durante este periodo los cromosomas están formados por una sola cromátida (Figura 5).
- Fase S. Se lleva a cabo la síntesis de DNA, al final de ésta cada cromosoma queda formado por dos cromátidas hermanas.
- Fase G2. La célula crece y continúa con la síntesis de proteínas y RNA y se prepara para llevar a cabo la división celular (Moore CM y Best RG, 2007; McIntosh JR, *et al.*, 2012).

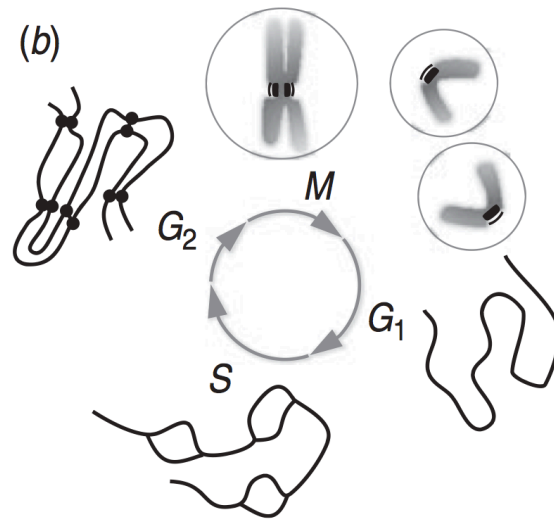


Figura 5. Esquema de la estructura cromosómica durante el ciclo celular. Tomada de McIntosh JR, *et al.*, 2012

Existen dos tipos de división celular: la mitosis y la meiosis. La mitosis es la división de las células somáticas, permite que el cuerpo crezca, se diferencie y lleve a cabo la regeneración tisular. La mitosis da lugar a dos células hijas idénticas entre sí y a la célula original (Tate S y Ferrigno PK, 2005). La meiosis sólo sucede en las células de la línea germinal y da lugar a gametos, cada uno con 23 cromosomas (Moore CM y Best RG, 2007).

1.2.1 Mitosis

Es un proceso continuo de cinco etapas: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Walczak CE, *et al.*, 2010) (Figura 6).

- **Profase.** Se caracteriza por la condensación gradual de los cromosomas mediada por la topoisomerasa II, ésta se une a secuencias de DNA ricas en AT llamadas SAR o regiones de unión al armazón. Hay desintegración y desaparición del nucléolo y el comienzo de la formación del huso mitótico.
- **Prometafase.** La ruptura de la membrana nuclear permite a los cromosomas dispersarse por la célula y unirse mediante sus cinetocoros a los microtúbulos del huso mitótico. Los cromosomas continúan condensándose durante esta etapa.
- **Metafase.** Los cromosomas alcanzan su máximo estado de condensación, se ubican en el plano ecuatorial de la célula debido al equilibrio por las fuerzas ejercidas sobre los cinetocoros de cada cromosoma por los microtúbulos que surgen de los dos polos del huso.
- **Anafase.** Los cromosomas se separan por su centrómero. Cada cromátida hermana se convierte en un cromosoma independiente que se mueven hacia los polos opuestos de la célula.
- **Telofase.** Los cromosomas comienzan a descondensarse. Se forma la membrana nuclear alrededor de cada núcleo.
- **Citocinesis.** El citoplasma se escinde y da lugar a dos células hijas.

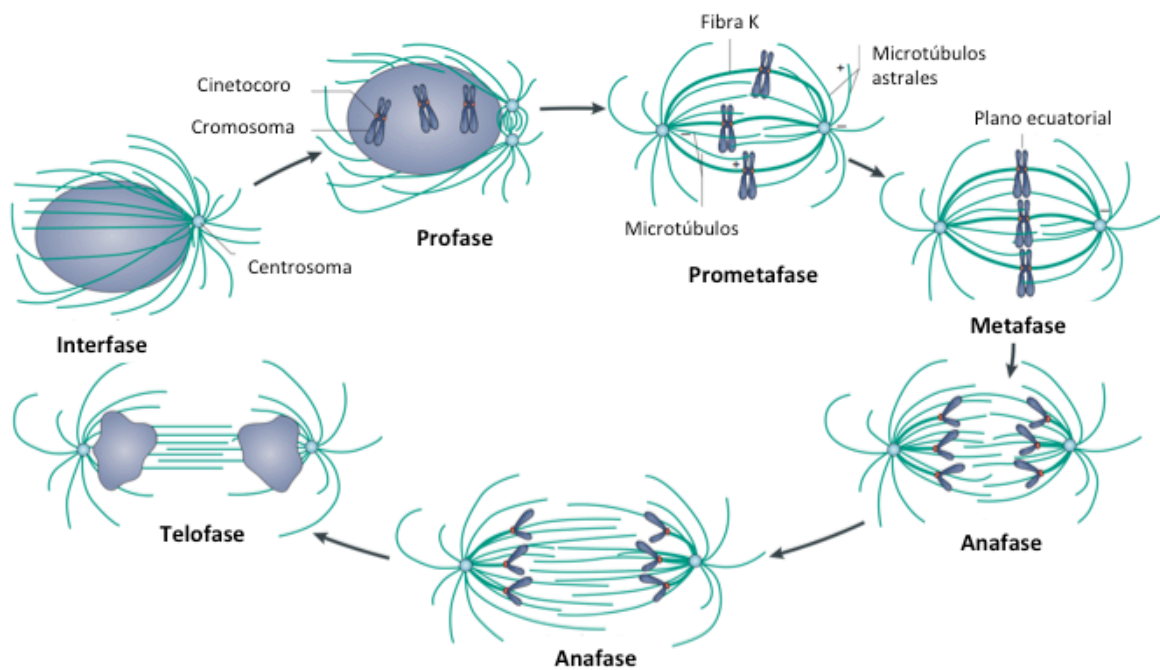


Figura 6. Esquema de las etapas de la mitosis indicando algunos de los elementos característicos como el huso mitótico. Imagen modificada de Walczak CE, *et al.*, 2010.

1.2.2 Meiosis

La meiosis es un proceso especializado para la formación de gametos a partir de células somáticas diploides. Se caracteriza por la síntesis de DNA seguida de dos ciclos de segregación cromosómica y división celular: meiosis I o división reduccional y meiosis II o división ecuacional. El resultado de la meiosis masculina es la producción de cuatro espermatozoides del mismo tamaño, mientras que la meiosis femenina da lugar a un óvulo funcional y tres cuerpos polares no funcionales (Moore CM y Best RG, 2007) (Figura 8). Los diferentes estadios de la meiosis I y II se describen a continuación (Figura 7).

Meiosis I

- **Profase I.** Los cromosomas homólogos se aparean y llevan a cabo la recombinación. Se encuentra formada por 5 etapas (Baillet A y Mandon-Pepin B, 2011):

1. **Leptoteno.** Los cromosomas se hacen visibles y empiezan a condensarse, cada

cromosoma se encuentra formado por dos cromátidas hermanas. Se inicia la formación del huso.

2. **Cigoteno.** Los cromosomas homólogos se aparean por medio del complejo sinaptonémico. En el varón los cromosomas X y Y se unen a través de las regiones pseudoautosómicas que se encuentran en los extremos de sus brazos, se condensan y forman un cuerpo pequeño y oscuro llamado vesícula sexual.
3. **Paquiteno.** Cada par de cromosomas homólogos aparece como un bivalente y se lleva a cabo el entrecruzamiento.
4. **Diploteno.** Desaparece el complejo sinaptonémico y los dos componentes de cada bivalente empiezan a separarse uno del otro permaneciendo unidos por los puntos donde sucedió el entrecruzamiento o quiasmas.
5. **Dictioteno.** Este paso sólo ocurre en la meiosis femenina, se lleva a cabo la descondensación de los cromosomas bivalentes. El ovocito se mantiene en este estado durante muchos años hasta la ovulación.
6. **Diacinesis.** Los cromosomas alcanzan su máxima condensación. Los quiasmas se mueven distalmente, hacia los telómeros. La membrana nuclear comienza a desaparecer.

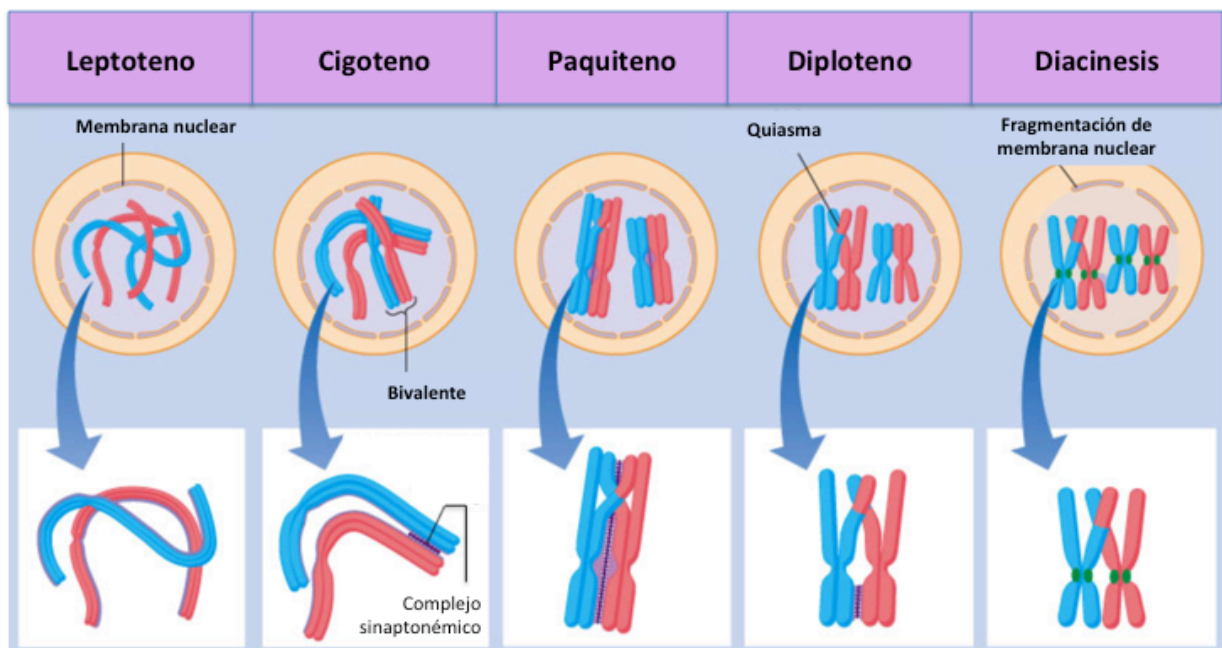


Figura 7. Esquema de Profase I se muestran las 5 etapas de la profase y los cambios que sufren la membrana nuclear y los cromosomas durante éstas. Imagen modificada de Baillet A y Mandon-Pepin B, 2011.

- **Metafase I.** Desaparece completamente la membrana nuclear. Los cromosomas apareados se alinean en el plano ecuatorial mediante el huso.
- **Anafase I.** Los dos miembros de cada bivalente se separan y sus respectivos centrómeros con sus cromátidas hermanas son dirigidos a los polos opuestos de la célula en un proceso llamado disyunción. El número de cromosomas se reduce a la mitad y cada célula resultante tiene un número haploide de cromosomas.
- **Telofase I.** Los dos conjuntos de cromosomas haploides se encuentran agrupados en polos opuestos de la célula.
- **Citocinesis.** La célula se divide en dos células hijas haploides y entra en interfase meiótica. En la espermatogénesis, el citoplasma se divide en partes iguales entre las dos células hijas. En la ovogénesis, un producto recibe casi todo el citoplasma y se conoce como ovocito secundario, mientras que el otro se convierte en el primer corpúsculo polar.
- La interfase meiótica es breve y no tiene fase S, es decir no se produce síntesis de DNA entre la primera y segunda división meiótica (Moore CM y Best RG, 2007).

Meiosis II

Esta segunda división meiótica es similar a la mitosis, ya que los cromosomas se alinean de forma individual en la placa ecuatorial, y las cromátidas hermanas se separan y se mueven hacia los polos opuestos durante la anafase. Existen diferencias entre la meiosis masculina y la femenina. Durante la espermatogénesis se forman cuatro espermátidas funcionales, mientras que en la meiosis femenina existe división desigual con la formación de un óvulo maduro y el segundo cuerpo polar. (Moore CM y Best RG, 2007) (Figura 8).

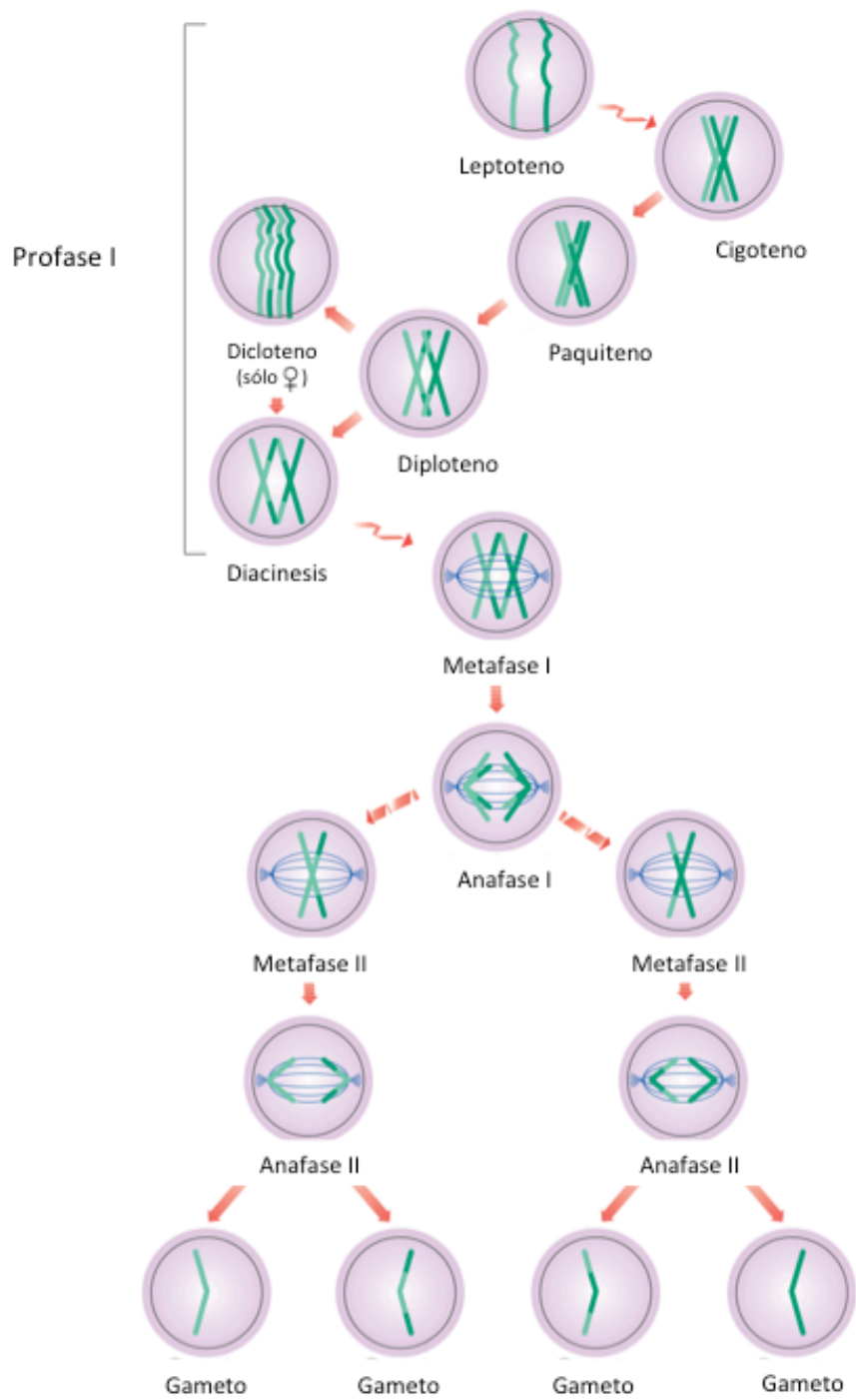


Figura 8. Meiosis. Figura modificada de Moore CM y Best RG, 2007.

1.3 Características de los cromosomas humanos

Los cromosomas se clasifican dependiendo de la posición del centrómero y el tamaño de los brazos o cromátides como:

- Cromosomas metacéntricos: el centrómero se localiza en la parte central del cromosoma, los brazos son del mismo tamaño.
- Cromosomas submetacéntricos: el centrómero se localiza proximal a uno de sus extremos, determinando un brazo corto y un brazo largo.
- Cromosomas acrocéntricos: centrómero está situado muy próximo a uno de sus extremos, quedando el brazo corto muy reducido (Shaffer LG, 2005).

Según el Sistema Internacional de Nomenclatura en Citogenética Humana (ISCN, 2013) la clasificación de cromosomas se basa en los parámetros de longitud, posición del centrómero y presencia o ausencia de satélites y se subdividen en grupos denominados de la letra A a la G (Tabla 1, Figura 9).

Tabla 1. Clasificación de cromosomas

Grupo	Cromosoma	Longitud	Posición del centrómero
A	1,2,3	Grande	Metacéntricos y Submetacéntrico
B	4 y 5	Grande	Submetacéntrico
C	6 a 12, X	Mediano	Submetacéntrico
D	13, 14, 15	Mediano	Acrocéntrico con satélites
E	16, 17, 18	Pequeño	Metacéntrico o submetacéntrico
F	19, 20	Pequeño	Metacéntrico
G	21, 22, Y	Pequeño	Acrocéntrico con satélites, excepto el Y.

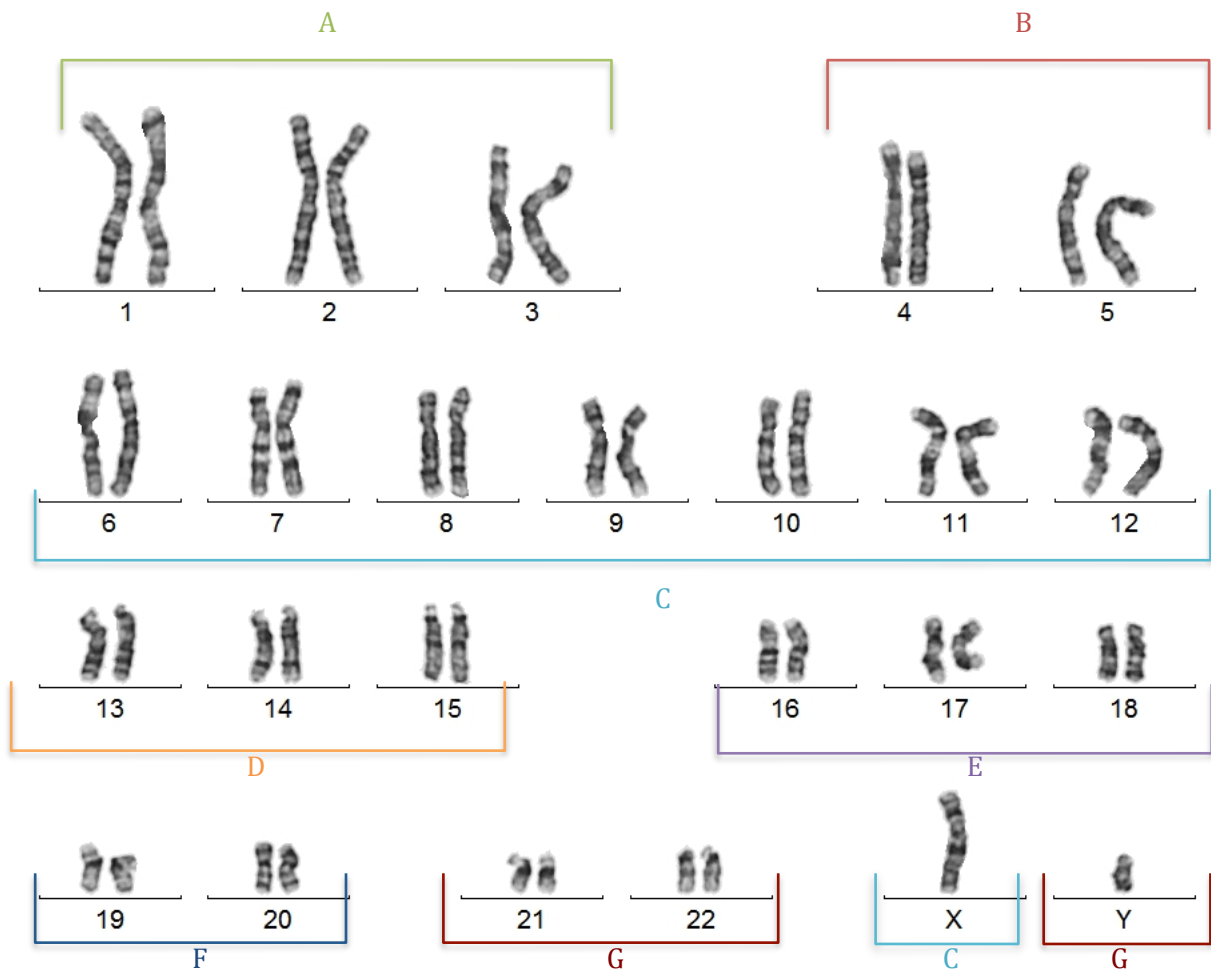


Figura 9. Cariograma 46,XY con técnica de bandas GTG (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Los cromosomas X y Y se denominan cromosomas sexuales por su papel crítico en la determinación sexual. A finales del siglo XIX, H. Henking estudió la formación de las células reproductivas de un insecto y observó que en los machos la mitad de los espermatozoides llevaba un cromosoma que no estaba presente en la otra mitad. Él llamó a esta estructura "X", porque no estaba seguro de que se trataba de un cromosoma. Pocos años después McClung demostró que el elemento X era un cromosoma (Lucchesi JC, 2005), el cromosoma Y recibió su nombre por ser la siguiente letra en el alfabeto (Li X, 2011).

1.3.1 Cromosoma X

El cromosoma X es un cromosoma submetacéntrico que pertenece al grupo C, representa aproximadamente el 5% del genoma y contiene 852 genes codificantes para proteínas (Li X, 2011). Tiene características únicas en el genoma humano, entre ellas, las mujeres heredan un cromosoma X de cada progenitor, a diferencia de los varones que sólo reciben un cromosoma X de la madre y el hecho de que la expresión génica de uno de los cromosomas X se silencia en etapas tempranas del desarrollo para compensar la dosis génica en relación a los varones. Lo anterior es regulado por el proceso de inactivación del cromosoma X a través de la acción del gen *XIST*, el cromosoma permanece inactivo en los tejidos somáticos. Durante la ovogénesis, el cromosoma inactivo se reactiva y recombina con el segundo cromosoma X; a diferencia de lo que ocurre en la espermatogénesis temprana, en donde el cromosoma X sólo recombina con el cromosoma Y en segmentos específicos y después ambos cromosomas sexuales se inactivan (Ross MT, *et al.*, 2005).

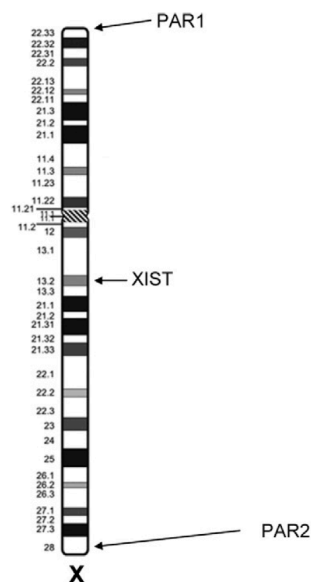


Figura 10. Estructura del cromosma X. PAR (región pseudoautosómica), *XIST*, gen encargado de la inactivación del X. Li X, 2011.

En los extremos del cromosoma X y del Y se encuentran dos regiones con homología en su secuencia que se les conoce como regiones pseudoautosómicas o PAR y son necesarias para el apareamiento, recombinación y correcta segregación durante la meiosis I, como sucede con los autosomas (Ciccodicola A, 2000; Morey C y Avner P, 2011). Las PAR se encuentran entre los extremos terminales de los cromosomas sexuales y el límite de la región pseudoautosómica o PAB (*pseudoautosomal boundary*), se ha reportado que en la PAB de la mayoría de los mamíferos se encuentra un gen que en el caso de los humanos se

trunca en el cromosoma Y y sólo está presente el exón 1, mientras que en el cromosoma X el exón 1 se encuentra en PAB y los exones 2 y 3 en la región específica del cromosoma X (Raudsepp T, *et al.*, 2011) (Figura 10 y 11).

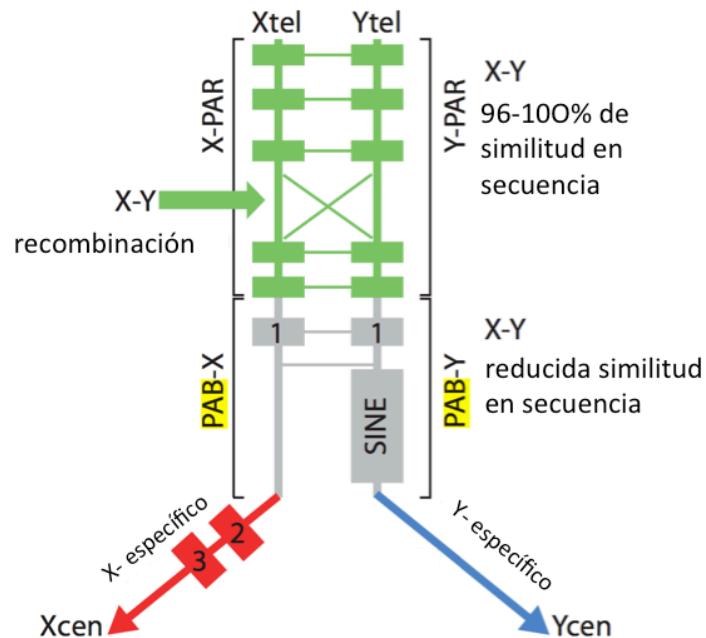


Figura 11. Estructura de PAR. Las regiones pseudoautosómicas se encuentran en verde, mientras que el límite de la región pseudoautosómica se señala en gris. Las líneas verticales indican homología en la secuencia. Las líneas verdes cruzadas señalan el sitio de recombinación entre el cromosoma X y Y. Los rectángulos con los números 1, 2 y 3 representan tres exones de un gen. El exón 1 se localiza en PAB y está presente en ambos cromosomas, los exones 2 y 3 sólo están presentes en el cromosoma X. Imagen modificada de Raudsepp T, *et al.*, 2011.

La región pseudoautosómica 1 (PAR1) se localiza en el extremo del brazo corto del cromosoma X (Xp22.3) y del Y (Yp11.3), tiene una longitud de 2.6 Mb y contiene aproximadamente 24 genes, los cuales escapan a la inactivación del cromosoma X (Tabla 2). Esta región debe recombinar entre el X y el Y para llevar a cabo la meiosis masculina (Helena Mangs A y Morris BJ, 2007).

Tabla 2. Genes con *loci* en PAR1. (Helena Mangs A y Morris BJ, 2007)

Gen	Nombre alternativo	Proteína
<i>PLCXD1</i> (Phosphatidylinositol- specific phospholipase C, X domain containing 1)	<i>FLJ11323</i>	Función desconocida.
<i>GTPBP6</i> (GTP binding protein 6)	<i>PGPL</i>	Función desconocida.
<i>PPP2R3B</i> (Protein phosphatase 2, regulatory subunit B)	<i>PPP2R3L, PR48</i> proteína	Ejerce un control regulador sobre la iniciación de la replicación del DNA. La sobreexpresión de <i>PR48</i> provoca la detención del ciclo celular en G1.
<i>SHOX</i> (Short stature homeobox)	<i>PHOG, GCFX, SS, SHOXY</i>	Gen homeobox . Factor de transcripción relacionado con síndromes de talla baja.
<i>CRLF2</i> (Cytokine receptor-like factor 2)	<i>CRL2, TSLPR</i>	Citosina que mejora el proceso de maduración de las células dendríticas y promueve la proliferación de células T CD4 +.
<i>CSF2RA</i> (Colony-stimulating factor 2 receptor, alpha)	<i>CD116, GMCSFR</i>	Subunidad alfa del receptor para el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).
<i>IL3RA</i> (Interleukin 3 receptor, alpha)	<i>CD123</i>	Subunidad alfa de los receptores para la interleucina 3.
<i>SLC25A6</i> (Solute carrier family 25, member A6)	<i>ANT3, ANT3Y, MGC17525</i>	Miembro de la familia translocasa ADP / ATP, que participa en la homeostasis celular inmune.
<i>ASMTL:</i> (Acetylserotonin O-methyltransferase-like)	<i>ASMTLX</i>	Función desconocida.

<i>P2RY8</i> (Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8)	<i>P2Y8</i>	Miembro de los receptores acoplados a proteína G de la familia de genes de receptores acoplados.
<i>CXYorf3</i>	<i>XE7, XE7Y, DXYS155E, MGC39904,</i> antígeno de superficie en linfocitos B 721P	Regulador del corte y empalme alternativo.
<i>ASMT</i> (Acetylserotonin O-methyltransferase)	<i>HIOMT, ASMTY, HIOMTY</i>	Cataliza la reacción final de la síntesis de melatonina.
<i>DHRSXY</i> (Dehydro- genase/reductase (SDR family) X-linked)	<i>DHRS5X, DHRS5XY, DHRSY, DHRS5Y</i>	Oxidorreductasa de la familia deshidrogenasa / reductasa de cadena corta.
<i>ZBED1</i> (Zinc finger, BED-type containing 1)	<i>TRAMP, ALTE, KIAA0785</i>	Participa en la transposición de elementos.
<i>CD99</i> (CD99 molecule)	<i>MIC2, CD99</i> antígeno, “antígeno identificado por anticuerpos monoclonales” 12E7, F21 and O13”	Molécula de la superficie celular que participa en los procesos de adhesión de células T.
<i>XG:</i> (XG blood group)	<i>PBDX,</i> “XG grupo sanguíneo, región limitante pseudoautosómica dividida en el cromosoma X.	Codifica para un antígeno que tiene 48% de homología con CD99. En el Y es un fragmento génico

La región pseudoautosómica 2 (PAR2) se encuentra en Xq28 y en Yq12, tiene una longitud de 320 kb. Esta región tiene una frecuencia menor de recombinación que la PAR1 ya que no es necesaria, ni suficiente para la formación de gametos masculinos. Cuatro genes tienen su *locus* en esta región: *SPRY3* (*Homolog 3 of Drosophila sprouty*), *SYBL1* (*synaptobrevin-like 1*), *IL9R* (*interleukin 9 receptor*) y *CXYorf1* (*chromosome X Y open reading frame1*) (Helena Mangs A y Morris BJ, 2007) (Figura 12).

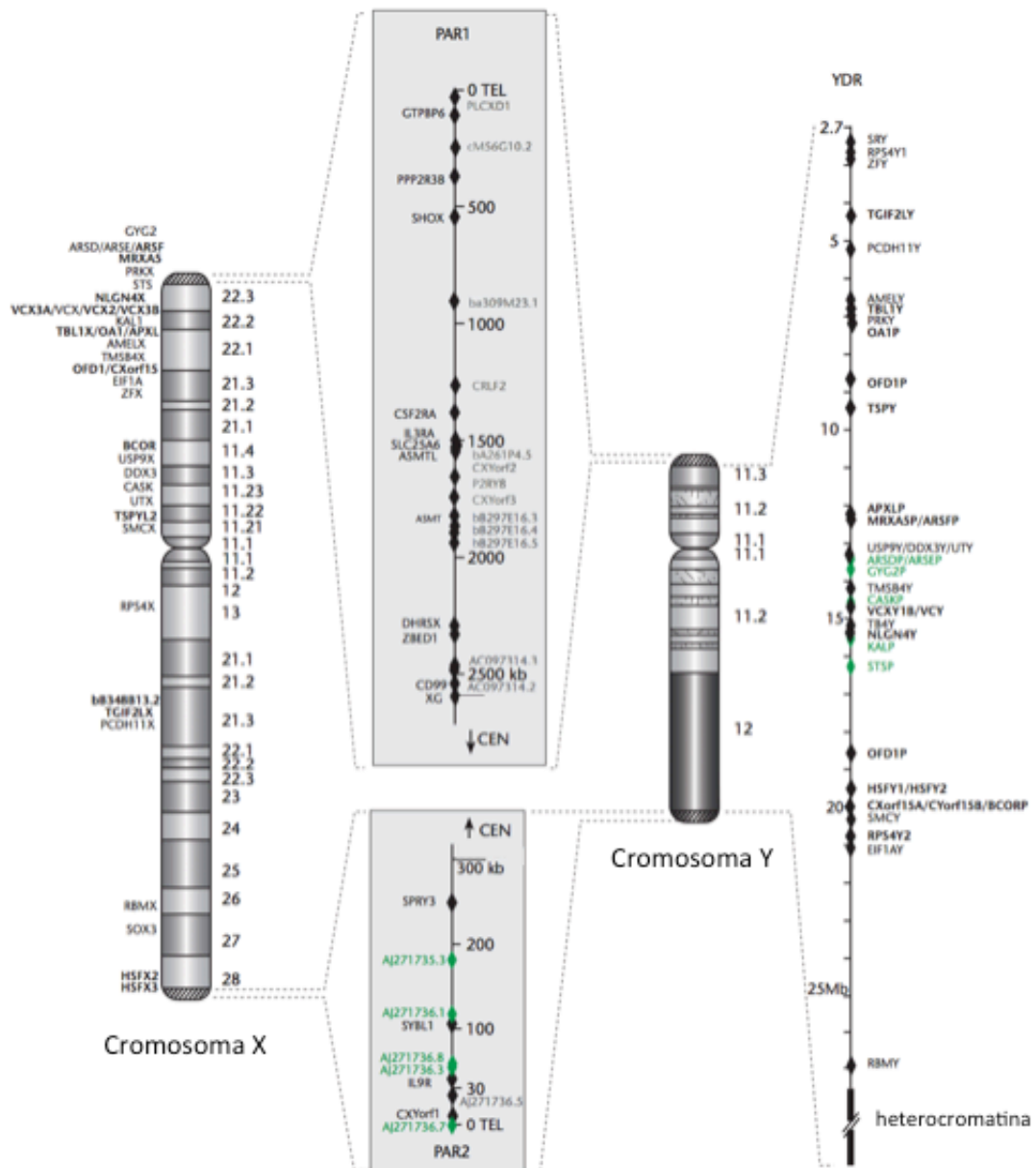


Figura 12. Mapa de los genes homólogos en los cromosomas X y Y. Genes (color negro) y pseudogenes (color verde) de la PAR1 y PAR2. Además muestra los genes de la región no recombinante del X y Y. Imagen modificada de El-Mogharbel N y Graves JAM, 2008.

Desde el punto de vista evolutivo se considera que las regiones pseudoautosómicas son reliquias de diferentes adiciones y rearrreglos con los autosomas (Ciccodicola A, 2000). Esto se fundamentó en que estas regiones difieren entre especies, así por ejemplo, los marsupiales tienen cromosomas sexuales pequeños que no presentan recombinación, mientras que en los monotremas el X y el Y se alinean entre el brazo corto del X y el brazo largo del Y. (Minkovsky A, *et al.*, 2012).

Se realizó la clonación y mapeo de genes homólogos a los humanos presentes en ovejas y perros como por ejemplo *PRKX* y *STS* así como genes presentes en la PAR1 (*ANT3* y *CSF2RA*), y se demostró que todos estos genes son pseudoautosómicos en las ovejas y los perros y que fueron parte de los cromosomas sexuales hace aproximadamente 80 millones de años. Esto significa que la PAR ancestral de los euterios era más grande que la PAR en humanos. El mapeo de los genes *STS*, *ANT3* y *CSF2RA* en marsupiales demostró que estos se encuentran en diferentes autosomas, así como otros 7 genes que se encuentran en Xp en los humanos, lo anterior implica que la PAR de los euterios fue parte de cromosomas autosómicos y cuya adición a los cromosomas X y Y ocurrió en un periodo de entre 80 y 130 millones de años (Helena Mangs A y Morris BJ, 2007).

El cromosoma X contiene muchos genes que desempeñan un papel vital en ambos sexos. En los humanos la mujer tiene dos cromosomas X mientras que el varón tiene un sólo cromosoma X y un cromosoma Y. Si los genes presentes en el cromosoma X se expresaran por igual en ambos sexos, las mujeres producirían el doble de productos génicos en comparación con los hombres, por lo que de no contarse con los mecanismos de regulación, esta diferencia alteraría el equilibrio metabólico entre mujeres y hombres (Gartler SM y Goldman MA, 2005; Pessia E, *et al.*, 2013).

En 1931 Hermann Joseph Müller propuso que debería de haber una compensación de dosis génica entre ambos sexos y describió el proceso en *Drosophila melanogaster*. En 1949, Barr y Bertram observaron al realizar experimentos de neurocitología en gatas la presencia de una masa que se teñía con mayor intensidad en el núcleo de las células en interfase y ésta sólo se observaba en las hembras. En 1951 Barr reconoció que esta masa se encontraba en el borde interno de la membrana nuclear y se relacionaba con el sexo femenino, por lo que se nombró cromatina sexual o corpúsculo de Barr. Su hipótesis original proponía que el cuerpo de Barr estaba formado por los dos cromosomas X (Barr ML y Bertram EG, 1949) posteriormente Susumu Ohno y colaboradores demostraron que la cromatina X corresponde a la condensación de sólo un cromosoma X (Ohno S, *et al.*,

1959). Treinta años más tarde este fenómeno se reconoció en mamíferos y con base a las observaciones de Mary Lyon se plantearon las siguientes hipótesis (Lyon MF, 1961; Payer B y Lee JT, 2008):

1. El cromosoma X condensado resulta genéticamente inactivo, es decir, la cromatina presenta diferentes cambios para aumentar su nivel de condensación y convertirse en heterocromatina, además de la exclusión de la maquinaria de transcripción, con lo anterior se evita que se lleve a cabo la transcripción de los genes presentes en dicho cromosoma.
2. La primera inactivación ocurre durante el desarrollo embrionario temprano, tal vez en estado de blastocisto, cuando se inactiva al azar el X materno o paterno.
3. La inactivación del X ocurre de manera clonal, es decir, una vez inactivado el X materno o paterno de una célula se inactivará el mismo cromosoma en las células descendientes.

Actualmente, se ha establecido que la inactivación del X es un proceso epigenético que se lleva a cabo en múltiples pasos:

1. Recuento de los cromosomas X.
2. Elección del X que permanecerá activo.
3. Inicio de la inactivación de los cromosomas X adicionales.
4. Extensión de la inactivación de los cromosomas X (Pontier DB y Gribnau J, 2011).

En el desarrollo temprano se desencadena el proceso de inactivación del X a partir de una región cromosómica específica denominada centro de inactivación del X (XIC, por sus siglas en inglés) que se encuentra en Xq13, abarca un segmento aproximado de 660 a 1 200 kb (Avner P y Heard E, 2001). Dentro de esta región se encuentra el gen *XIST* (del inglés *X-inactive specific transcript*) encargado de iniciar la inactivación del cromosoma. El gen *XIST* está formado por 8 exones y codifica para un RNA de aproximadamente 17 kb de longitud (Minkovsky A, *et al.*, 2011), el cual cubre al cromosoma X inactivo (Xi) (Simon MD, *et al.*, 2013).

Gran parte del conocimiento obtenido acerca de la inactivación del cromosoma X se ha logrado gracias a experimentos en ratones, en ellos se ha observado que las moléculas de RNA de Xist cubren al cromosoma X y activan el silenciamiento transcripcional mediante la exclusión de la RNA polimerasa II (Ohhata T y Wutz A, 2013). Este proceso es seguido por la pérdida de las marcas de la cromatina activa y el establecimiento de marcas de

silenciamiento de la cromatina, que ocurren en una secuencia ordenada de eventos e incluyen:

1. La trimetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27me3) por el complejo Polycomb PRC2.
2. La metilación del DNA en regiones promotoras.
3. El reclutamiento de la variante de la histona macroH2A (Minkovsky A, *et al*, 2011).

En el ratón se ha observado que en el extremo 3' de *Xist* se encuentra la región promotora y los elementos reguladores para la expresión de este gen (Ohhata T y Wutz A, 2013). Los factores de represión Oct4, Sox2 y Nanog se separan del intrón 1 de *Xist* y se les unen los factores de transcripción RNF12 y JPX, lo cual permite y aumenta la expresión de *Xist* (Payer B, *et al*, 2011)(Figura 13).

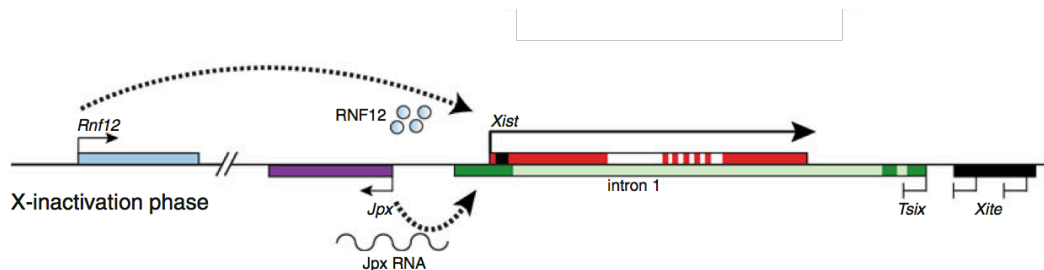


Figura 13. Modelo de *Xist*, se muestra la presencia de factores de transcripción RNF12 y JPX que permite la transcripción de *Xist* en el X inactivo. Imagen modificada de Payer B, *et al*, 2011.

El producto de *Xist* es un RNA no codificante que se acumula a lo largo del cromosoma X inactivo y se encarga de mediar las modificaciones de la cromatina (Ohhata T y Wutz A, 2013). El primer cambio detectado es la depleción de los factores asociados con la transcripción, como por ejemplo la pérdida de la RNA polimerasa II. Posteriormente se lleva a cabo la pérdida de las marcas de las histonas activas, entre ellas la trimetilación de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4me3) y la acetilación de la histona 3 (H3ac), seguida de la ganancia de las marcas en la cromatina asociadas al grupo Polycomb (Payer B, *et al*, 2011).

El complejo represivo Polycomb 1 (PRC1, *polycomb repressive complex 1*) regula la monoubiquitinización de la lisina de la histona H2A, en la posición 119 (H2AK119ub1) y el complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3). La cromatina del Xi se modifica adicionalmente cuando avanza la diferenciación celular, esto implica el reclutamiento de factores adicionales, como la variante de la histona macroH2A y la proteína grupo Trithorax ASH2L (Ohhata T y Wutz A, 2013), el resultado es que el Xi se replica tardíamente en la fase S (Minkovsky A, *et al.*, 2011) (Figura 14).

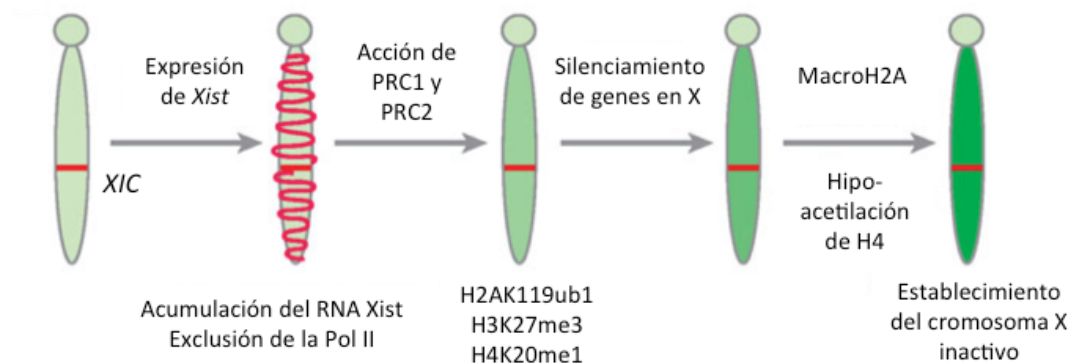


Figura 14. Proceso de inactivación del X, se muestra los principales mecanismos de la inactivación del X. Se inicia con la expresión de XIST, posteriormente las modificaciones en la metilación y acetilación de las histonas, así como el cambio de la histona H2A por la histona MacroH2A. Imagen modificada de Ohhata T y Wutz A, 2013.

Tsix es un gen antisentido y regulador de *Xist*, el cual se produce antes de la inactivación al azar del X, una vez que el proceso de inactivación inicia se reprime en ese cromosoma la transcripción de *Tsix*. En el cromosoma X que permanecerá activo se le unen las proteínas Oct4, Sox2 y Nanog al intrón 1 de *Xist* inhibiendo su transcripción. Además Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc y Rex1 se unen al potenciador de *Tsix* causando su activación; *Tsix* a su vez es un inhibidor de la expresión *Xist* (Payer B, *et al.*, 2011) (Figura 15).

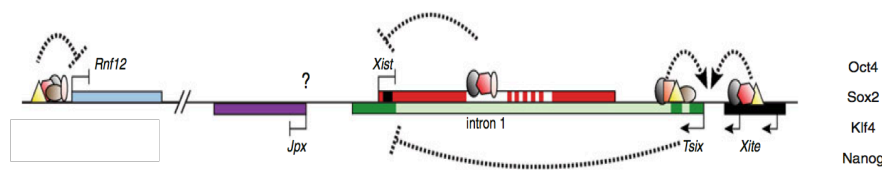


Figura 15. Modelo para la expresión de *Tsix*. Se muestran los factores de transcripción que participan en la represión de la expresión de *Xist* y en el mantenimiento del X transcripcionalmente activo. Payer B, *et al.*, 2011.

Se ha sugerido que un 15% de los genes en el cromosoma X escapan a la inactivación (Zhang Y, *et al.*, 2013). La distribución de estos genes no es al azar, se encuentran agrupados en largos dominios que abarcan entre 100kb y 7Mb y la mayoría se localizan en el brazo corto del cromosoma X, esto probablemente se deba a que esta región divergió más recientemente del cromosoma Y, otro factor que pudiera intervenir es la cercanía con la heterocromatina del centrómero del cromosoma X, la cual pudiera prevenir la correcta extensión del RNA de *XIST* (Berletch JB, *et al.*, 2011).

La región que escapa a la inactivación del cromosoma X se caracteriza por presentar marcas epigenéticas como la acetilación de H3 y H4, así como la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3. Existe evidencia que hay elementos en el límite de la región silenciada y la región activa, como proteínas aislantes que impiden que la heterocromatina se extienda a las regiones de escape o viceversa, que la eucromatina se extienda a las regiones silenciadas, se ha propuesto que una de estas proteínas pudiera ser CTCF (Berletch JB, *et al.*, 2011) (Figura 16).

En el 2013 Zhang y colaboradores reportaron que existen 114 genes que escapan a la inactivación del X, de estos el 10% se encuentran en las PARs, los restantes se ha propuesto que intervengan en el desarrollo sexual, así como en el desarrollo cerebral (Zhang Y, *et al.*, 2013). Se ha descrito que mutaciones en estos genes pueden causar incapacidad intelectual, como en *KDM5C* que causa además epilepsia, agresión y autismo (Berletch JB, *et al.*, 2011). Algunos de los genes que se encuentran fuera de las PARs y escapan a la inactivación X tienen homólogos funcionales en el cromosoma Y, sin embargo, hay genes como *UBE1* y *SB1.8* que escapan a este proceso, pero tienen homólogos en el cromosoma Y. Otros genes, como *KAL1* y *STS* presentan homólogos en el cromosoma Y pero estos son pseudogenes no funcionales (Zhang Y, *et al.*, 2013).

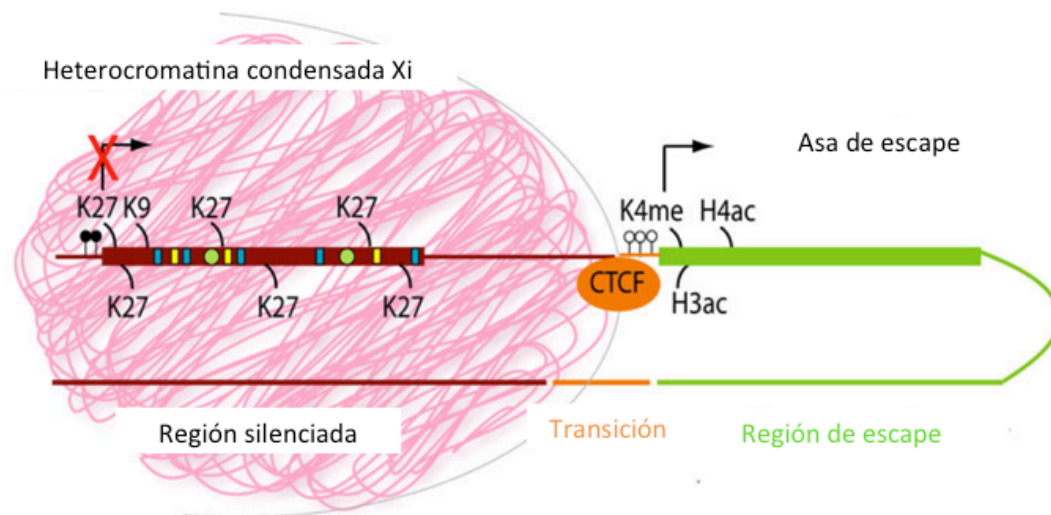


Figura 16. Representación de las características moleculares de la región inactivada del X y de la región que escapa a este proceso. En la región silenciada, las líneas rosas representan el RNA no codificante de *XIST* que cubre el área, los círculos verdes son las modificaciones a las histonas, como H3K27me3 y H3K9me3, así como la variante de histona macroH2A, los círculos negros son las islas CpG metiladas que inactivan la expresión de los genes. En la región de escape se muestran las modificaciones a las histonas relacionadas con una región transcripcionalmente activa, como la acetilación de H3 y H4 y la metilación de lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3) y los círculos blancos representan las islas CpG no metiladas. Entre las dos regiones se encuentra la proteína CTCF. Imagen modificada de Berletch JB, *et al.*, 2011.

1.3.2 Cromosoma Y

El cromosoma Y humano es un cromosoma que corresponde al grupo G y contiene 1.6% del genoma. Muestra una densidad génica muy baja, con 59 genes codificantes para proteínas (Li X, 2011) (Figura 17).

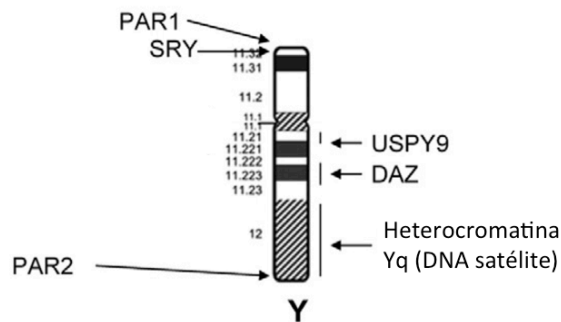


Figura 17. Estructura del cromosoma Y. Se señala la ubicación de la PAR1 y 2, así como el locus del gen *SRY*, entre otros. Imagen tomada de Li X. 2011.

El gen *SRY* (del inglés: *sex-determining region on the Y*) se localiza en Yp11.31 y se expresa de manera breve al inicio del desarrollo en las células de la cresta germinal. Este gen codifica para un factor de transcripción, el cual participa en la determinación sexual (Tyler-Smith C, 2005).

Se requiere de la acción de muchos genes durante el proceso de fertilidad en el hombre y la mayoría de ellos se encuentran en cromosomas autosómicos, sin embargo también se han encontrado genes necesarios para la espermatogénesis en el cromosoma Y. En 1976, Tiepolo y Zuffardi demostraron que deleciones de la región eucromática de Yq se asociaban con azoospermia y por lo tanto con infertilidad, por lo que se estableció que dentro del cromosoma Y se encuentran genes llamados factores de azoospermia o AZF (del inglés: *azoospermia factors*), se han descrito tres regiones en Yq: AZFa, AZFb y AZFc (Tiepolo L y Zuffardi O, 1976; Wegner RD y Bloechle M, 2009) (Figura 18).

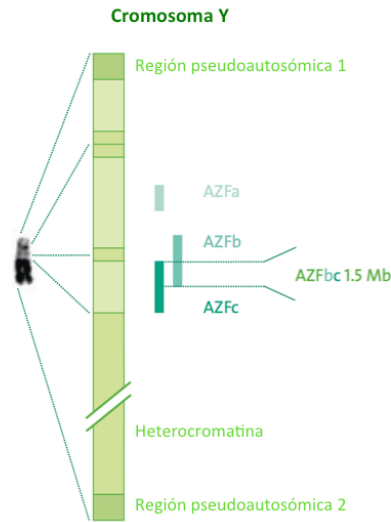


Figura 18. Regiones AZFa, AZFb y AZC. Imagen modificada de Wegner RD y Bloechle M, 2009.

Los genes en el cromosoma Y se dividen en:

- Regiones recombinantes PAR1 y PAR2 (descritas anteriormente).
- Regiones no recombinantes (*NRY-non recombining region on the Y chromosome*): Representa el 95% del cromosoma Y, y se subdividen en tres clases:
 NRY clase 1, se caracterizan por presentar genes de mantenimiento y por lo tanto tienen homólogos en el cromosoma X.
 NRY clase 2, se caracterizan por tener genes que codifican para llevar a cabo la espermatogénesis. Son genes que se encuentran exclusivamente en el cromosoma Y.
 NRY clase 3, son genes con funciones variables. (Affara NA y Sargent CA, 2005) (Tabla 3).

Tabla 3. Genes de las regiones no recombinantes del cromosoma Y. (Affara NA y Sargent CA, 2005).

Clase	Genes	Función	Tejido donde se expresan	Homólogo en el X	Inactivación en el X
NRY clase 1	<i>RPSR, ZFY, USP9Y, DBY, UTY, TB4Y, SMCY, EIFAY</i>	Genes de mantenimiento	Varios	Sí	No
NRY clase 2	<i>TTY1, TSPY, PRY, TTY2, CDY, XKRY, CDY, XKRY, DAZ, BPY2</i>	Espermatogénesis	Testículo	No	-
NRY clase 3	<i>SRY, RBMY, AMELY, VCY, PCDHY</i>	Determinación sexual Espermatogénesis Desarrollo de dientes Función desconocida Función desconocida	Testículo Testículo Dientes Testículo Testículo	Sí	Sí Sí Tal vez Se desconoce No

1.4 Aberraciones cromosómicas

Las alteraciones cromosómicas son definidas como el cambio que produce una alteración visible de los cromosomas, lo cual depende de la resolución de la técnica citogenética utilizada (Luthardt FW y Keitges E, 2001). Se describen también como los cambios en cromosomas que son resultado de mecanismos específicos como alteración en la reparación de rupturas de cromosomas, recombinación homóloga no alélica o segregación incorrecta durante la mitosis o meiosis (Shaffer LG, 2005).

Aberraciones cromosómicas específicas se han asociado con más de 60 síndromes, están presentes en al menos el 50% de los abortos espontáneos, el 6% de los mortinatos, el 5% de las parejas con dos o más abortos espontáneos y aproximadamente en el 0.5% de los recién nacidos. En las mujeres de 35 o más años de edad las anomalías cromosómicas se detectan en aproximadamente el 2% de todos los embarazos (Luthardt FW y Keitges E, 2001). Las alteraciones cromosómicas pueden clasificarse en dos tipos: numéricas y estructurales (Luthardt FW y Keitges E, 2001).

1.4.1 Aberraciones numéricas

Las anomalías numéricas consisten en la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas, se pueden clasificar en poliploidías y aneuploidías (Robinson WP y McFadden DE, 2002).

Poliploidía

Se define como la ganancia de cromosomas en número haploide, en el caso de los humanos se consideran en múltiplos de 23, como triploidía (69 cromosomas) o tetraploidía (92 cromosomas) (Robinson WP y McFadden DE, 2002). Se ha reportado que los casos de triploidía son relativamente frecuentes en abortos espontáneos, la supervivencia más allá de la mitad del embarazo es rara. La triploidía puede estar causada por la fecundación de un óvulo por dos espermatozoides situación que se conoce como dispermia. También pueden ocurrir por una alteración en la división meiótica en el óvulo o en el espermatozoide lo que da lugar a un gameto diploide. La tetraploidía es mucho más rara, se debe a la falla en la primer división celular del cigoto y en la mayoría de los casos es letal (Kasahara M, 2013).

Aneuploidía

Se refiere a las alteraciones que no son múltiplos del número haploide y en donde hay ganancia o pérdida de uno o más cromosomas. Se le denomina monosomía a la pérdida de un cromosoma y trisomía a la ganancia de un cromosoma (Delhanty J, 2010).

Los mecanismos por los que se puede originar una aneuploidía son:

- No disyunción meiótica.

El error de no disyunción puede ocurrir durante la formación de gametos en meiosis I ó II. Este tipo de alteración se produce de manera más frecuente durante la meiosis femenina y se encuentra relacionada a la edad materna avanzada (Robinson WP y McFadden DE, 2002).

- No disyunción mitótica.

La no disyunción también puede suceder durante una división mitótica inicial en el cigoto, esto da lugar a la presencia de dos ó más líneas celulares situación que se conoce como mosaicismo (Robinson WP y McFadden DE, 2002).

La no disyunción puede resultar de una alteración en el anclaje del huso mitótico; durante la anafase. Para que la separación de las cromátidas hermanas se lleve a cabo de forma correcta se requiere que los microtúbulos del huso mitótico procedentes de polos opuestos de la célula, se anclen a cada cromátida hermana a través del cinetocoro, a esta configuración se le conoce como anfitélica (Walczak CE, *et al.* , 2010). Sin embargo, durante el proceso de anclaje pueden ocurrir configuraciones incorrectas, como por ejemplo (Figura 19):

-Monotélica: sólo una de las dos cromátidas se ancla al huso mitótico, el segundo cinetocoro no se ancla y por lo tanto no se genera tensión centromérica, con lo cual se activa el punto de control de la anafase y se retrasa la entrada en esta etapa para permitir la corrección del error. Si el proceso de reparación falla, la cromátida no anclada podría incluirse al azar en cualquiera de las dos células hijas lo que generaría aneuploidía (Walczak CE, *et al.* , 2010).

-Sintélica: las dos cromátidas hermanas se anclan a microtúbulos del huso que proceden del mismo polo, esta situación tampoco genera tensión centromérica, con lo cual se activa el punto de control de la anafase. Si no se corrige, ambas cromátidas se dirigirán a la misma célula hija generando una aneuploidía (Walczak CE, *et al.* , 2010).

-Merotélica: al menos una cromátida se ancla simultáneamente al huso mitótico de ambos polos. Esta situación genera tensión centromérica, por lo que no activa el punto de control. La cromátida unida a ambos polos simultáneamente permanecerá como un cromosoma retrasado en anafase y finalmente se romperá en dos fragmentos, que se repartirán entre las células hijas, generando aneuploidía (Walczak CE, *et al.*, 2010).

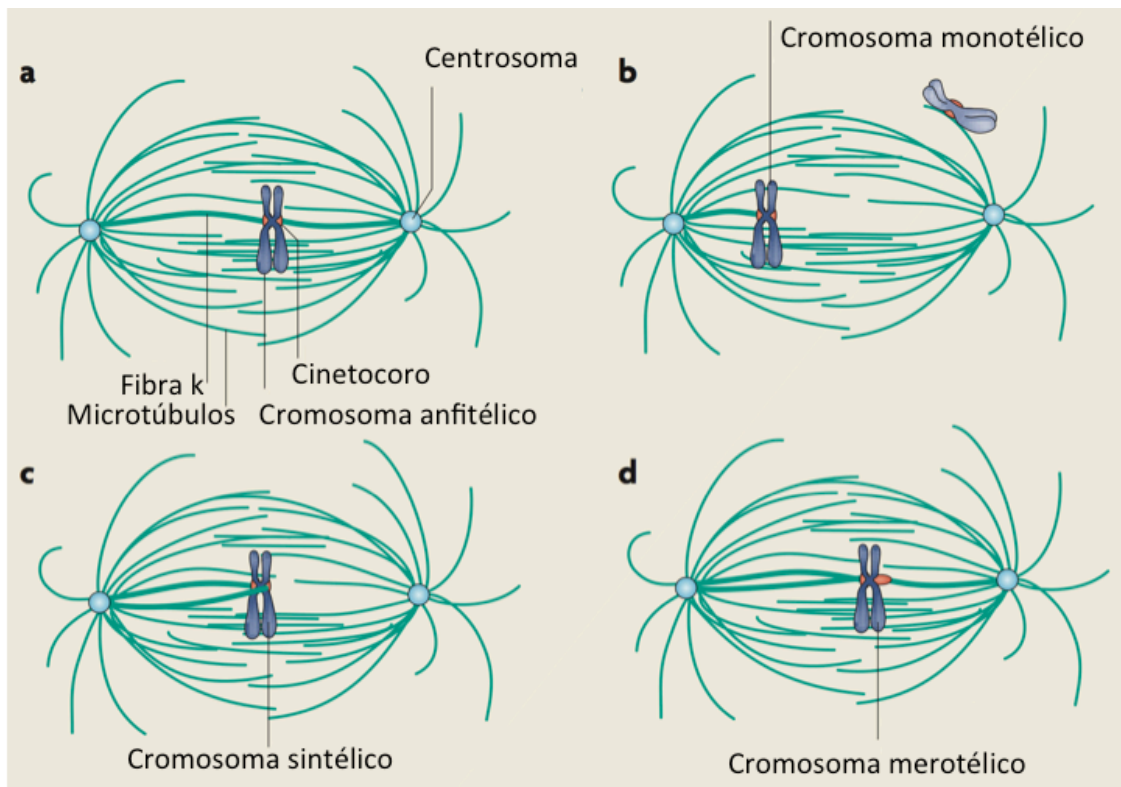


Figura 19. Configuraciones del huso mitótico. a) Anfitélico b) Monotélico c) Sintético d) Merotélico. Imagen modificada de Walczak CE, *et al.*, 2010.

1.4.2 Aberraciones estructurales

Las alteraciones estructurales se presentan cuando hay un cambio en la estructura o en los componentes de un cromosoma, se pueden clasificar en rearrreglos balanceados cuando no hay pérdida ni ganancia de material genético o en rearrreglos desbalanceados al presentarse pérdida o ganancia de material genético (Luthardt FW y Keitges E, 2001).

Las alteraciones estructurales cromosómicas comprenden (Moore CM, Best RG, 2001):

- **Delección:** consiste en la pérdida de parte de un cromosoma y se traduce en una monosomía para ese segmento por lo que se trata de un rearrreglo desbalanceado. Se clasifican en:
 - Delecciones terminales (Figura 20a): se producen en un extremo del cromosoma e involucran sólo un punto de ruptura.
 - Delecciones intersticiales (Figura 20b): se presentan dos puntos de ruptura.

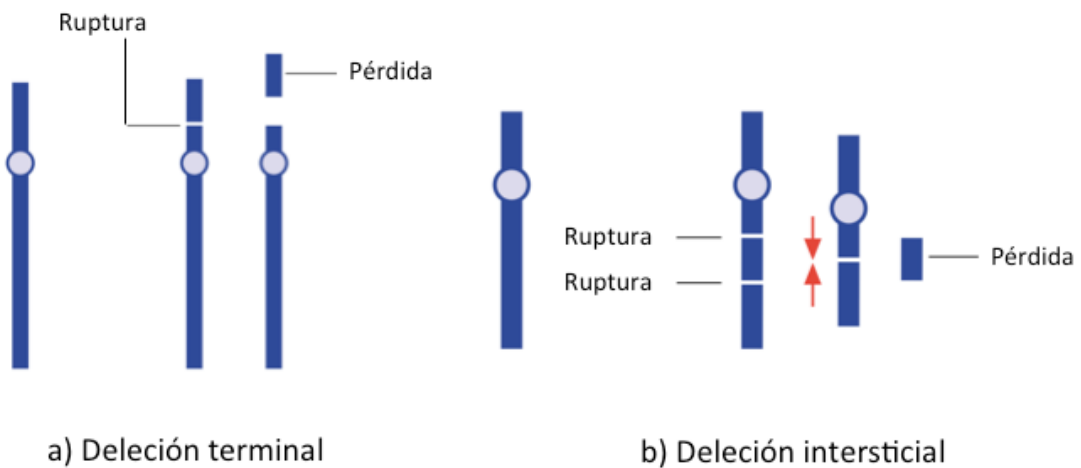


Figura 20. Mecanismo de formación de delecciones. a) Delección terminal. b) Delección intersticial. Imagen modificada de Moore CM, Best RG, 2001.

- **Duplicación:** es un rearrreglo cromosómico desbalanceado que implica la presencia de una copia extra de un segmento cromosómico que resulta en una trisomía parcial, generalmente es debido a una recombinación no homóloga que dará lugar a duplicación y delección (Figura 21).

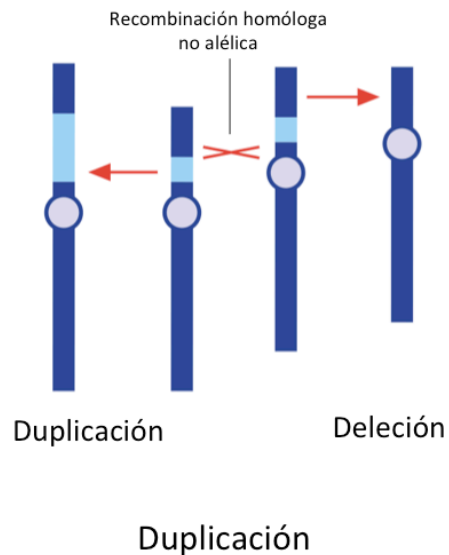


Figura 21. Mecanismo de formación de duplicaciones. Imagen modificada de Moore CM, Best RG, 2001.

- **Isocromosoma:** se refiere a un cromosoma que muestra una imagen en espejo de dos brazos cromosómicos iguales a ambos lados del centrómero. Se trata de un rearrreglo desbalanceado. Existen dos mecanismos de formación:
 - a. Ruptura y fusión de las cromátidas hermanas de un cromosoma duplicado involucrando el centrómero.
 - b. División horizontal del centrómero, proceso conocido como fisión centromérica .

- **Inversiones:** ocurren cuando se presentan dos puntos de ruptura en un cromosoma, el segmento cromosómico resultante rota 180° sobre sí mismo y se coloca en el mismo cromosoma en forma invertida, quedando la secuencia de genes alterada. Por lo general no hay pérdida ni ganancia de material genético por lo que se trata de un rearrreglo balanceado. Existen dos tipos de inversiones:
 - Inversión pericéntrica (Figura 22a): cuando el segmento invertido involucra al centrómero, esto da lugar a modificaciones en la dirección del patrón de bandas y en la morfología del cromosoma con respecto al centrómero.
 - Inversión paracéntrica (Figura 22b): cuando los puntos de ruptura no involucran la región del centrómero, se cambiará el patrón de bandas pero no la morfología del cromosoma con respecto a la posición del centrómero.

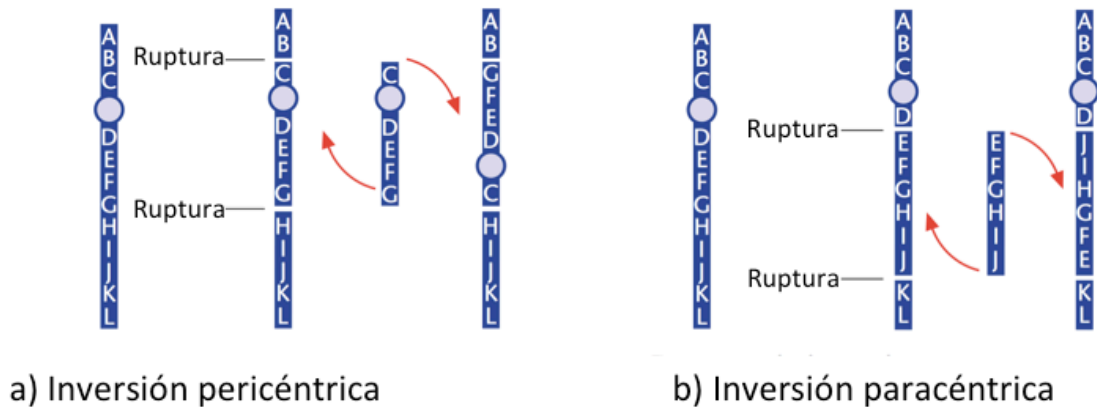
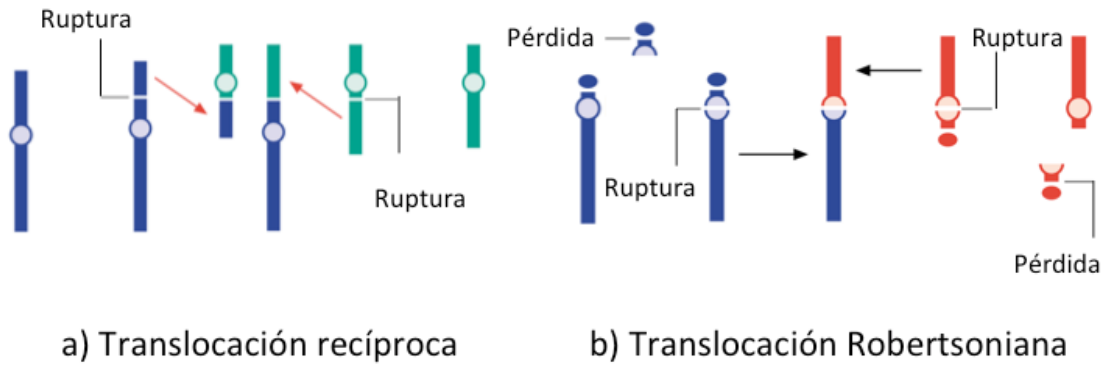


Figura 22. Mecanismo de formación de inversiones. a) Inversión pericéntrica. b) Inversión paracéntrica. Imagen modificada de Moore CM, Best RG, 2001.

Los portadores de las inversiones producen gametos desbalanceados, esto se debe a la formación de una horquilla en el segmento invertido para que se pueda llevar a cabo el entrecruzamiento entre el cromosoma alterado y el cromosoma normal. La estructura de horquilla se forma después de que los cromosomas se han replicado de manera que el bivalente se compone de cuatro cromátidas, dos cadenas normales y dos invertidas. Los gametos anormales se forman cuando los eventos de recombinación se producen dentro de la estructura de horquilla, como resultado la cromátida recombinante tendrá tanto la duplicación de un segmento como la delección de otro segmento. Con lo que, si la inversión es pericéntrica un cromosoma tendrá una duplicación de la región distal del brazo corto, con la respectiva delección en el brazo largo y el otro tendrá la duplicación del brazo largo y la delección del brazo corto. Si la inversión es paracéntrica se generará un cromosoma dicéntrico y uno acéntrico.

- **Translocación:** intercambio de material genético entre cromosomas no homólogos, los tipos de translocaciones son:
 - Translocación recíproca o balanceada (Figura 23a), cuando sucede el intercambio de fragmentos de dos cromosomas sin pérdida de material genético.
 - Translocación robertsoniana o fusión céntrica (Figura 23b), se lleva a cabo entre dos cromosomas acrocéntricos, con la pérdida de sus brazos cortos y la posterior unión de los brazos largos.



a) Translocación recíproca

b) Translocación Robertsoniana

Figura 23. Mecanismo de formación de translocaciones. a) Translocación recíproca balanceada. b) Translocación Robertsoniana . Imagen modificada de Moore CM, Best RG, 2001.

El apareamiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis está alterado en portadores de translocaciones ya que en lugar de la formación normal de bivalentes, los dos cromosomas traslocados y sus dos homólogos normales se aparean para formar un cuadrivalente en forma de cruz con cada segmento homólogo apareado con su contraparte durante la etapa de paquiteno. Existen cuatro patrones de segregación básicos, en la mayoría de los casos dos de los cromosomas se dirigen a una célula hija y dos cromosomas a la otra, en raras ocasiones tres cromosomas segregan juntos, dejando uno separado:

- Segregación alterna: Ambos cromosomas normales se dirigen a un polo y ambos cromosomas translocados se dirigen a otro polo. En la cruz de paquiteno, los cromosomas encontrados en la diagonal se mueven a los mismos polos. Todos los gametos formados por esta segregación están balanceados.
- Segregación adyacente I: los centrómeros no homólogos son desplazados hacia el mismo polo, esto resulta en un complemento cromosómico no balanceado, que dará lugar a un cigoto con trisomía parcial para uno de los cromosomas y monosomía parcial para el otro una vez fertilizado por un gameto normal haploide.
- Segregación adyacente II: los centrómeros homólogos se desplazan hacia el mismo polo, esto resulta en grandes rearrreglos no balanceada, que son generalmente incompatible con la vida.

- Segregación 3:1: hace referencia al desplazamiento de 3 cromosomas de 4 hacia un mismo polo, y sólo uno al polo opuesto. Posterior a la fecundación por un gameto haploide, la concepción tendrá 47 cromosomas, a menos que el derivativo sea muy pequeño, la concepción no será viable. Otros productos de segregación resultan de recombinación en el segmento central (Figura 24).

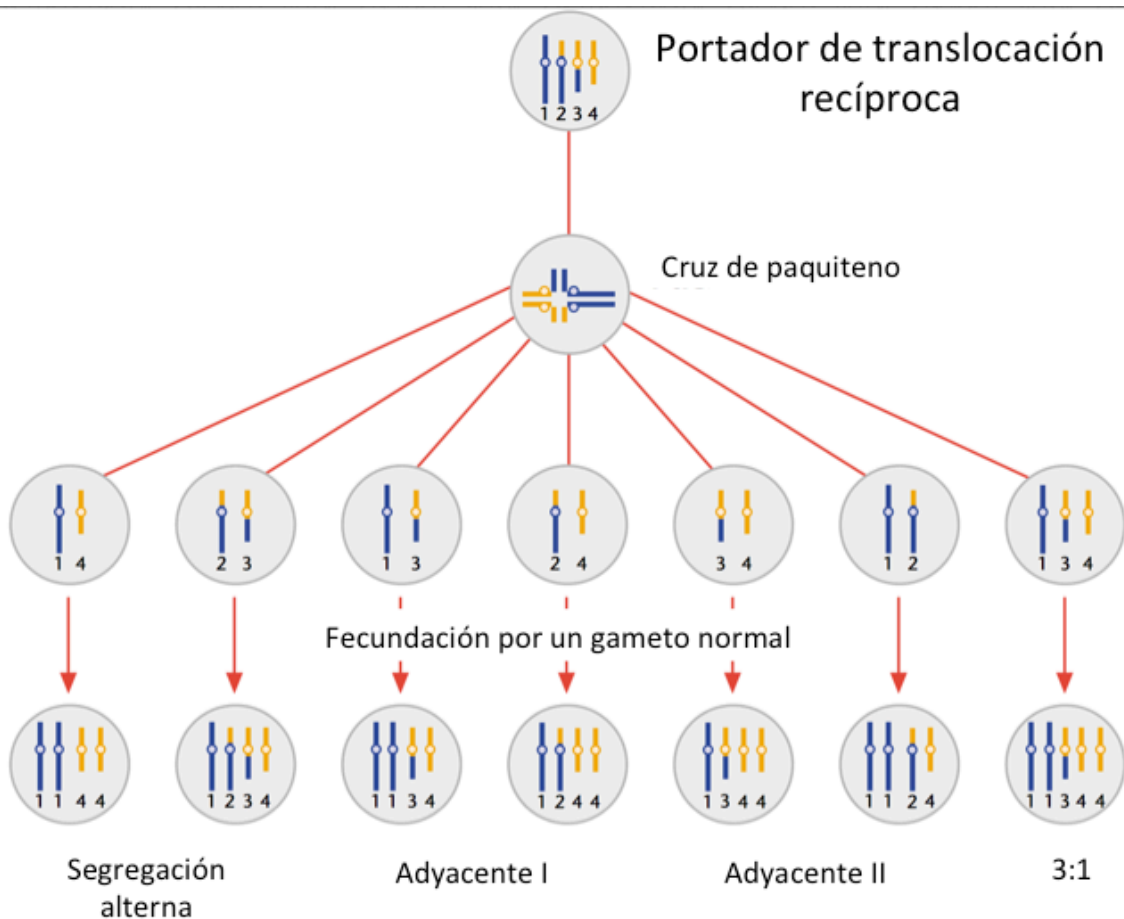


Figura 24. Segregación de portadores de una translocación recíproca. Se muestra la cruz de paquíteno con sus posibles resultados de la segregación alterna, adyacente 1, adyacente 2 y una de las posibilidades de segregación 3:1. Imagen modificada de Moore CM, Best RG, 2001.

- **Anillo:** es el resultado de una ruptura en cada brazo de un cromosoma y de la unión de sus extremos, ocasionando pérdida de material genético. Otro mecanismo sugerido en su formación es la fusión de secuencias subtelo méricas o telómero-telómero sin pérdida de genes (Figura 25).

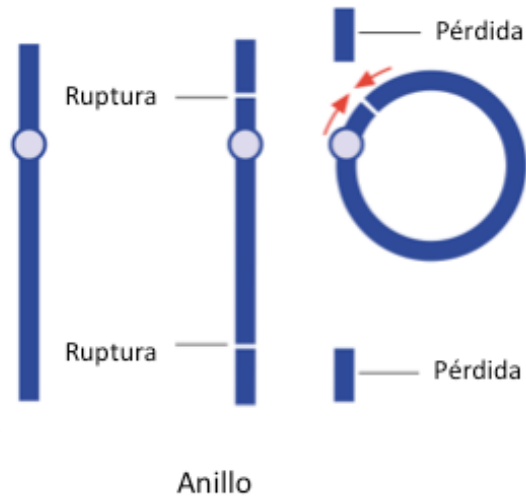


Figura 25. Mecanismo de formación de anillos cromosómicos. Figura modificada de Moore CM, Best RG, 2001.

1.5 Técnicas de citogenética

La citogenética es el área de la genética que comprende el estudio de los cromosomas, permite analizar la estructura y el número de cromosomas de una célula (Sharkey FH, *et al.*, 2005). El objetivo de todas las técnicas citogenéticas consiste en obtener una resolución óptima para todos los cromosomas o regiones cromosómicas específicas de interés (Hsieh CL, 2001). Existen dos tipos generales de técnicas para el análisis de los cromosomas:

1. Citogenética convencional
2. Citogenética molecular

1.5.1 Citogenética convencional

La citogenética convencional utiliza microscopía de luz para examinar, en metafase o prometafase, a los cromosomas. El cariotipo es el conjunto de cromosomas de una célula agrupados por pares homólogos y ordenados según su tamaño y la localización del centrómero. Este estudio tiene una resolución máxima de 3-5 megabases (Mb) para alteraciones estructurales y requiere de células en división, como leucocitos de sangre periférica, médula ósea o fibroblastos para su análisis (Sharkey FH, *et al.*, 2005).

El estudio se basa en dos etapas: siembra o cultivo y cosecha. El objetivo de la siembra es estimular el crecimiento celular ya que si bien algunos tipos de células presentan un crecimiento y división celular de forma espontánea, otras células, como los linfocitos, necesitan de la adición de factores mitogénicos para inducir la actividad mitótica. Existe una gran variedad de mitógenos para los linfocitos, el más utilizado es la fitohematoglutina (Moore CM y Best RC, 2001).

En la cosecha se lleva a cabo el arresto del ciclo celular en metafase, esto se hace mediante la interrupción de la formación del huso mitótico con la aplicación de sustancias como la colchicina. El tiempo de exposición a la colchicina depende de la actividad proliferativa de las células, las células con un alto índice proliferativo requieren de un periodo corto de exposición a una alta concentración, mientras que las células de crecimiento lento necesitan de una exposición más larga a una concentración más baja. La exposición prolongada a colchicina o el uso de concentraciones altas aumenta la proporción de cromosomas en metafase tardía, lo que resulta en cromosomas cortos. Una corta exposición con una alta concentración de colchicina reduce el número total de metafases,

por lo que se requiere de un tiempo de exposición óptimo para establecer un equilibrio entre estos parámetros (Pack SD y Stratakis CA, 2002).

Un elemento clave en la preparación de la extensión de cromosomas es el grado de dispersión de estos en el portaobjetos. La dispersión óptima implica el tratamiento con una solución hipotónica salina, la fijación de las células en suspensión y el goteo de las células en el portaobjetos de vidrio (Moore CM y Best RC, 2001). Posteriormente, los cromosomas deben de ser tratados con diferentes agentes químicos para generar patrones de bandeo específicos (Hsieh CL, 2001). El patrón de bandas es específico para cada cromosoma y su homólogo y permite la identificación individual de los cromosomas en el cariotipo humano (Riegel M, 2014).

Bandas QFQ

A finales de 1960 Caspersson postuló que las diferencias en la composición de bases del DNA podrían producir patrones de intensidad distintos a lo largo de la longitud de los cromosomas al teñirlos con colorantes, así nació el concepto de bandeo cromosómico. En 1968 se demostró el bandeo de cromosomas utilizando mostaza de quinacrina en células de plantas y en 1971 se estableció el patrón de bandas Q para los cromosomas humanos (Moore CM y Best RC, 2001).

La mostaza de quinacrina se intercala en regiones ricas en AT, produciendo una fluorescencia intensa, mientras que en las zonas ricas en CG produce una fluorescencia menor, de esta manera, los 24 cromosomas humanos pueden ser identificados (Bickmore WA, 2001). Otras sustancias fluorescentes producen patrones similares a los de la quinacrina, como Hoescht 33258, DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol) y diimidazolinofenidol (DIPI), estos patrones de bandas son consideradas como formas de bandas Q. En ocasiones se utiliza la contratinción de los cromosomas con un segundo colorante como distamicina A, actinomicina D o la manipulación del pH, con lo que se mejora la nitidez y el brillo de las bandas. El bandeo con esta técnica es sencillo, sin embargo, la visualización requiere de un microscopio para fluorescencia y de un fotomicroscopio para la captura de la tinción, ya que la fluorescencia tiene un tiempo de vida corto (Moore CM y Best RC, 2001).

Bandas GTG

Poco después de las bandas QFQ, se describió un segundo método utilizando Giemsa, llamado bandas GTG (del inglés *G-bands by trypsin and Giemsa staining*) (Holmquist GP, 2005). En esta técnica los cromosomas son pretratados con una enzima preteolítica, la tripsina, para eliminar las proteínas asociadas al DNA y permitir el paso del colorante, posteriormente se añade Giemsa, el cual produce un patrón de bandeo muy similar a las bandas Q, es decir las regiones ricas en AT presentan una tinción oscura, mientras que las ricas en CG una coloración más clara (Moore CM y Best RC, 2001) (Figura 26).



Figura 26. Fotografía en blanco y negro de una metafase con bandas GTG. (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

Este método ofrece la ventaja de producir laminillas permanentes que pueden ser estudiadas con un microscopio óptico estándar (Moore CM y Best RC, 2001). A través de esta técnica se puede obtener una resolución desde 350 a 400 bandas por grupo haploide de cromosomas, hasta 900 bandas en los cariotipos de alta resolución (Bickmore WA, 2001) (Figura 27).

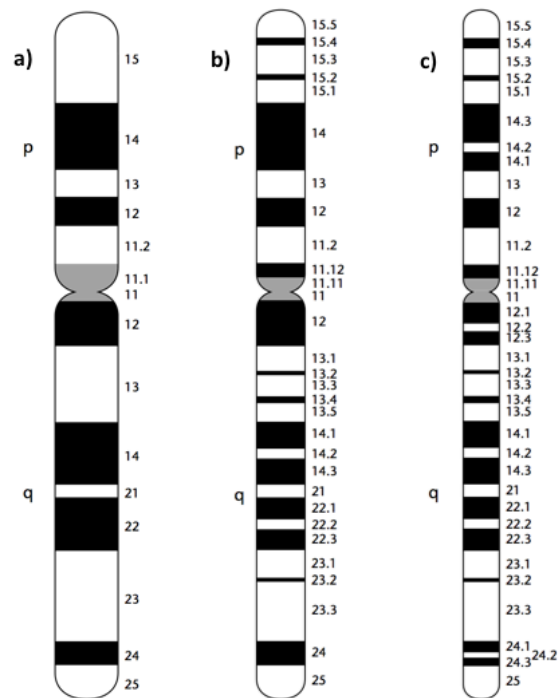


Figura 27. Ideograma con bandas GTG del cromosoma 11 humano. a) Resolución de 350 bandas. b) Resolución de 550 bandas. c) Resolución de 850 bandas. Imagen modificada de Bickmore WA, 2001.

Bandas RFA

Este patrón de bandeo es opuesto a las bandas GTG y se les conoce como bandas reversas, pueden producirse a través de sustancias fluorescentes con afinidad a regiones ricas en GC, como cromomicina A3, olivomicina y mitramicina, el patrón de bandeo puede mejorarse mediante la contratinción con un segundo colorante como la distamicina A, verde de metilo, actinomicina D o netropsina. También se pueden producir sometiendo las laminillas a temperaturas altas durante varios minutos, seguido por tinción con Giemsa o naranja de acridina y tienen la ventaja de teñir la cromatina rica en genes, aumentando así la capacidad de visualizar pequeños reordenamientos estructurales en las partes del genoma que son más propensas a resultar en anomalías fenotípicas (Moore CM y Best RC, 2001).

Otras técnicas de tinción

Se han descrito una variedad de técnicas especializadas para teñir ciertas regiones cromosómicas (Moore CM y Best RC, 2001):

- **Bandas CBG:** esta técnica tiñe específicamente la región centromérica de cada cromosoma y otras regiones que contienen heterocromatina constitutiva. Las bandas C consisten en el tratamiento de la cromatina con soluciones ácidas y posteriormente básicas, para después ser teñidas con Giemsa. Los brazos cortos y los satélites de los cromosomas acrocéntricos, la heterocromatina pericentromérica, y gran parte del brazo largo del cromosoma Y son positivos para las bandas C, debido a que están constituidas por DNA satélite y muestran variaciones de tamaño o polimorfismos en individuos normales (Moore CM y Best RC, 2001) (Figura 28).



Figura 28. Fotografía de una metafase con bandas CBG. (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

- **Bandas THG:** utilizan naranja de acridina permitiendo la coloración de los telómeros.
- **Bandas NOR:** se utiliza nitrato de plata para teñir las regiones organizadoras nucleolares (NOR) presentes en los tallos de los cromosomas acrocéntricos.

Cada uno de estos métodos, aunque limitados en su aplicación, puede arrojar información significativa sobre una variedad de anomalías citogenéticas y polimorfismos cromosómicos (Moore CM y Best RC, 2001).

1.5.2 Citogenética molecular

Las técnicas de citogenética molecular se basan en la aplicación de técnicas moleculares a la citogenética convencional (Speicher MR y Carter NP, 2005). En 1969 Joseph G. Galland y Mary Loupardue describieron una técnica para la formación de híbridos moleculares de RNA en solución y DNA en preparados citológicos. Las células se inmovilizaron en una capa delgada de agar, posteriormente se trataron con álcali para desnaturalizar el DNA y después se incubaron con el RNA marcado con tritio. Los híbridos se detectaron por autorradiografía (Galland JG y Loupardue ML, 1965) con lo que se establecieron las bases para las técnicas de hibridación *in situ* (Figura 29).

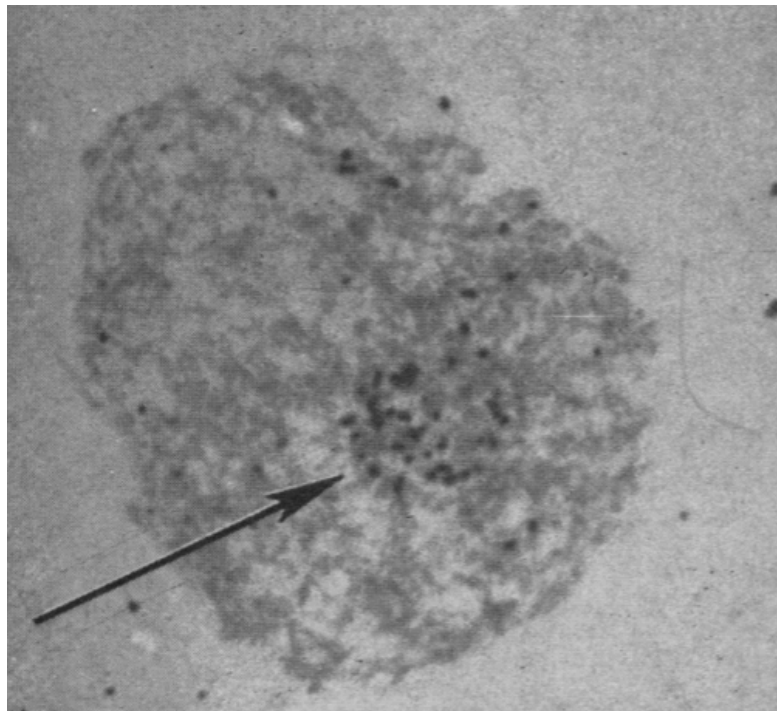


Figura 29. Autorradiografías de los núcleos de los ovarios de *Xenopus*, después de la hibridación *in situ* con el ARN ribosómico radiactivo. Se observa la ovogonia con la presencia de gránulos de plata (flecha) que indican la presencia de organizadores nucleolares. Imagen tomada de Galland JG y Loupardue M, 1965.

Entre de las técnicas de citogenética molecular las más empleada son:

- La hibridación *in situ* fluorescente o con fluorescencia (FISH), que utiliza sondas marcadas con fluorocromos para identificar regiones específicas de un cromosoma.
- La hibridación genómica comparativa o CGH que permite identificar ganancias o pérdidas de material genético comparando contra un control normal (Speicher MR y Carter NP, 2005).

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La introducción de FISH mejoró algunas de las limitaciones de las técnicas de citogenética convencional y se convirtió en una parte integral de la caracterización citogenética. Esta técnica permite la determinación del número y la localización de secuencias específicas de DNA tanto en los cromosomas en metafase como en núcleos en interfase, lo que simplifica significativamente la preparación y evaluación de las muestras (Bejjani BA y Shaffer LG, 2008). Así mismo se aumentó la resolución, esto se logró gracias a los avances que involucran a los dos elementos cruciales del análisis citogenético: la secuencia objetivo y la sonda; los estudios en metafase tienen una resolución de 3-5Mb, el análisis de núcleos en interfase alcanza una resolución de 2Mb-50kb (Speicher MR y Carter NP, 2005).

Los elementos básicos del procedimiento de FISH incluyen (Tsuchiya KD, 2011):

1. Selección de la(s) sonda(s) complementarias para la secuencia de interés.
2. Marcaje de la sonda.
3. Desnaturalización de la sonda y la secuencia de interés.
4. Hibridación.
5. Análisis e interpretación.

La selección de la sonda dependerá de los requerimientos para el diagnóstico o para la pregunta de investigación. Existen diferentes tipos de sondas (Shaffer LG y Bejjani BA, 2004).

- Sondas de secuencia única: detectan secuencias específicas, fueron creadas inicialmente para la detección de deleciones imperceptibles con citogenética convencional asociadas a síndromes de microdelección o microduplicación (Figura 30).

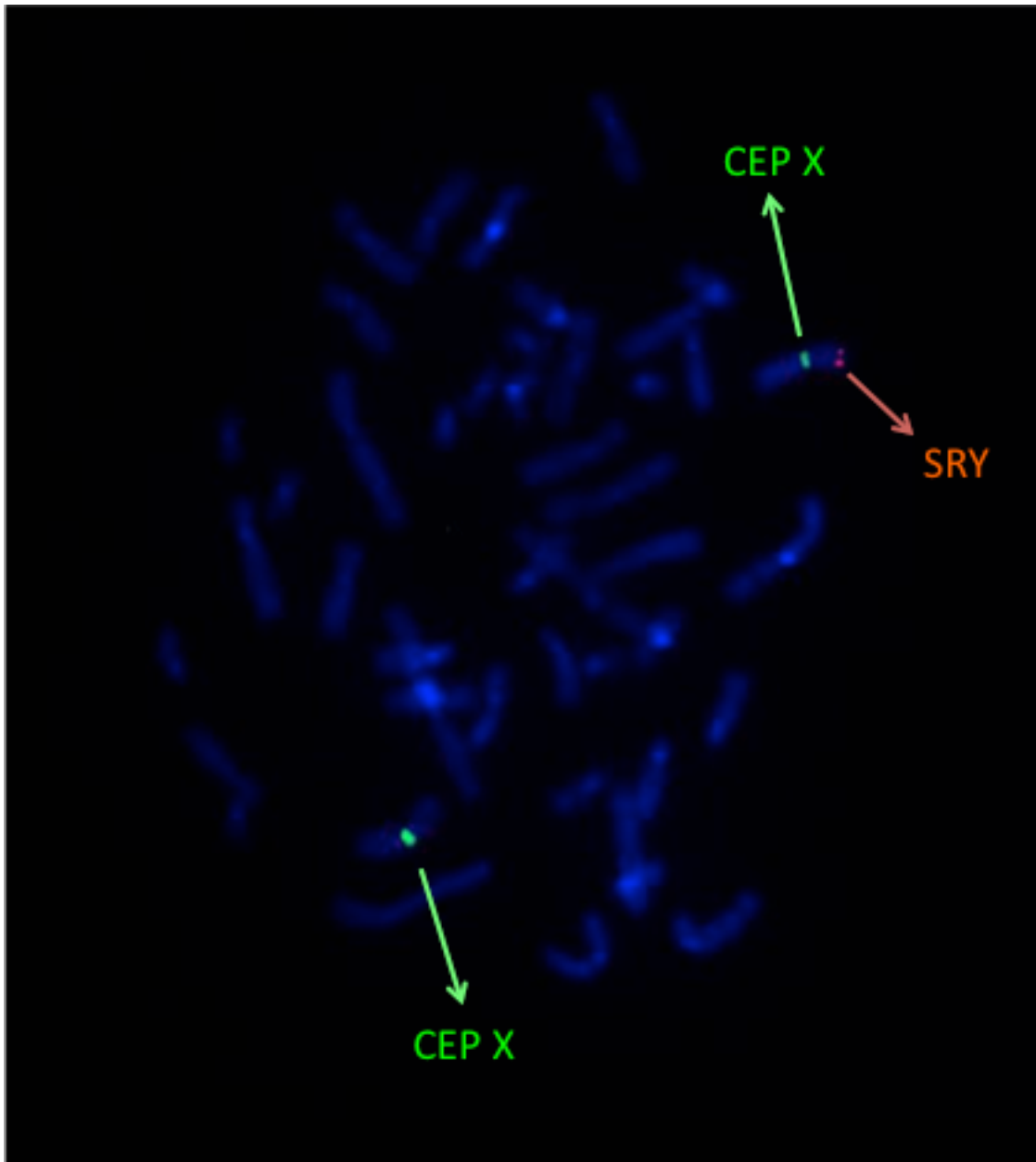


Figura 30. Ejemplo de análisis por FISH con sonda LSI SRY Spect Orange/CEP X Spect Green (Vysis Inc. ®) para demostrar una translocación del gen *SRY* a la región PAR1 del cromosoma X. (Biol. Ariadna Berenice Morales Jiménez. Laboratorio de Citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

- Sondas centroméricas: pueden ser pancentroméricas, con las que se detectan el centrómero de todos los cromosomas humanos a la vez o sondas centroméricas específicas de cada cromosoma.
- Sondas de fusión y de ruptura génica: estas sondas identifican regiones génicas con diferentes fluorocromos que están involucrados en una translocación con formación de genes quiméricos, características de ciertos tipos de cáncer.

- Sondas subteloméricas: fueron creadas para identificar rearrreglos crípticos subteloméricos como deleciones o duplicaciones o translocaciones.
- Sondas de tinción de cromosoma completo: son utilizadas para identificar el origen de marcadores cromosómicos y caracterizar algunos rearrreglos complejos.
- Sondas de tinción completa de 24 cromosomas: facilita la identificación de alteraciones intercromosómicas estructurales y rearrreglos complejos, sin embargo, es difícil identificar los puntos de ruptura con esta técnica y tienen una resolución de 5-10 Mb.

Debido a que la sonda y la región de interés se encuentran en moléculas de doble cadena (Figura 31.a) como primer paso se deben de desnaturalizar (Figura 31.c), este proceso se lleva a cabo mediante la elevación controlada de la temperatura (Speicher MR, 2005), posteriormente se baja la temperatura para permitir la hibridación por complementariedad de bases entre la sonda y la secuencia de interés, (Figura 31.d) (Tsuchiya KD, 2011), finalmente se observa la fluorescencia obtenida a través de un microscopio equipado con lámpara de UV y los filtros adecuados.

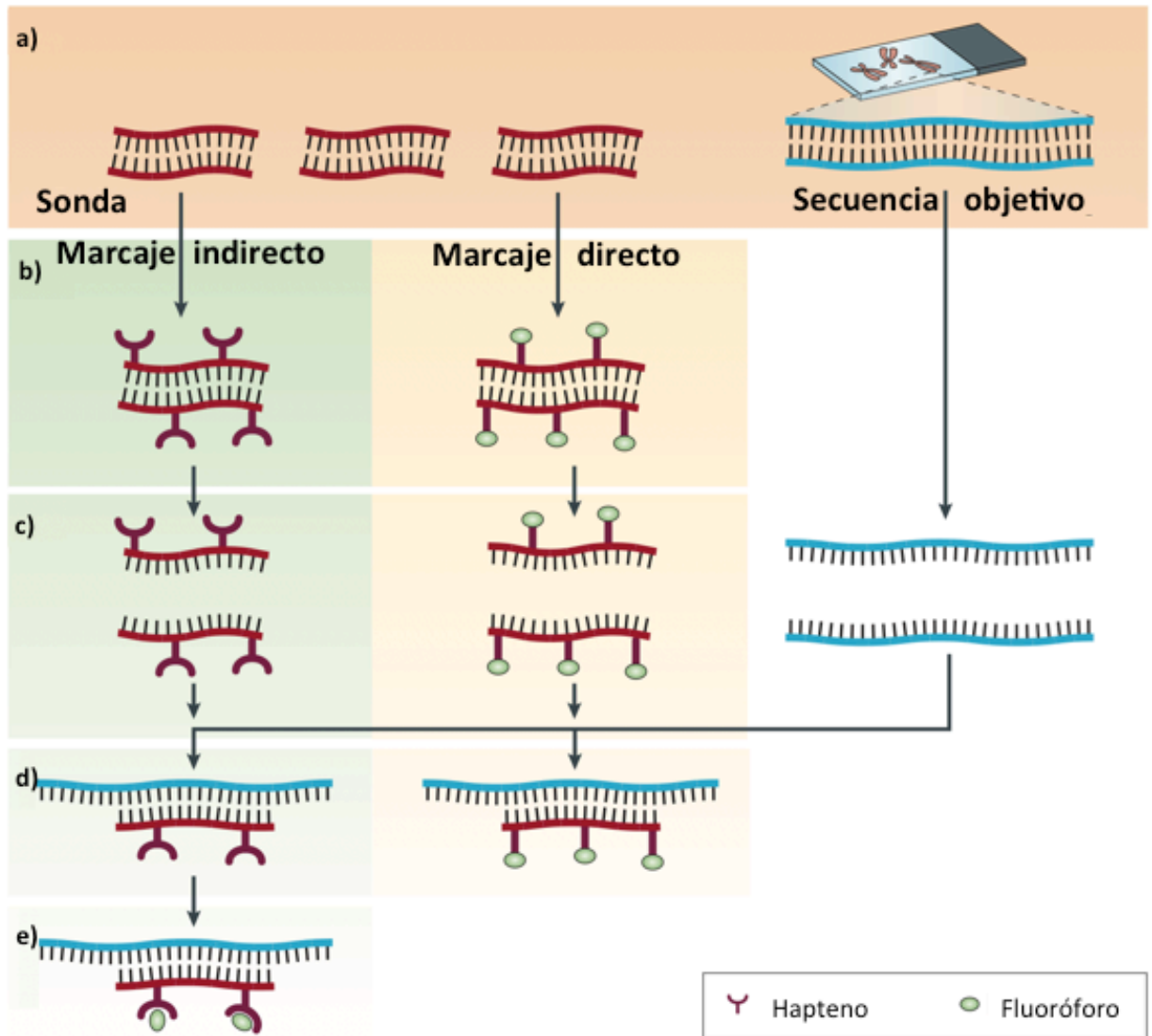


Figura 31. Principios de la hibridación fluorescente *in situ*. a) Se muestra la sonda y secuencia de interés en doble cadena. b) Marcaje directo e indirecto de la sonda. c) Desnaturalización de la sonda y de la secuencia de interés. d) Hibridación entre la secuencia de interés y la sonda marcada. e) Acoplamiento del fluoróforo al hapteno en la sondas marcadas indirectamente. Imagen modificada de Speicher MR y Carter NP, 2005.

Hibridación genómica comparativa (CGH)

El análisis de CGH es un método que identifica diferencias en el número de copias de DNA, a través de la comparación de genomas hibridando sobre metafases (Shaffer LG y Bejjani BA, 2005). Es una variación en la técnica de FISH, con la ventaja de reconocer los desequilibrios a través de todo el genoma (Bejjani BA y Shaffer LG, 2008). Para llevar a cabo este estudio se requiere previamente de la preparación de laminillas con metafases normales como se describió en la técnica de citogenética convencional, se debe contar de dos muestras de DNA: 1) en estudio y 2) de referencia. El DNA de estudio se puede obtener por cualquier tipo de aislamiento que produzca DNA de alto peso molecular. El DNA de referencia se puede tomar a partir de linfocitos de cualquier individuo con un cariotipo normal. Estos dos DNAs son fragmentados y marcados con un fluorocromo diferente para distinguirlos. Generalmente el DNA de estudio es marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) que produce una fluorescencia de color verde y el DNA de referencia es marcado con rodamina que produce una fluorescencia roja (Lapierre JC y Tachdjian G, 2002).

Los DNA de estudio y de referencia (sondas) son combinados en la misma concentración y se aplican a las laminillas con los cromosomas en metafase para competir por sitios complementarios. Si una región está amplificada en la muestra en estudio, la región correspondiente en el cromosoma en metafase se observa predominantemente verde. A la inversa, si una región no se encuentra en la muestra de estudio, por ejemplo por una deleción, la región correspondiente se observará en rojo. Las proporciones de la fluorescencia emitida a lo largo de los cromosomas son cuantificadas por un aparato de análisis de imagen digital. Una de las principales ventajas del análisis por CGH es su uso como herramienta de descubrimiento ya que no requiere un conocimiento *a priori* del desequilibrio cromosómico que está involucrado (Speicher MR y Carter NP, 2005) (Figuras 32 y 33).

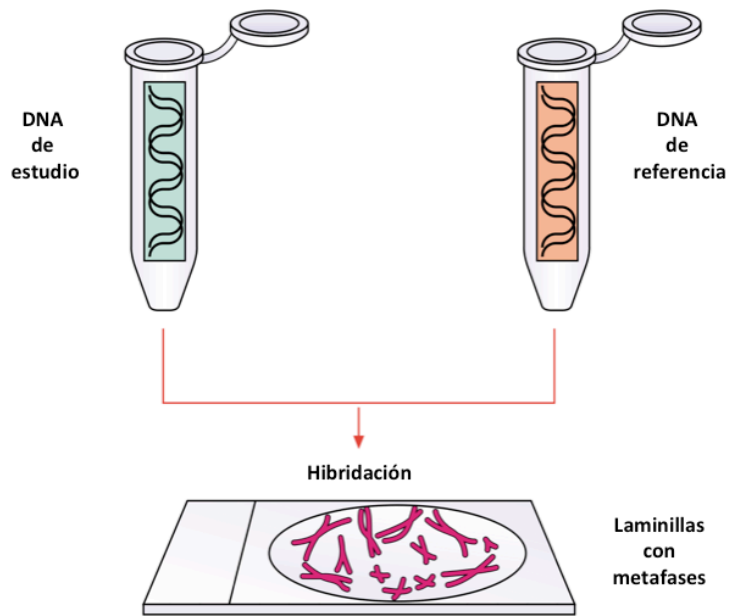


Figura 32. Diagrama esquemático de la técnica de hibridación genómica comparativa (CGH). Lapierre JC y Tachdjian G, 2002.

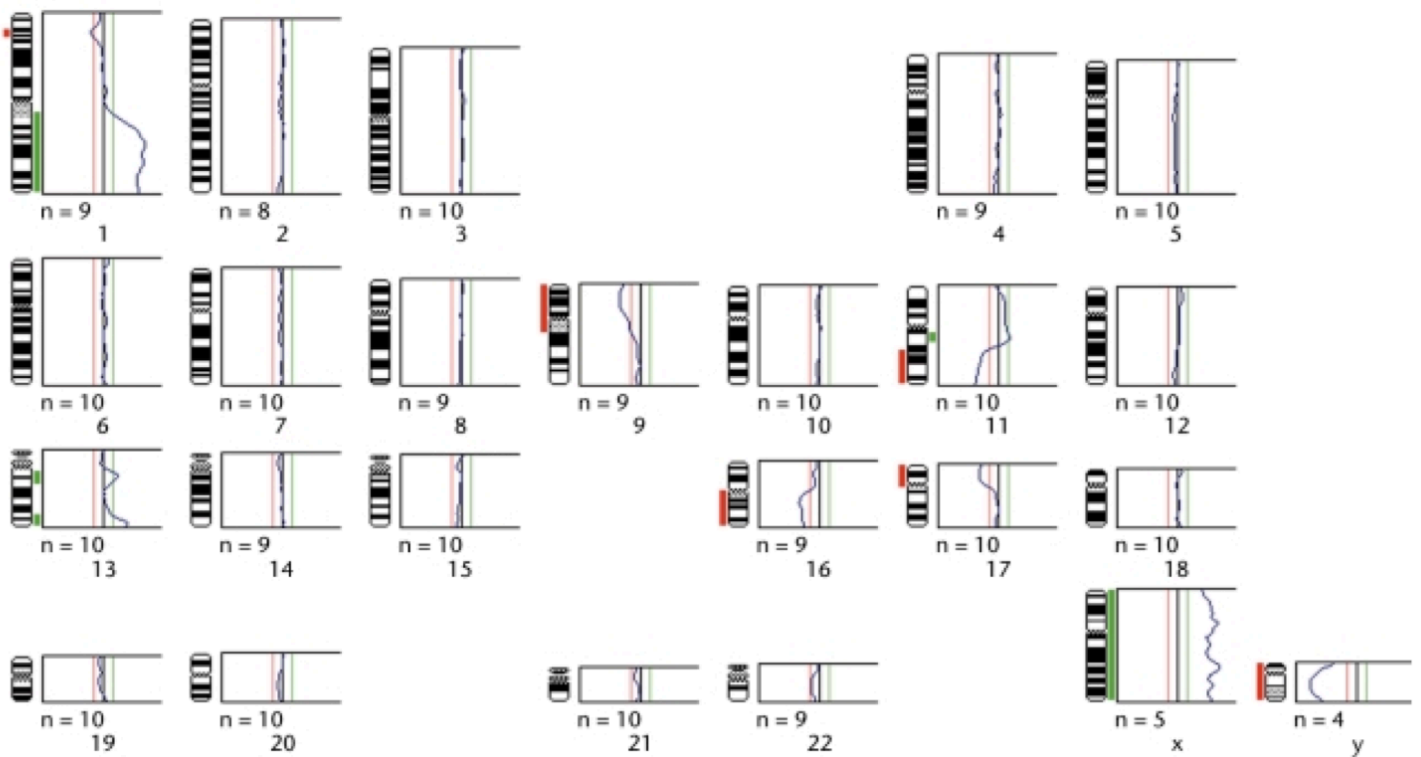


Figura 33. Proporción de emisión de fluorescencia en estudio de CGH. Se muestra la relación de fluorescencia de verde-rojo para cada cromosoma. Las líneas verticales en el lado izquierdo de los ideogramas de los cromosomas corresponden a las pérdidas de material genético, y aquéllos en el lado derecho son ganancias de material genético. Lapierre JC y Tachdjian G, 2002.

Sin embargo, la técnica de CGH presenta limitaciones que restringen su utilidad como herramienta diagnóstica, debido a que el DNA de las metafases se encuentra como cromosomas, su estado es de alta compactación, por lo que la resolución para determinar si hay una disminución en el número de copias es menor de 10 Mb y para las ganancias de número de copias el tamaño mínimo detectable es 2 Mb. Esto aunado, a que el análisis de las imágenes obtenidas son parcialmente automatizadas y se requiere de un citogenetista experimentado para identificar cada cromosoma para determinar las regiones en desbalance (Beheshti 2003, Park PC, Braude I y Squire JA, 2003).

Microarreglos cromosómicos o cariotipo molecular

Con objeto de solucionar las desventajas de CGH se desarrolló una nueva técnica conocida como CGH microarreglos (aCGH), en la que en lugar de utilizar cromosomas en metafases, se usan plataformas donde se encuentran unidas pequeñas secuencias de DNA o sondas y sobre ésta se coloca el DNA de estudio y de referencia permitiendo identificar deleciones y amplificaciones de regiones genómicas completas con lo que se mejoró la resolución del estudio siendo posible detectar alteraciones hasta de menos de 1Mb (Shaffer LG y Bejjani BA, 2004).

Las sondas colocadas en el microarreglo están diseñadas para representar áreas de interés y pueden ser de tamaños variables que van desde 80 a 300 kb hasta 20 a 85 pb. La resolución de un microarreglo está determinada por el tamaño, número y distancia del DNA genómico entre las sondas (Walker LC y Waddell N, 2010).

Una de las ventajas de aCGH es su capacidad para detectar de manera simultánea aneuploidías, deleciones, duplicaciones o amplificaciones de cualquier segmento de DNA representado en el microarreglo, así mismo, puede detectar tanto alteraciones submicroscópicas como alteraciones numéricas y estructurales identificadas por citogenética convencional. Con esta técnica se puede estudiar las variaciones en el número de copias (CNV) de aproximadamente 100 kb (Walker LC y Waddell N, 2010).

Sin embargo, también presenta desventajas, el aCGH no detecta rearrreglos en el que no hay desequilibrio en la dosis de DNA, como translocaciones balanceadas e inversiones y aunque detecta cambios de número de copias de DNA no puede diferenciar porqué este producido este cambio, si se debe a un cromosoma marcador, duplicación, inserción o translocación desbalanceada, por lo que en ocasiones es necesario hacer estudios adicionales (Walker LC y Waddell N, 2010).

1.6 Indicaciones para realizar estudios citogenéticos

El análisis cromosómico está indicado en las siguientes situaciones (Sharkey H, *et al.*, 2005; Warburton D, 2005):

1) Periodo Neonatal:

- La presencia de dos o más malformaciones mayores.
- La presencia de tres o más malformaciones menores.
- Ambigüedad de genitales.
- Sospecha de cromosomopatía.
- Muerte neonatal de causa inexplicable.

2) Periodo de lactante:

- Presencia de retardo mental sin causa aparente.
- Dificultades para el aprendizaje inexplicable.

3) Periodo Preescolar-Escolar:

- Trastorno del crecimiento.
- Retraso psicomotor.

4) Periodo de adolescencia:

- Presencia de ginecomastia.
- Falta de desarrollo puberal.
- Amenorrea primaria.
- Retraso mental.

5) Periodo del adulto:

- Padres de niños con alteraciones cromosómicas.
- Abortos recurrentes.
- Infertilidad.

1.7 Desarrollo sexual

El desarrollo sexual se inicia con la unión del espermatozoide que puede llevar un cromosoma X o un cromosoma Y y el óvulo que lleva un cromosoma X (Kofman-Alfaro S y Queipo G, 2005), se puede dividir en dos procesos principales: 1) la determinación sexual y 2) la diferenciación sexual (Biason-Lauber A, 2010).

La determinación sexual es la decisión que dirige a un embrión indiferenciado a un individuo diferenciado. En mamíferos equivale al desarrollo gonadal, en el cual la gónada indiferenciada se compromete para la formación de testículo u ovario, (Ono M y Harley VR, 2013), en los hombres el gen *SRY* codifica para un factor de transcripción el cuál se considera el factor determinante masculino (Kofman-Alfaro S y Queipo G, 2005), mientras que en las mujeres el gen *RSP01*, que codifica para una proteína con el mismo nombre que tiene como función aumentar la señalización de beta catenina probablemente a través de la vía de WNT, éste es considerado el factor determinante femenino (Biason-Lauber A, 2010). La diferenciación sexual ocurre una vez que la determinación sexual se inició y depende de los factores producidos por las gónadas que determinarán el desarrollo del sexo fenotípico, los factores determinantes en esta etapa son las hormonas (Ono M y Harley VR, 2013).

Durante la semana 1 y 2 de gestación los embriones sólo se diferencian por su cariotipo, a partir de la tercer semana comienza la expresión de genes para la determinación sexual. En la semana 6 y 7 de gestación los conductos paramesonéfricos o Müllerianos se desarrollan al lado de los conductos mesonéfricos o Wolffianos (Biason-Lauber A, 2010). Si se desarrolla un testículo que secretará testosterona, los conductos mesonéfricos aumentarán de tamaño y se diferenciarán en las estructuras del epidídimo, conductos deferentes y próstata. Las células de Sertoli producirán, una glicoproteína secretada, la hormona anti-Mülleriana que resultará en la regresión de los conductos Müllerianos (Ono M y Harley VR, 2013). Si no se desarrollaron los testículos, los conductos mesonéfricos no crecerán y posteriormente experimentarán regresión. Los conductos paramesonéfricos proliferan y darán lugar a las trompas de Falopio, al útero y a la porción proximal de la vagina (Eggers S y Sinclair A, 2012) (Figura 34).

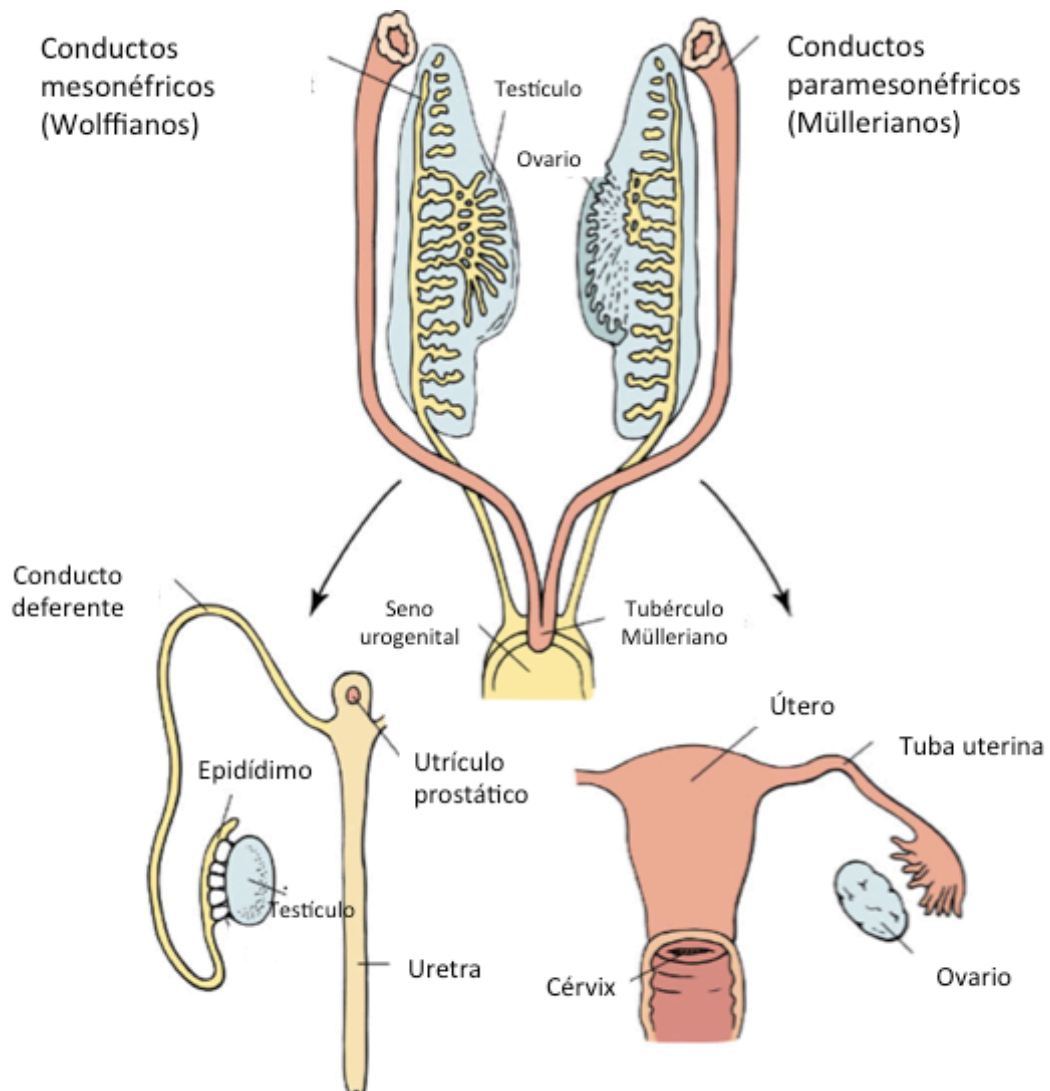


Figura 34. Esquema de genitales internos femeninos y masculinos y estructuras precursoras. Color amarillo= conductos Wolffianos y derivados. Color rosa= conductos Müllerianos y derivados. Imagen modificada de Biason-Lauber A, 2010

1.7.1 Gónada indiferenciada

Las gónadas se desarrollan en ambos sexos a partir de una gónada bipotencial también llamada cresta urogenital que tiene el potencial de desarrollarse como un ovario o como un testículo en función de los genes expresados diferencialmente (Eggers S y Sinclair A, 2012). La gónada bipotencial está formada por cuatro líneas celulares:

1) Células germinales.

2) Tres tipos de células somáticas:

- El componente somático de soporte a las células precursoras; células de Sertoli en el varón y células de la granulosa en las mujeres.
- Las células precursoras esteroidogénicas; células de Leydig en el varón y células de la teca en el ovario.
- Las células de tejido conectivo.

Se requiere de la correcta expresión de varios genes para que se desarrolle la gónada bipotencial (Eggers S y Sinclair A, 2012) (Tabla 4).

Tabla 4. Genes involucrados en la formación de la gónada indiferenciada (Biaison-Lauber A, 2009).

Gen	Proteína	Función
Pax2 (ratón)	Pax2	Regulador transcripcional. Se expresa durante el desarrollo de los conductos mesenquimales y del sistema urogenital.
Emx2 (ratón)	Emx2	Esencial para el desarrollo del telencéfalo dorsal, se expresa en los componentes epiteliales del sistema urogenital.
Lhx9 (ratón)	Lhx9	Lhx9 se expresa en las crestas urogenitales de los ratones en embriones en los días 9,5; más tarde se localiza en la región intersticial. La expresión del factor esteroidogénico 1 (Sf1), que es un receptor nuclear esencial para gonadogenesis, se reduce a niveles mínimos en la cresta genital con un Lhx9 deficiente, lo que indica que éste puede estar cascada arriba de Sf1.
WT1 (humano)	Wt1	Codifica para una proteína de unión a DNA con dedos de zinc. En los ratones $Wt1^{-/-}$ las gónadas entran en apoptosis. Puede funcionar como un activador o un represor dependiendo del tipo celular y el contexto del promotor.
GATA4 (humano)	Gata4	Factor de transcripción, presente en el proceso de desarrollo del corazón. Regulador de la expresión génica en gónadas. Actúa en el mantenimiento de las células de Sertoli y de la granulosa.

La determinación sexual está dada por la diferenciación de las células somáticas de soporte. En los embriones XY las células somáticas de la gónada se diferencian en las células de Sertoli, las que se unen en torno a las células germinales para formar cordones testiculares, que a su vez darán lugar a los túbulos seminíferos. Por fuera de los cordones las células esteroideogénicas se diferenciarán en las células de Leydig que se encargarán de la producción de testosterona (Crews D, 2003; Ono M y Harley VR, 2013). En los embriones XX las células de soporte se convierten en células de la granulosa, mientras que las células esteroideogénicas se diferencian en células de la teca, en éstas la producción de hormonas sexuales iniciará con la síntesis de androstenediona, la cual será convertida en estriol o estradiol en las células de la granulosa (Figura 35) (Ono M y Harley VR, 2013).

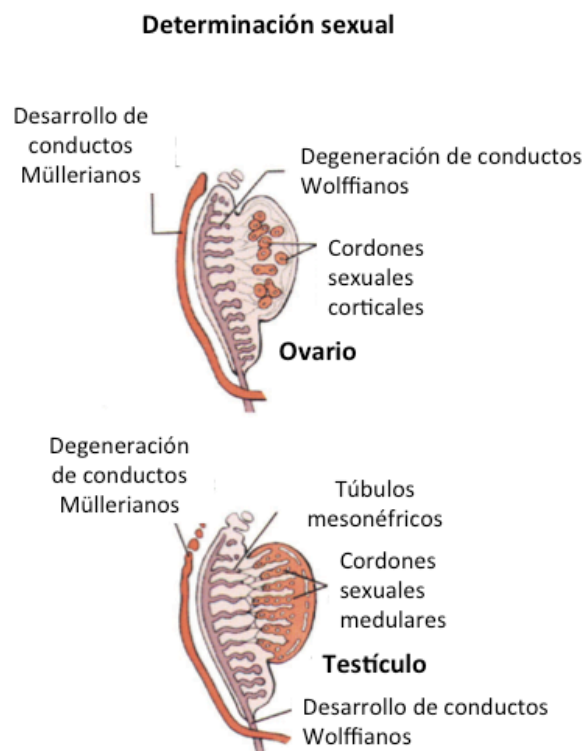


Figura 35. Esquema de determinación sexual. Se observa como a partir de una misma estructura se lleva a cabo la determinación femenina o masculina. Imagen modificada de Crews D, 2003

1.7.3 Testículos

El correcto desarrollo de los testículos requiere de la expresión en cascada de diversos genes. Los factores de transcripción actuarán directamente o como efectores de la transducción de señales a través de vías agonistas o antagonistas, como se describe a continuación (Ono M y Harley VR, 2013).

1. *SRY (Sex-determining region Y)*

Se considera el gen determinante del sexo masculino y es el encargado de iniciar el proceso de determinación sexual (Kofman-Alfaro S y Queipo G, 2005), se encuentra en Yp11.3, presenta una extensión de 3.8 kb y se caracteriza por no tener intrones (Biason-Lauber A, 2010). Codifica para la proteína SRY la cual es un factor de transcripción, tiene un dominio conservado de alta movilidad HMG (**High Mobility Group**) y posee la característica de unirse a sitios específicos en la curvatura menor del DNA, induciendo un plegamiento organizado de la estructura de la cromatina, que facilita el ensamblaje de complejos proteicos (Ono M y Harley VR, 2013).

El gen blanco de la proteína Sry es el gen *SOX9*. Estudios en ratones mostraron que *Sry* se expresa primero alrededor del 10.5 *días post coitum* (dpc) poco después de la aparición de las crestas genitales, alcanza niveles máximos de expresión en el 11.5 dpc, y se apaga poco después de 12.5 dpc. Se considera que *SRY* es un interruptor molecular que desencadena una cascada específica de muchos eventos moleculares (Eggers S y Sinclair A; 2012).

2. *SOX9 (SRY-Relates HMG-Box Gene)*

Existen un grupo de genes que se encuentran relacionados con el *SRY* y que presentan similitud con éste; la homología se limita a la región del gen *SRY* que codifica para un motivo de unión a DNA de la clase de la HMG, por lo que estos genes han sido nombrados *SOX* (SRY-related HMG-box) (Eggers S y Sinclair A; 2012). El gen *SOX9* es esencial para el desarrollo gonadal y esquelético, se encuentra en 17q24.3 y es el gen candidato más probable sobre el cual actúa el gen *SRY*. La función de *SOX9* es inducir la diferenciación de las células de pre-Sertoli a Sertoli y por lo tanto la diferenciación testicular (Biason-Lauber A, 2010).

SOX9 se expresa al principio del desarrollo en ambas gónadas indiferenciadas tanto XX como XY y su nivel de expresión se incrementa después de la acción de *SRY*, sin embargo en los ratones se ha observado que la expresión de *Sox9* en la cresta urogenital no es totalmente dependiente de *SRY* (Biason-Lauber A, 2010).

La regulación de la transcripción gonadal de *Sox9* consiste de:

- Inicio de la expresión de *Sox9*: *SRY* – independiente.
SF1 es un buen candidato para el inicio o la sensibilización de *Sox9* porque la expresión temprana de *Sox9* está abolida en ratones *Sf1*^{-/-}. SF1 probablemente active la expresión de *SRY*.
- Expresión aumentada de *Sox9*: *SRY* – dependiente.
Probablemente se produzca por la acción conjunta de *SRY* y *SF1*.
- Mantenimiento de la expresión de *Sox9*: *SRY* - independiente → en la vida adulta (Biason-Lauber A, 2010).

Las mutaciones en *SOX9* llevan a un desorden del desarrollo sexual 46,XY y causan anomalías esqueléticas como la displasia camptomélica (MIM 114290) (Kofman-Alfaro S y Queipo G, 2005).

3. *SF1/NR5A1 (Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1)*

Es un regulador de la expresión de múltiples genes que participan en el desarrollo gonadal, así como en el desarrollo de las glándulas suprarrenales, la reproducción y la esteroidogénesis (Eggers S y Sinclair A; 2012). Se encuentra en 9q33.3 y codifica para el factor esteroidogénico 1 (SF1), el cual puede tener varias funciones entre ellas: 1) receptor nuclear esencial para gonadogénesis y 2) factor de transcripción. Participa también en el desarrollo adrenal, en la determinación y diferenciación sexual y en el control hipotálamo-hipófisis para la reproducción y el metabolismo (Eggers S y Sinclair A; 2012).

SF1 se expresa en la gónada bipotencial y continúa su expresión en el testículo pero no en el ovario. En el día 42 de gestación durante la determinación testicular, *SF-1* se expresa constantemente en las células somáticas del testículo donde juega un papel importante junto con *SRY* para que se exprese *SOX9*. Para la semana 7 de gestación SF-1 activa la expresión de la hormona anti-Mülleriana y posteriormente en la semana 8 se expresa en las células de Leydig, activando la producción de enzimas esteroidogénicas, lo que resulta en la androgenización de los genitales externos. Mutaciones en *SF-1* pueden ser causa de reversión sexual en individuos XY (Biason-Lauber A, 2010).

4. *DAX1/NROB1 (Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1)*

El gen *NROB1* se encuentra en Xp21.2 y codifica para DAX1 (*Dosage sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1*), es un regulador transcripcional, miembro de la familia de los receptores huérfanos de hormonas nucleares. Su estructura se caracteriza por poseer un dominio de silenciamiento transcripcional por lo que es un regulador negativo que interactúa con SF1 para inhibir la activación de genes involucrados en el desarrollo del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales-gónadas y en la síntesis de hormonas esteroideas. Las mutaciones inactivadoras de *DAX1/NROB1* producen insuficiencia suprarrenal con deficiencia de glucocorticoides y mineralocorticoides, mientras que la duplicación ocasiona reversión sexual en sujetos XY (Biason-Lauber A, 2010).

5. *DMRT1 (Doublesex and mab-3 related transcription factor 1)*

Este gen es un regulador crítico para el desarrollo testicular (Ono M y Harley VR, 2013). Se encuentra en 9p24.3 y codifica para un factor de transcripción. Sus funciones son: 1) proliferación y pluripotencialidad de las células germinales, 2) diferenciación de células de Sertoli, 3) controlar la mitosis y meiosis en la espermatogonia adulta y 4) es un represor y activador transcripcional del inductor de meiosis *STRA8*, está activo en las mujeres e inactivo en los varones durante la etapa embrionaria (Biason-Lauber A, 2010).

1.7.4 Ovarios

Existe evidencia que la formación de los ovarios no es un proceso pasivo como anteriormente se consideraba y que la diferenciación de esta gónada está dirigida por genes que promueven el desarrollo ovárico y también por genes que antagonizan la formación de testículo (Ono M y Harley VR, 2013).

1. *RSPO1 (R-spondin family, member 1)*

Es considerado el gen determinante de ovario, se localiza en 1p34.3 y codifica para una proteína que tiene como función aumentar la señalización de beta catenina probablemente a través de la vía de WNT. En modelos murinos se ha observado que la degradación de Sox9 se hace a través de la vía de la beta-catenina, por lo que Rspo1 reprime la determinación testicular al degradar a Sox9. Otra de las funciones de *RSPO1* es aumentar la señalización de *WNT4* (Biason-Lauber A, 2010).

2. *WNT4 (Wingless-type MMTV integration site family, member 4)*

El gen se encuentra en 1p36 y sus funciones principales son: 1) permitir la traslocación de beta-catenina al núcleo para interactuar con factores de la determinación ovárica. 2) aumentar la expresión de la vía de la beta-catenina, con lo que se promueve la degradación de SOX9. 3) aumentar la expresión de *DAX1*, el cual es antagonista de SF1 y 4) regular la formación de conductos Mülllerianos, trompas de falopio, cérvix y 2/3 superiores de la vagina, riñones, glándula adrenal y pituitaria y tejido mamario, también regula el desarrollo y mantenimiento de los ovocitos (Biason-Lauber A, 2010).

1.8 Alteraciones del desarrollo sexual

Las alteraciones del desarrollo sexual se presentan en 1 de cada 4 500 recién nacidos vivos (Pasterski V, *et al.*, 2010) a 1 de cada 1 000 recién nacidos vivos (Oster, 2014). Se ha calculado que sólo en el 50% de los pacientes con alteraciones del desarrollo sexual y cariotipo 46,XY se puede obtener un diagnóstico específico, mientras que en la mayoría de los pacientes con alteraciones del desarrollo sexual y cariotipo 46,XX se sabe su etiología. En estos casos, en los que los pacientes presentan un cariotipo sin aberraciones, la causa de la alteración del desarrollo sexual es generalmente monogénica (Woodward M y Patwardhan N, 2010).

El Consorcio sobre el Manejo de las Alteraciones del Desarrollo Sexual de Norteamérica define a las alteraciones del desarrollo sexual como aquellos pacientes que presentan (www.dsdguidelines.org, revisado el 3 de febrero de 2014):

- Genitales ambiguos.
- Disyunción congénita de la anatomía sexual interna y externa.
- Desarrollo incompleto de la anatomía sexual, como la agenesia vaginal o la agenesia gonadal.
- Aberraciones de los cromosomas sexuales por ejemplo síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter, entre otros.
- Trastornos del desarrollo gonadal como la presencia de ovotestes.

En el año 2006 la Sociedad Europea de Endocrinología Pediátrica y la Sociedad de Endocrinología Pediátrica Lawson Wilkins convocaron a un grupo de trabajo de 50 especialistas conformado por endocrinólogos, cirujanos, genetistas, psicólogos y grupos de defensa del paciente, para la revisión del manejo de los pacientes con trastornos del desarrollo sexual. La intención era proponer una nueva nomenclatura y un nuevo sistema de clasificación basados en los hallazgos citogenéticos y moleculares (Hughes IA, *et al.*, 2007), el documento final derivado de esta reunión es conocido como el Consenso de Chicago (Hughes IA, 2008).

1.8.1 Clasificación de las alteraciones del desarrollo sexual

La clasificación propuesta para las alteraciones en el desarrollo sexual se basa en el resultado citogenético y se divide en tres principales categorías (Hughes IA, 2008) (Tabla 6):

- 1 Aberraciones cromosómicas.
- 2 TDS 46,XY.
- 3 TDS 46,XX.

Tabla 6. Clasificación de las alteraciones del desarrollo sexual. (Hughes IA, 2008)

1. Aberraciones cromosómicas	2. TDS 46,XY	3. TDS 46,XX
A: 47,XXY (síndrome de Klinefelter y sus variantes)	A: Alteraciones en el desarrollo gonadal(testicular): 1. Disgenesia gonadal completa o parcial 2. TDS ovotesticular 3. Regresión testicular	A: Alteraciones en el desarrollo gonadal(ovárico): 1. Disgenesia gonadal 2. TDS ovotesticular 3. TDS testicular
B: 45,X (síndrome de Turner y sus variantes)	B: Alteraciones en la síntesis o acción de los andrógenos 1. Alteración en la síntesis de andrógenos 2. Alteración en la acción de los andrógenos	B: Exceso de andrógenos 1. Fetal 2. Fetoplacentario 3. Materno
C: 45,X/46,XY (disgenesia gonadal mixta)	C: Otros: 1. Asociaciones sindrómicas con alteraciones en el desarrollo masculino (alteraciones de la cloaca, síndrome de Robinow, síndrome de Aarskog) 2. Síndrome de persistencia de conductos müllerianos 3. Síndrome de testículo evanescente 4. Hipospadias aislada 5. Criptorquidia aislada 6. Influencia ambiental	C: Otros 1. Asociaciones sindrómicas con alteraciones en el desarrollo masculino (alteraciones de la cloaca) 2. Agenesia o hipoplasia de conductos müllerianos 3. Atresia de vagina 4. Adherencia de labios
D: 46,XX/46,XY		

La nueva nomenclatura tiene como finalidad evitar términos peyorativos o que puedan crear confusión entre los médicos, pacientes y familiares. Se estableció que los términos como intersexo, pseudohermafroditismo y hermafroditismo ya no deberían utilizarse y se propuso el término trastorno del desarrollo sexual (TDS) para referirse a los pacientes que presentaran un desarrollo sexual atípico cromosómico, gonadal o fenotípico (Hughes IA, 2008) (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación entre la nomenclatura previa y la nomenclatura propuesta en el Consenso de Chicago. (Hughes IA, 2008)

Nomenclatura previa	Nomenclatura propuesta
Intersexo	Trastornos del desarrollo sexual
Seudohermafrodita masculino, subvirilización de un paciente XY, submasculinización de un paciente XY	Trastorno del desarrollo sexual 46,XY
Seudohermafrodita femenino, masculinización de un paciente XX, sobrevirilización de un paciente XX	Trastorno del desarrollo sexual 46,XX
Hermafrodita verdadero	Trastorno del desarrollo sexual ovotesticular
Varón XX o reversión sexual XX	Trastorno del desarrollo sexual 46,XX testicular
Reversión sexual XY	Disgenesia gonadal completa 46,XY

1.8.2 Abordaje de pacientes con diagnóstico de alteraciones del desarrollo sexual

El manejo óptimo de los pacientes con alteraciones del desarrollo sexual debe comprender una evaluación clínica y diagnóstica multidisciplinaria, se debe de asignar un sexo, considerar un manejo quirúrgico y proporcionar apoyo psicosocial (Lee PA, *et al.*, 2010), entre otras se consideran las siguientes estrategias (Hughes IA, 2006):

1. La asignación de género debe ser evitada hasta la valoración por los expertos.
2. La evaluación y manejo de los pacientes deben de ser llevados al cabo en un centro hospitalario que cuente con un equipo multidisciplinario con experiencia, éste debe incluir diferentes especialidades como endocrinología, cirugía y/o urología, psicología y/o psiquiatría, genética y trabajo social.
3. Todas las personas deben recibir una asignación de género.
4. La comunicación debe de ser abierta con los pacientes y familiares y se les debe de tomar en cuenta para la toma de decisiones.
5. Las inquietudes de los pacientes y familiares deben ser respetadas y tratadas de manera estrictamente confidencial.

Además de lo anterior, el uso de pronombres masculinos o femeninos debe de ser evitado, ya que esto puede producir ansiedad y confusión a los padres (Woodward M y Patwardhan N, 2010).

A. Evaluación clínica

Se debe de realizar una historia clínica detallada haciendo énfasis en los antecedentes heredofamiliares y prenatales. La exploración física debe de ser completa y minuciosa, para descartar la presencia de alguna dismorfia que dirija el diagnóstico hacia una entidad sindrómica. La descripción de los genitales debe de ser cuidadosa, utilizando términos embriológicos y evitar el uso de nombres específicos del aparato reproductor masculino y/o femenino (Lee PA, *et al.*, 2006).

La escala de Prader fue establecida para el estudio de las pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita, actualmente se puede hacer referencia a ésta para la descripción de los pacientes con ambigüedad de genitales (Woodward M y Patwardhan N, 2010) (Figura 36, Tabla 7).

Tabla 7. Escala de Prader. (Woodward M y Patwardhan N, 2010)

Grado	Descripción
0	Genitales externos femeninos normales
1	Genitales externos femeninos con clitoromegalia
2	Clitoromegalia con fusión parcial de labios formando un seno urogenital
3	Aumento del tamaño del falo con la fusión completa de estructuras labioescrotales formando un seno urogenital con una sola abertura
4	Fusión escrotal completa con la apertura del seno urogenital en la base del falo
5	Genitales externos masculinos normales

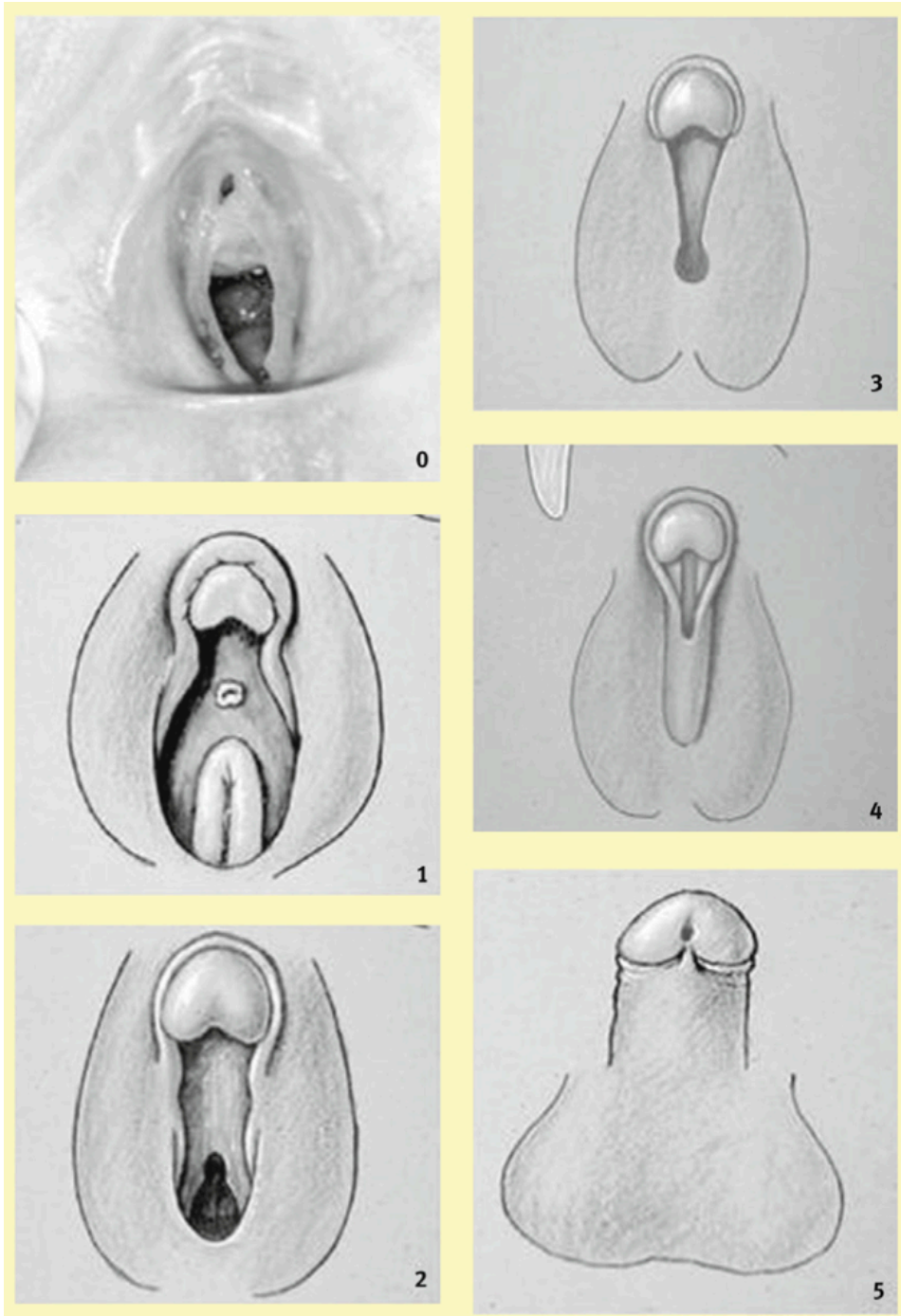


Figura 36. Escala de Prader. Se muestran los grados de la escala de Prader donde 0 corresponde a un fenotipo femenino y 5 a un fenotipo masculino. Imagen tomada de Woodward M y Patwardhan N, 2010.

B. Evaluación diagnóstica

Las pruebas iniciales que se deben de solicitar en un paciente con sospecha de un TDS son:

- 1) Cariotipo, en base a su resultado se clasificará el tipo de TDS.
- 2) Estudios de imagen como ultrasonido o resonancia magnética de región pélvica.
- 3) Medición de 17-hidroxiprogesterona, testosterona, gonadotropinas y electrolitos séricos.

Con estos estudios se orienta el diagnóstico y se descarta la presencia de hiperplasia suprarrenal congénita variedad perdedora de sal que puede poner en peligro la vida del paciente. En base a la sospecha diagnóstica obtenida de estas pruebas se continuará con estudios específicos como la medición de dihidrotestosterona y prueba de estimulación con hormona gonadotropina coriónica, en ocasiones podría requerirse del uso de técnicas moleculares para detectar alteraciones en los genes conocidos (Lee PA, *et al.*, 2006).

C. Asignación de género

La asignación de género es una decisión que debe tomar en conjunto el grupo multidisciplinario, la familia y en caso de que sea posible, el paciente. Los factores que influyen en la asignación de género son el diagnóstico, la apariencia de los genitales, las opciones quirúrgicas y la necesidad de terapia de reemplazo hormonal (Lee PA, *et al.*, 2006).

D. Manejo quirúrgico

El cirujano tiene la responsabilidad de establecer la secuencia quirúrgica y las consecuencias que puedan presentarse de la infancia a la edad adulta. Anteriormente los procedimientos quirúrgicos se realizaban con fines estéticos y sobretodo en el primer año de vida para disminuir la ansiedad de los padres y mejorar el apego al tratamiento, sin embargo la evidencia sistematizada ha comprobado que el planteamiento anterior no era del todo válido por lo que actualmente se prefieren los resultados funcionales sobre los estéticos (Lee PA, *et al.*, 2006).

E. Apoyo psicosocial

El apoyo psicosocial debe de estar a cargo de psicólogos y psiquiatras con experiencia en pacientes con TDS. Su papel es de gran importancia ya que ayudan a establecer decisiones acerca de la asignación o reasignación de sexo y el momento del procedimiento quirúrgico y reemplazo hormonal. En los casos que es necesario llevar a cabo una reasignación de género se debe de realizar una evaluación psicológica para establecer la identidad de género, ésta se establece antes de los 3 años de edad, sin embargo la edad más temprana a la que se puede evaluar de forma fiable sigue siendo poco clara. La generalización de que la edad de 18 meses es el límite superior para hacer una reasignación de género debe ser tratado con cautela e individualizado para cada caso (Woodward M y Patwardhan N, 2010).

1.9 Tipo y frecuencia de aberraciones estructurales y numéricas de los cromosomas sexuales

Las alteraciones en los cromosomas sexuales son consideradas el tipo de aberraciones cromosómicas más comunes. Tienen una frecuencia de 1 en 400 recién nacidos vivos (Jacobs PA, 1979), lo cual las hace incluso dos veces más frecuentes que la trisomía 21 (Linden MG, *et al.*, 2002). En la literatura se ha reportado que en etapa prenatal las alteraciones en los cromosomas sexuales son más comunes, presentándose de 1 en 250 a 1 en 300 (Ferguson-Smith MA y Yates JRW, 1984).

El fenotipo de los pacientes con alteraciones en los cromosomas sexuales es variable y en general no se observa ambigüedad de genitales, por lo que su diagnóstico se puede retrasar (Li X, 2011). Robinson y colaboradores realizaron un estudio prospectivo llamado *The Denver Study of Sex Chromosome Abnormalities* realizado entre 1964 y 1974, en donde se hizo cariotipo convencional a todos los recién nacidos, con o sin manifestaciones clínicas, para la búsqueda de alteraciones en los cromosomas sexuales. En este periodo se reportaron 40 000 nacimientos, de los cuales 300 individuos presentaron alteraciones en los cromosomas sexuales, a estos pacientes se les dio seguimiento hasta la adolescencia. Se concluyó que estos pacientes presentan mayor riesgo de presentar problemas en el desarrollo, sin embargo la mayoría tuvo un desarrollo normal y no se encontraron alteraciones hasta la adolescencia (Robinson A, *et al.*, 1990). Posteriormente en el año 2001 se publicó el seguimiento de 35 de estos pacientes hasta la vida adulta; se les realizó evaluación de coeficiente intelectual y se observó que los pacientes presentaban un coeficiente menor al promedio, sin embargo su adaptación social era favorable en todos los casos (Bender BG, *et al.*, 2001).

En 1991 se reportó un estudio prospectivo similar realizado en Dinamarca (Nielsen J y Wohler M, 1991) en donde se hizo análisis cromosómico a 34 910 recién nacidos en un período de 13 años. Se refirió que la incidencia de alteraciones cromosómicas fue de 1 en 118 recién nacidos, mientras que las alteraciones en cromosomas sexuales presentaron una incidencia de 1 en 426 recién nacidos vivos. El síndrome de Klinefelter se encontró en 1 por cada 576 pacientes masculinos y el síndrome de Turner en 1 por cada 947 mujeres. Se reportó que las alteraciones estructurales de cromosomas sexuales se presentaron en 1 de cada 11 637 casos.

Kim y colaboradores reportaron en 1999 un estudio realizado en 4 117 pacientes coreanos (2 172 hombres y 1 945 mujeres) con sospecha de alteración cromosómica. En 721 individuos (17.5%) se corroboró la presencia de una aberración cromosómica, de estos, 194 casos (26.9%) correspondieron a alteraciones en cromosomas sexuales. El diagnóstico más frecuente fue síndrome de Turner (114 casos) de ellos, 58 casos presentaron mosaico, 32 monosomía del X, 5 delección de Xq y 19 casos fueron reportados con isocromosoma de Xq. Se reportaron 59 pacientes con síndrome de Klinefelter, el cariotipo más comúnmente reportado fue 47,XXY (51 casos) seguido por el mosaico 46,XY/47,XXY (4 casos) (Kim SS, *et al.*, 1999).

En el año 2010 se estudió a la población del sudeste de Turquía, se analizaron a 4 216 pacientes entre el año 2000 y el 2009, se reportaron 239 (17.6%) casos con alteraciones de los cromosomas sexuales. La aberración más frecuente fue síndrome de Klinefelter (86 casos) seguida por síndrome de Turner (58 casos) (Balkan M, *et al.*, 2010).

2. Planteamiento del problema

Los trastornos de la diferenciación sexual son un grupo complejo de enfermedades cuyas bases moleculares y cromosómicas no se conocen completamente. Debido a la alta frecuencia reportada en la literatura de aberraciones tanto estructurales como numéricas de los cromosomas sexuales, nos planteamos determinar la frecuencia y el tipo de éstas en la población que acudió al Departamento de Genética del Hospital Infantil Federico Gómez de 2002 al 2012 y con base en este análisis poder identificar aquellos casos que podrían beneficiarse de los avances en los estudios de citogenética molecular para correlacionarlos con las alteraciones del desarrollo sexual.

3. Justificación

El Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) es un centro de referencia de tercer nivel en donde se atienden a pacientes provenientes de todo el país. Una parte de los pacientes que acuden a valoración al Departamento de Genética requieren de estudio cromosómico para determinar un diagnóstico de certeza. Entre las alteraciones detectadas en los resultados de cariotipo con bandas GTG llamó la atención la alta frecuencia de alteraciones reportadas de los cromosomas sexuales; por lo que consideramos que el conocer la incidencia de alteraciones de estos cromosomas y los síndromes clínicos o trastornos del desarrollo asociados, nos permitirá establecer la frecuencia de estas alteraciones en la población que acude a nuestra Institución, lo que a su vez permitirá mejorar su atención, otorgar un asesoramiento genético con bases moleculares y aportar conocimiento nuevo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Identificar las aberraciones de los cromosomas sexuales reportadas en los cariotipos con bandas GTG realizados a los pacientes que acudieron al Departamento de Genética del HIMFG en los años de 2002 a 2012 y correlacionarlas con las alteraciones del desarrollo sexual.

4.2 Objetivos particulares

- Identificar y clasificar el tipo de aberraciones numéricas y estructurales de los cromosomas sexuales reportadas durante el periodo mencionado.
- Determinar la frecuencia de las aberraciones identificadas.
- Correlacionar las aberraciones encontradas con las alteraciones del desarrollo sexual.
- Comparar nuestros datos con lo reportado en la literatura y establecer similitudes y diferencias con respecto a nuestra población.
- Identificar y analizar casos cuyo diagnóstico y asesoramiento genético pudieran beneficiarse de las técnicas de citogenética molecular.
- Aplicar técnicas de citogenética molecular en algunos casos identificados para caracterizarlos y poder dar un asesoramiento genético con bases moleculares.

5. Material y métodos

Se realizó la revisión del registro de resultados de cariotipo con bandas GTG realizados en el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez de enero de 2002 a diciembre de 2012. Se identificaron los casos reportados con aberraciones numéricas y estructurales de los cromosomas sexuales y posteriormente se dividió el estudio en dos áreas principales:

- 1) El análisis estadístico de los resultados reportados con alteraciones en los cromosomas sexuales en el Departamento de Genética de enero de 2002 a diciembre de 2012.
- 2) La identificación y análisis de casos que podrían beneficiarse de la realización de estudios de citogenética molecular como FISH y microarreglos para determinar su etiología y otorgar asesoramiento genético.

5.1 Criterios para el análisis estadístico

Criterios de inclusión

- Casos con reporte de cariotipo con bandas GTG entre enero de 2002 a diciembre de 2012.
- Alteración numérica o estructural de los cromosomas sexuales.
- Con nomenclatura clara y letra legible.

Criterios de exclusión

- No se cuente con la nomenclatura clara.
- No legibles.

Criterios de eliminación

- Casos sin resultados.

5.2 Criterios para el análisis de casos clínicos

Criterios de inclusión

- Pacientes con alteraciones numéricas o estructurales de los cromosomas sexuales.

- Pacientes con reversión sexual y/o ambigüedad de genitales.
- Con resultado legible y con nomenclatura adecuada.
- Que acepten participar en el estudio.
- Que pueda ofrecerse beneficio de los estudios propuestos.

Criterios de exclusión

- Pacientes que no acepten participar.
- Que haya contraindicación de toma de muestra.
- No se encuentre en expediente clínico para confirmación de datos.

Criterios de eliminación

- No se pueda confirmar el resultado.
- No se obtenga resultado de la muestra.

6. Plan de análisis estadístico

Es un estudio retrospectivo, observacional y descriptivo. Se utilizaron medidas de tendencia central para el análisis de la población y de los resultados obtenidos.

7. Descripción de variables

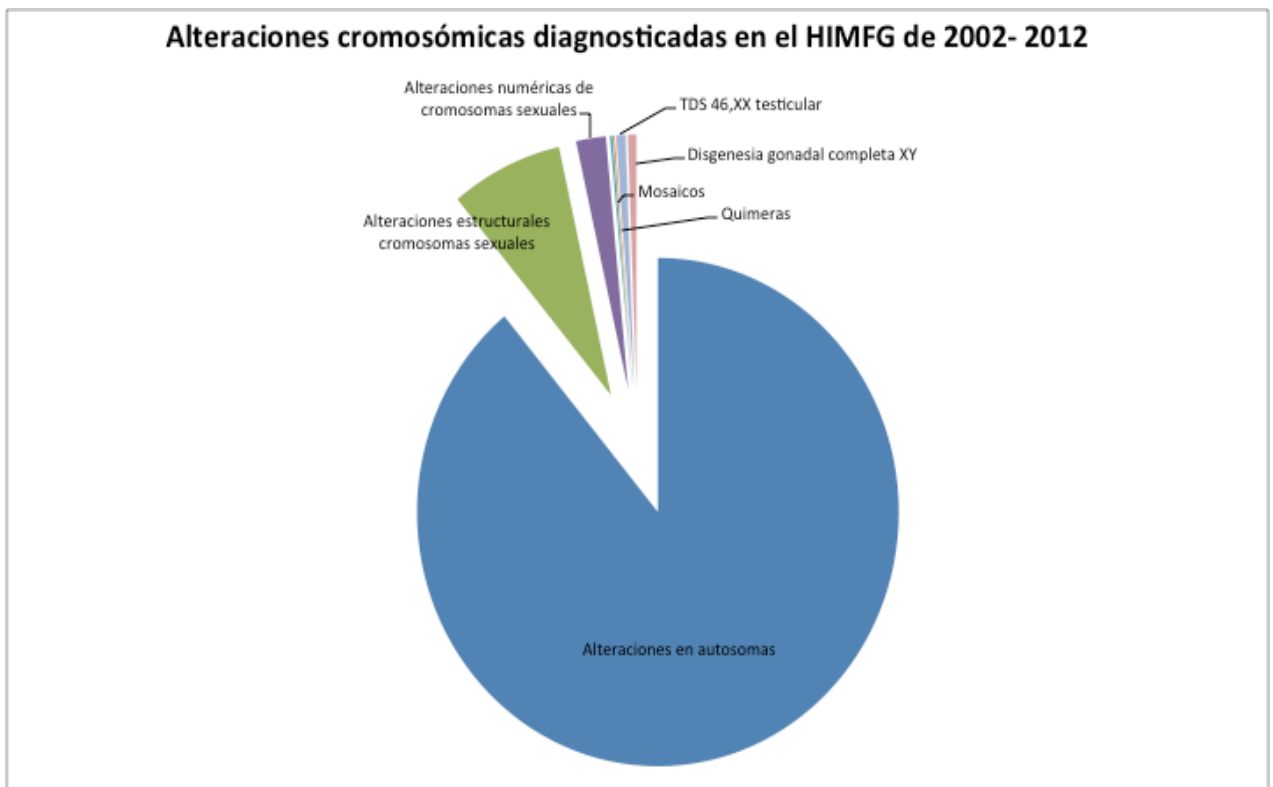
- Sexo: cualitativa nominal.
- Edad: cuantitativa continúa
- Alteración estructural: cualitativa nominal.
- Diagnóstico clínico: cualitativa nominal.

8. Resultados

8.1 Análisis estadístico

En el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez en el período de 2002 al 2012 se realizaron 7 286 cariotipos con bandas GTG, 1 776 de los cuales no tuvieron crecimiento y/o no se reportó resultado, por lo que en total se obtuvieron 5 611 resultados; 1 741 casos fueron reportados con alguna cromosomopatía, 199 (11.43%) de ellos correspondieron a una alteración de los cromosomas sexuales, de los cuales 137 (7.87%) presentaron una aberración numérica y 36 (2.07%) una aberración estructural.

Se incluyó en este análisis a los pacientes con cariotipo 46,XX/46,XY (5 casos) en quienes se corroboró diagnóstico de quimera en 2 de estos casos y a los pacientes con reversión sexual, actualmente denominados TDS 46,XX testicular y disgenesia gonadal completa XY (Gráfica 1).



Gráfica 1. Alteraciones cromosómicas diagnosticadas en el laboratorio de citogenética del Departamento de Genética del HIMFG de 2002- 2012.

El 68.84% de las alteraciones de cromosomas sexuales correspondieron a una aberración numérica. La más frecuentemente reportada fue la monosomía del X (48.74%) y en segundo lugar se encontró el cariotipo 47,XXY (4.52%). Se reportó un mayor número de casos con una sola línea celular que en forma de mosaicos. Se encontraron 18 pacientes con mosaicos para aberraciones numéricas, el más frecuente fue 45,X/46,XX en 7 casos (3.52%), seguido de 45,X/46,XY en 5 casos (2.51%) (Tabla 8).

Las alteraciones estructurales de los cromosomas sexuales representaron 19.66% de las aberraciones de los cromosomas sexuales (Tabla 8) de las cuales la mayoría correspondió a alteraciones en el X, siendo la más frecuente la translocación aparentemente balanceada entre el X y un autosoma reportada en 6 casos (3.37%). Los casos con t(X;autosoma) correspondieron a:

- Paciente 1: femenino de 8 meses de edad en estudio por síndrome dismórfico y talla baja. Cariotipo: 46,X,t(X;7)(p11.2;p15).
- Paciente 2: femenino de 11 años de edad con diagnóstico de hipomelanosis de Ito y crisis convulsivas. Cariotipo: 46,X,t(X;9)(p11;q34).
- Paciente 3: femenino de 9 meses de edad en estudio por retinoblastoma. Cariotipo: 45,X,der(X)t(X;13)(q28;q14)dn,-13.
- Paciente 4: femenino de 5 meses en estudio por retraso del desarrollo psicomotor y síndrome dismórfico. Cariotipo: 46,X,t(X;12)(q26;q24).
- Caso familiar (pacientes 5 y 6): femenino de 1 año de edad en estudio por catarata congénita bilateral y síndrome dismórfico, cariotipo: 46,X,t(X;1)(p22;q22). La madre de la paciente presentó catarata congénita bilateral y fenotipo similar, cariotipo: 46,X,t(X;1)(p22;q22).

En cuanto a las alteraciones estructurales del cromosoma Y sólo se reportó el caso de un paciente masculino de 13 años de edad, a quien se le solicitó el estudio citogenético por presentar discapacidad intelectual de causa desconocida, epilepsia y trastorno de la conducta. Su resultado de cariotipo en 25 metafases fue 46,X,del(Y)(q11.23).

Tabla 8. Alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas sexuales de enero de 2002 a diciembre de 2012.

Tipo de alteración	Número	Porcentaje
Alteraciones numéricas		
Alteraciones numéricas del X		
45,X	97	48.74
47,XXX	5	2.51
48,XXXX	3	1.51
Mosaicos		
45,X/46,XX	7	3.52
45,X/47,XXX	1	0.50
45,X/47,XXX/46,XX	2	1.01
Alteraciones numéricas con cromosoma Y		
47,XXY	9	4.52
48,XXYY	2	1.01
48,XXXYY	1	0.50
49,XXXXY	2	1.01
Mosaicos		
45,X/46,XY	5	2.51
47,XXY/46,XY	1	0.50
47,XY/46,XY	1	0.50
48,XXY,+21/47,XY,+21	1	0.50
Subtotal	137	68.84
Alteraciones estructurales		
Alteraciones estructurales del X		
Delección Xq	1	0.50
Isocromosoma Xq	5	2.51
Inversión Xq	1	0.50
Translocación(X;autosoma)	6	3.02
Material adicional en X	3	1.51
Mosaicos		
45,X/46,X,i(Xq)	2	1.01
45,X/46,X,r(X)	3	1.51
45,X/46,X,idic(X)	1	0.50
45,X/46,X,+mar	9	4.52
45,X,add(X)/45,X	1	0.50
Otros	3	1.51
Alteraciones estructurales del Y		
Delección Yq	1	0.50
Subtotal	36	18.09
Otros		
46,XX/46,XY	3	1.51
chi46,XX/46,XY	2	1.01
TDS 46,XX testicular	11	5.53
Disgenesia gonadal completa XY	10	5.03
Subtotal	26	13.08
Total	199	100

Tabla 9. Motivo de solicitud de estudio citogenético y resultado de cariotipo.

Motivo de solicitud	Número	Motivo de solicitud	Número
Síndrome de Turner		RDPM/Discapacidad intelectual	
45,X	83	49,XXXXY	1
45,X/46,X,+mar	5	48,XXXX	1
45,X/46,XX	4	47,XY,+mar	1
45,X/46,X,i(Xq)	2	46,X,del(Yq)	1
45,X/46,X,r(X)	2	Total	4
45,X/47,XXX	1	Cardiopatía compleja	
45,X/46,X,idelic(X)	1	47,XXY	1
45,X,add(X)/45,X	1	45,X	2
46,X,i(Xq)	1	Total	
Total	100	Ambigüedad de genitales	
Síndrome de Klinefelter		45,X	8
47,XXY	4	46,XX/46,XY	3
48,XXYY	2	chi46,XX/46,XY	2
48,XXXYY	1	45,X/46,XY	5
49,XXXXYY	1	47,XXY	3
Total	8	TDS 46,XX testicular	11
Talla baja en estudio		Disgenesia gonadal completa	10
45,X	5	XY	
45,X/46,X,+mar	4	Total	42
45,X/46,XX	2	Abortos recurrentes	
47,XXX	2	45,X/46,XX	1
45,X/46,X,r(X)	1	45,X/47,XXX/46,XX	2
46,X,i(Xq)	2	47,XXY/46,XY	1
46,X,del(Xp)	1	Total	4
46,X,add(X)	2	Trisomía 21	
Total	19	48,XXY,+21/47,XY,+21	1
Talla alta en estudio		48,XXXX	1
47,XXY	1	Total	2
47,XXYY/46,XY	1	Otros	
46,X,add(X)	1	Translocación(X;autosoma)	6
Total	3	46,X,i(Xq)	2
Síndrome dismórfico		46,X,inv(X)	1
47,XXX	3	Otros mosaicos	2
48,XXXX	1	Total	11
Total	4		

El motivo más frecuente por el cual se solicitó el cariotipo con bandas GTG fue por sospecha de síndrome de Turner (50.25%), seguido por ambigüedad de genitales (21.11%) (Tabla 9).

En dos de los pacientes la solicitud de análisis citogenético fue por presentar fenotipo compatible con trisomía 21; en uno de los casos el paciente presentó un mosaico con una línea celular 47,XY,+21 y otra 48,XXY,+21. Mientras que en el otro caso se reportó 48,XXXX, no corroborándose la presencia de una línea celular con trisomía 21 (Tabla 9).

El rango de edad en el cual se hizo el estudio de cariotipo fue de 1 día de vida a los 42 años. A tres pacientes se les realizó análisis citogenético al día de edad, dos de ellos por presentar ambigüedad de genitales y a una paciente por la sospecha clínica de síndrome de Turner, el cual se confirmó. Se realizó cariotipo a 10 familiares de pacientes debido a que alguno de sus hijos presentaron algún rearrreglo cromosómico o por presentar pérdidas gestacionales recurrentes. Entre estos casos se encuentra el de un paciente de 42 años de edad quien tuvo indicación de realización de análisis citogenético debido a que su hija presentó un cariotipo 46,XX,add(22)(p12)[25] y el resultado del padre fue mos47,XXY[6]/46,XY[94] y quien al momento del estudio era asintomático(Tabla 10).

Tabla 10. Estudios citogenéticos solicitados a familiares de pacientes atendidos en el Departamento de Genética del HIMFG.

Caso	Edad	Sexo	Diagnóstico de envío	Resultado
1	23	F	Hija con alteración en el cromosoma 12	46,X,t(X;12)(q26;q24)
2	28	M	Hijo con cromosopatía	47,XXY[25]
3	31	F	Pérdida gestacional recurrente	mos47,XXX[5]/45,X[5]/46,XX[40]
4	32	F	Pérdida gestacional recurrente	45,X[4]/46,XX[42]
5	42	M	Hija con alteración en el cromosoma 22	mos47,XXY[6]/46,XY[94]

8.1.2 Discusión de análisis estadístico

En este estudio se analizaron el tipo y la frecuencia de alteraciones de los cromosomas sexuales en la población que acudió a valoración al Departamento de Genética del HIMFG en un periodo de 11 años evaluándose un total de 5 611 estudios. Entre los hallazgos del análisis referido se encontró que si bien las alteraciones en los cromosomas sexuales son el tipo de aberraciones cromosómicas más comunes, en este trabajo el tipo de aberración cromosómica más común fue en los autosomas 88.57% de los casos, mientras que las alteraciones en los cromosomas sexuales correspondió a un 11.43%.

La diferencia en porcentajes podría explicarse debido al tipo de población a la que se realizó el estudio de cariotipo; es decir al ser el HIMFG un centro de concentración, el estudio de cariotipo bandas GTG se realizó en un grupo de pacientes que manifestaron alguna alteración clínica que hizo sospechar una entidad sindrómica específica; esta situación es diferente de los estudios referidos en la literatura sobre análisis de porcentajes de alteraciones cromosómicas, en los que para obtener la frecuencia de este tipo de aberraciones cromosómicas se realizó el estudio de cariotipo a todos los recién nacidos, con o sin manifestaciones clínicas (Robinson A, *et al.*, 1990 ; Nielsen J y Wohlert M, 1991).

Otra característica particular de nuestra población es que los pacientes atendidos en esta Institución son pacientes pediátricos y como se mencionó con anterioridad, en la mayoría de las veces las alteraciones en los cromosomas sexuales no presentan manifestaciones clínicas a edades tempranas (excepción hecha por ejemplo del Síndrome de Turner el cual tiene manifestaciones fenotípicas que deberían ser identificadas al nacimiento o son referidas en la adolescencia para el estudio de amenorrea primaria). En ocasiones los pacientes con este tipo de alteraciones cromosómicas son diagnosticados hasta la edad adulta y en términos generales el motivo de consulta es por tener problemas de fertilidad o pérdidas gestacionales recurrentes. Es importante mencionar que la mediana de la edad a la que se realizó el estudio de cariotipo en nuestra población fue de 3 años y la moda de 1 año de edad.

En cuanto al tipo de aberración en los cromosomas sexuales más frecuente en este estudio fue la numérica con 68.84% de los casos, lo cual corresponde a lo reportado en la literatura. Sin embargo también se encontraron diferencias en los datos cuando estos fueron comparados con otros análisis. Por ejemplo se menciona que en la población en

general es más frecuente el síndrome de Klinefelter (1:500 RNV varones) que el síndrome de Turner (1:2500 RNV femeninos), este dato no coincidió con lo observado en nuestra población, en donde el diagnóstico más frecuente fue la monosomía del X. Si bien la comparación anterior es para población general, cuando se compara este estudio con análisis similares a éste en el sentido de que se solicitó el análisis citogenético a pacientes con sospecha clínica de cromosomopatía por lo menos en dos de ellos también se reportó con mayor frecuencia el síndrome de Turner. Lo anterior además de por las razones anteriormente señaladas con respecto a las características de la población atendida en nuestra Institución también podría considerarse en relación a las edades de los pacientes a los que se les hizo el cariotipo ya que el síndrome de Turner por sus manifestaciones clínicas, se puede diagnosticar desde etapa prenatal y neonatal mientras que el síndrome de Klinefelter puede pasar desapercibido en los primeros años de vida. (Tabla 11) (Choi WS, *et al.*, 1984; Nielsen J y Wohlert M, 1991; Kim SS, *et al.*, 1999; Ghazaey S, *et al.*, 2013).

Tabla 11. Frecuencia relativa de alteraciones en los cromosomas sexuales en diferentes estudios

Cariotipo	Frecuencia relativa (%)					Estudio actual	
	Hook	Choi	Nielsen	Kim	Ghazaey	(2014)	
	(1977)	(1984)	(1991)	(1999)	(2013)	Número	%
Síndrome de Turner	1.6	37.8	13.0	58.8	60.65	128	64.32
45,X							
46,X,i(Xq)	NE	NE	NE	16.49	31.61	97	48.74
46,X,del(Xq)	NE	NE	NE	9.79	5.16	5	2.51
				2.58	4.52	-	-
Mosaicos							
45,X/46,XX	NE	NE	NE	29.90	19.35	24	12.06
45,X/46,XY	NE	NE	NE	NE	3.23	6	3.02
45,X/47,XXX	NE	NE	NE	NE	2.58	1	0.50
45,X/46,X,+mar	NE	NE	NE	NE	-	1	0.50
45,X/46,X,i(Xq)	NE	NE	NE	NE	-	9	4.52
45,X/46,X,r(X)	NE	NE	NE	NE	3.87	2	1.01
45,X/46,X,idic(X)	NE	NE	NE	NE	1.29	3	1.52
45,X,add(X)/45,X	NE	NE	NE	NE	1.94	1	0.50
Otros	NE	NE	NE	NE	0.64	1	0.50
	NE	NE	NE	NE	5.80	2	1.01
Síndrome de Klinefelter	27.6	42.2	36.3	30.04	33.55	17	8.54
47,XXY	NE	NE	NE	26.29	32.26	9	4.52
47,XXY/46,XY	NE	NE	NE	2.06	-	1	0.50
48,XXXY	NE	NE	NE	1.55	-	1	0.50
48,XXYY	NE	NE	NE	0.52	-	2	1.01
Otros	NE	NE	NE	-	1.29	4	2.01
47,XXX	15.6	2.2	22.1	1.5	1.29	5	2.51
47,XXX/46,XX	-	-	-	-	0.65	-	-
48,XXXX						3	1.52
47,XYY	27.6	2.2	26.0	2.6	0.65	-	-
47,XYY/46,XY						1	0.50
Otras alteraciones de los cromosomas sexuales	27.6	15.6	2.6	6.7	3.22	45	22.61
	100(127)	100(45)	100(77)	100(194)	100(155)	199	100

NE= No establecido

En relación a los cariotipos reportados con el diagnóstico clínico de síndrome de Turner (64.32%), el más frecuente fue 45,X (48.74%), seguido del cariotipo 45,X/46,X,+mar encontrado en 9 casos que corresponde al 4.52%. En estos últimos sería importante la revaloración de los casos y la aplicación de técnicas de citogenética molecular para identificar de qué cromosoma deriva el marcador, ya que por ejemplo si este correspondiese al Y los pacientes se encontrarían en un riesgo aumentado para desarrollar gonadoblastoma. Los casos fueron valorados clínicamente con esta información durante el periodo señalado y a criterio del médico tratante de acuerdo a los estudios disponibles en esa fecha. El tercer complemento cromosómico más frecuente fue 45,X/46,XX (3.02%), lo cual es esperado de acuerdo a lo reportado en la literatura (Tabla 11).

En relación al síndrome de Klinefelter el resultado más frecuente fue 47,XXY en un 4.52% de los casos, lo cual es esperado de acuerdo a lo reportado en la literatura y en reportes de casos (Tabla 11), de estos 9 pacientes, sólo en 4 casos (44.44%) se tuvo la sospecha clínica diagnóstica de síndrome de Klinefelter como indicación para el cariotipo, lo anterior en relación al contexto en que se hizo el estudio (Tabla 10).

La ambigüedad de genitales es una indicación para toma de cariotipo, este estudio inicial orientará el diagnóstico, ya que en base a este análisis se clasificará el tipo de trastorno del desarrollo sexual de acuerdo a los lineamientos recientes. En nuestro estudio la ambigüedad de genitales fue la segunda causa de solicitud de análisis citogenético con 42 casos (21.10%), lo cual es esperado para la población pediátrica que acude al HIMFG ya que generalmente las manifestaciones clínicas de estos pacientes llaman la atención de los médicos de primer contacto y son referidos a edades tempranas a una institución de tercer nivel para llevar a cabo su valoración y poder establecer la asignación de género lo más pronto posible.

Sin embargo, llama la atención que en 8 de estos pacientes el resultado de cariotipo fuera un complemento cromosómico 45,X (compatible con Síndrome de Turner) el cual no correspondió al motivo de solicitud de estudio; así mismo en tres casos se reportó el resultado 47,XXY (Síndrome de Klinefelter). Esto podría deberse a que en los primeros años revisados en la estadística se hayan analizado menos de 25 metafases por caso. Lo anterior de acuerdo con los criterios internacionales para la época, a diferencia de las recomendaciones actuales en que 25 es el número de metafases a analizar para por estadística poder encontrar alguna alteración cromosómica, en particular para descartar un mosaico y por lo tanto eliminar por ejemplo el diagnóstico de disgenesia gonadal mixta,

el cual sí explicaría la presentación de genitales ambiguos. Desde 1977 Ernest B. Hook describió el porcentaje de mosaico excluido dependiendo del número de metafases examinadas con un nivel de confiabilidad del 90%, 95% y 99%. Al leer 25 metafases se excluye el 9% de mosaicismo con un nivel de confiabilidad del 90%, el 12% con un nivel de confiabilidad del 95% y el 17% con un nivel de confiabilidad del 99% (Hook EB, 1977).

Otra situación a considerar es que una de las limitaciones de este estudio es que al tratarse de un análisis retrospectivo, de revisión de libretas de reporte de resultados de las alteraciones de los cromosomas sexuales, queda fuera de este alcance la revisión sistemática de los expedientes y de los pacientes para conocer el cuadro clínico completo de estos pacientes, así como su evolución.

Así mismo, es importante mencionar que en 21 casos en quienes se solicitó el cariotipo por diagnóstico de ambigüedad de genitales, estos presentaron un resultado de cariotipo sin alteraciones en los cromosomas sexuales, es decir 46,XX ó 46,XY, sin embargo, este resultado a pesar de representar un complemento cromosómico normal femenino o masculino, no correspondía al fenotipo del paciente. En estos casos es necesario buscar las principales causas monogénicas de un cariotipo 46,XX con virilización, entre los diagnósticos a considerar serían la hiperplasia suprarrenal congénita, o en el caso de un cariotipo 46,XY con subvirilización los diagnósticos diferenciales incluyen la deficiencia de 5 alfa reductasa o la insensibilidad parcial o completa a andrógenos. Una vez descartados estos diagnósticos y dependiendo de las manifestaciones clínicas y los hallazgos de estudios de imagen y hormonales, entonces se podría confirmar un trastorno del desarrollo sexual 46,XX testicular o de una disgenesia gonadal completa XY, sin embargo por el enfoque de este trabajo dicho análisis queda fuera de este análisis, si bien en su momento los resultados de los análisis mencionados fueron puestos a disposición y consideración del médico tratante.

Recientemente Baxter y Vilain refirieron la importancia de estudios adicionales con técnicas de biología molecular en aquellos casos de TDS en los que no se obtiene un diagnóstico con la citogenética convencional, como el uso de microarreglos, con los cuales se estudia todo el genoma para detectar la duplicación o delección de secuencias genómicas conocidas como variantes del número de copias (CNV, del inglés *copy-number variants*) a una resolución mucho más alta, detectándose así cambios en genes que pudieran ser causa de un TDS (Baxter RM y Vilain E, 2013).

8.2 Caso clínico con trastorno de la diferenciación sexual.

En la revisión de casos que se hizo en este estudio llamó la atención un caso familiar con dos pacientes que presentaron ambigüedad genital y un complemento sexual que no correspondía al fenotipo (Figura 37), por lo que con consentimiento informado se ofreció a la familia el poder evaluar nuevamente el caso con la aplicación de técnicas citogenéticas y moleculares, las cuales se describen a continuación.

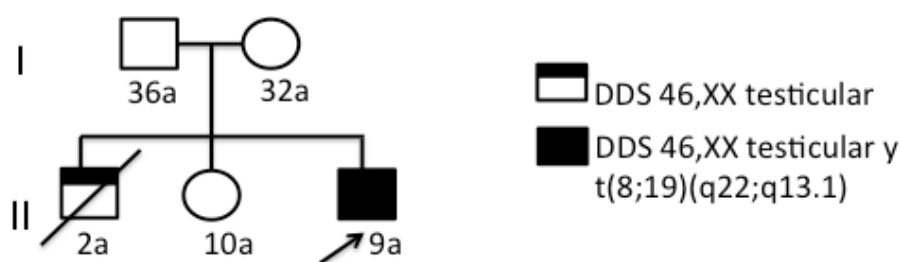


Figura 37. Árbol genealógico de 2 generaciones del caso familiar en estudio

Antecedentes heredofamiliares. Padres jóvenes, no consanguíneos, asintomáticos al momento del estudio. Una hermana de 10 años de edad aparentemente sana.

Paciente 1 (individuo II-1, figura 37). Paciente conocido a los 2 días de vida por presentar hipospadias penoescrotal, micropene, bolsa escrotal no fusionada, gónadas palpables en bolsas escrotales. Se le practicó estudio de ultrasonograma (USG) pélvico que se reportó sin evidencia de útero ni ovarios. Se realizó cariotipo con bandas GTG reportado 46,XX. Tenía asignado rol masculino y falleció durante procedimiento correctivo quirúrgico fuera del HIMFG a los 2 años de edad.

Paciente 2 (individuo II-3, figura 37). Conocido al año diez meses de edad por presentar hipospadias severa penoescrotal, micropene, escroto bífido y gónadas palpables, el paciente se encontraba en rol masculino. A los 2 años 7 meses de edad se solicitó curva de estimulación con hormona gonadotropina coriónica, la cual mostró niveles bajos de testosterona (Tabla 12).

Tabla 12. Curva de estimulación con gonadotropina corónica

03/03/2007	Testosterona	DHT	Relación
Basal	<20 ng/dl	1.8	-
24 horas	<20 ng/dl	2.4	-
48 horas	77 ng/dl	9.9	7.7
72 horas	121 ng/dl	17.7	6.8

A los 3 años de edad fue valorado por Urología, su impresión diagnóstica fue de hipospadias penoescrotal y se programó para el primer tiempo quirúrgico, dos años más tarde se realizó ortoplastía y avance meatal.

Se le realizó cariotipo con bandas GTG en sangre periférica, a los 4 años de edad, reportado un complemento cromosómico: 46,XX,t(8;19)(q22;q13.1) (QFB Ana Yolotl Aparicio Onofre, Departamento de Genética, HIMFG) (Figura 38 y 39).

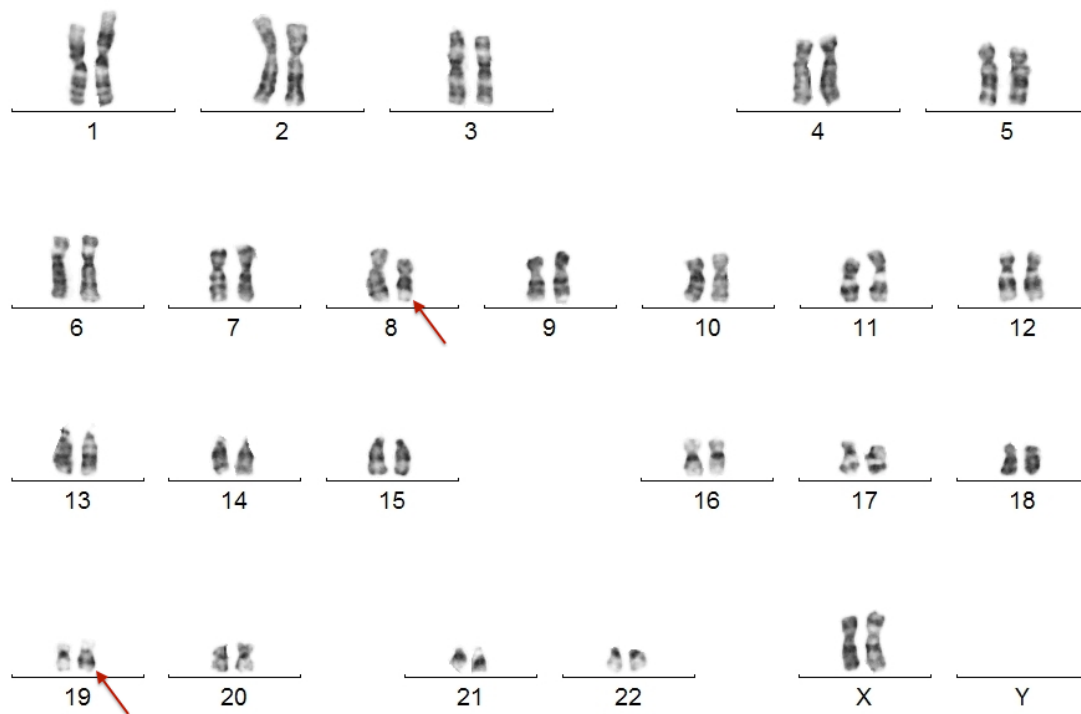


Figura 38. Cariotipo con bandas GTG del paciente II-3. Las flechas indican la translocación 8;19. (QFB Ana Yolotl Aparicio Onofre, Laboratorio de citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).



Figura 39. Cariotipo parcial con bandas GTG del paciente II-3, donde se compara los cromosomas normales (en azul) con los derivados (en rojo). (QFB Ana Yolotl Aparicio Onofre, Laboratorio de citogenética, Depto. de Genética, HIMFG).

El paciente dejó de acudir al hospital por varios años, sin embargo, debido a la presencia de dos hermanos con diagnóstico de trastorno del desarrollo sexual y a que uno de ellos presentaba una translocación se decidió retomar el caso para su reevaluación. Con consentimiento informado a los 9 años de edad se solicitaron los siguientes estudios para continuar con el abordaje diagnóstico:

- Ultrasonido pélvico : Se reportó sin evidencia de derivados Mülllerianos.
- Revaloración por Urología.

Fue revisado por Urología nuevamente a los 9 años 1 mes de edad. A la exploración física se encontró falo 4.5 cm, la ubicación del meato uretral era escrotal, gónadas palpables en bolsa escrotal, volumen testicular de 2 cc. Tres meses después se realizó segundo tiempo quirúrgico para plastia uretral y escrotoplastia.

- Búsqueda de *SRY*.

Se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la búsqueda de secuencias del gen *SRY* y para región centrómerica del Y (M. en C. Alejandro Martínez Herrera, Servicio de Genética, HGM); se utilizó como control el exón 5 del gen *SRD5A2*, el cual codifica para la 5 alfa reductasa (locus 2p23.1). Como se observa en la figura 40, el paciente no presentó amplificación para secuencias del gen *SRY* ni para región centromérica del Y (Anexo III).

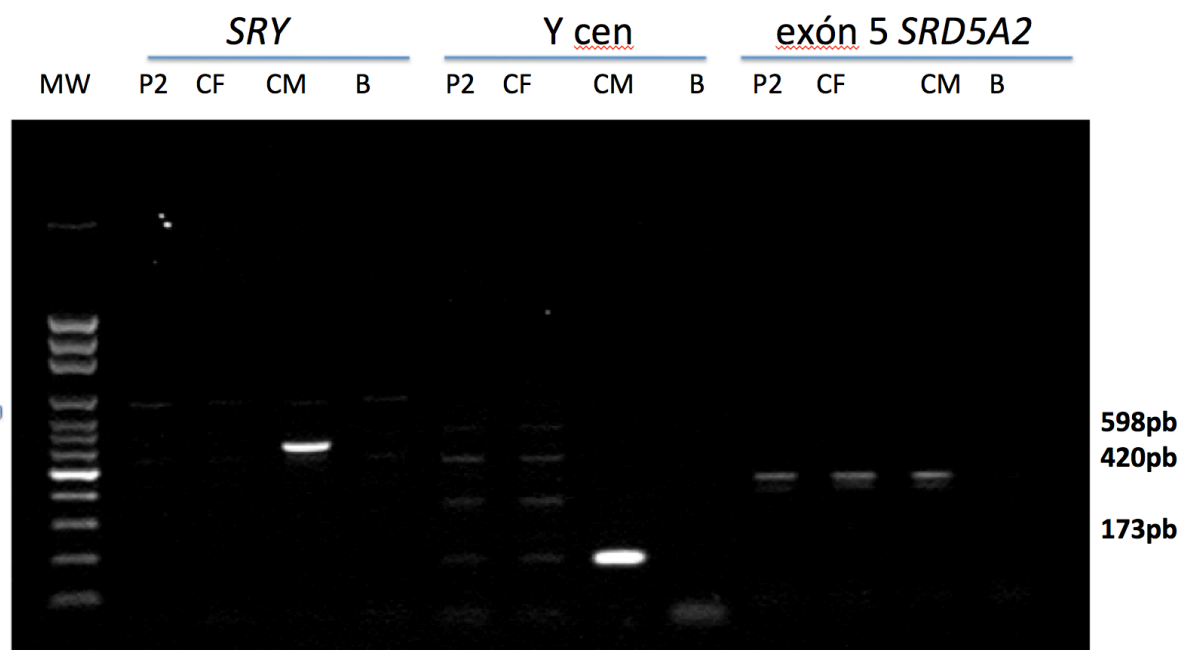


Figura 40. Análisis de *SRY*. Gel de agarosa al 2%. En las líneas se señala: MW: Marcador de Peso Molecular; P2: Paciente 2; CF: control femenino; CM: control masculino; B: blanco sin DNA. El paciente 2 (P2) no presentó amplificación de *SRY*. (M. en C. Alejandro Martínez Herrera, Servicio de Genética, HGM).

Así mismo, se realizó estudio de FISH (Anexo II) con sondas para el gen *SRY* y como control se utilizó sonda centromérica del X. El resultado se reportó como: 46,XX.ish (DXZ1x2)(*SRY*-).nuc ish(DXZ1x2)(*SRY*-).

El resultado anterior demuestra que no se evidenció la presencia de la secuencia del gen *SRY* (Biol. Karem Nieto Martínez, Facultad de Medicina UNAM y M. en C. Laura Gómez Laguna, Servicio de Genética, HGM, Facultad de Medicina, UNAM).

- Análisis citogenético familiar: debido a la presencia de la translocación t(8;19) en el paciente II-3 (Figura 37), se realizó análisis de cariotipo con bandas GTG a otros miembros de la familia (Biol. Karem Nieto Martínez, Facultad de Medicina UNAM y M. en C. Laura Gómez Laguna, Servicio de Genética, HGM, Facultad de Medicina UNAM), encontrando que el padre (individuo IV-6, figura 42), la abuela paterna (III-2, figura 42) y una tía paterna (IV-3, figura 42) son portadores balanceados del mismo rearrreglo cromosómico como se describe en el árbol genealógico (Figuras 41 y 42).

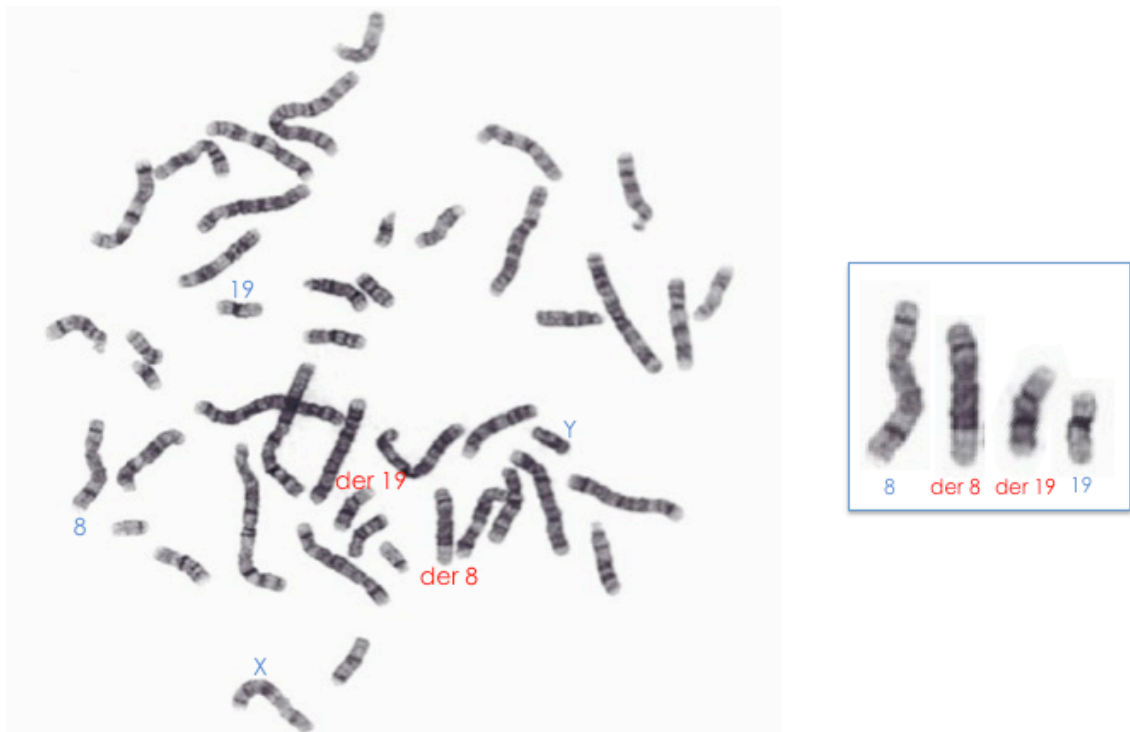


Figura 41. Cariotipo del padre del paciente (individuo IV-6). Se observa la presencia de los cromosomas 8 y 19 normales (azul), así como los derivados de los cromosomas 8 y 19 (rojo). En el cuadro de la derecha se muestra el cariotipo parcial comparando los cromosomas normales con los derivados (Biol. Karem Nieto Martínez, Facultad de Medicina UNAM y M. en C. Laura Gómez Laguna, Servicio de Genética, HGM, Facultad de Medicina, UNAM).

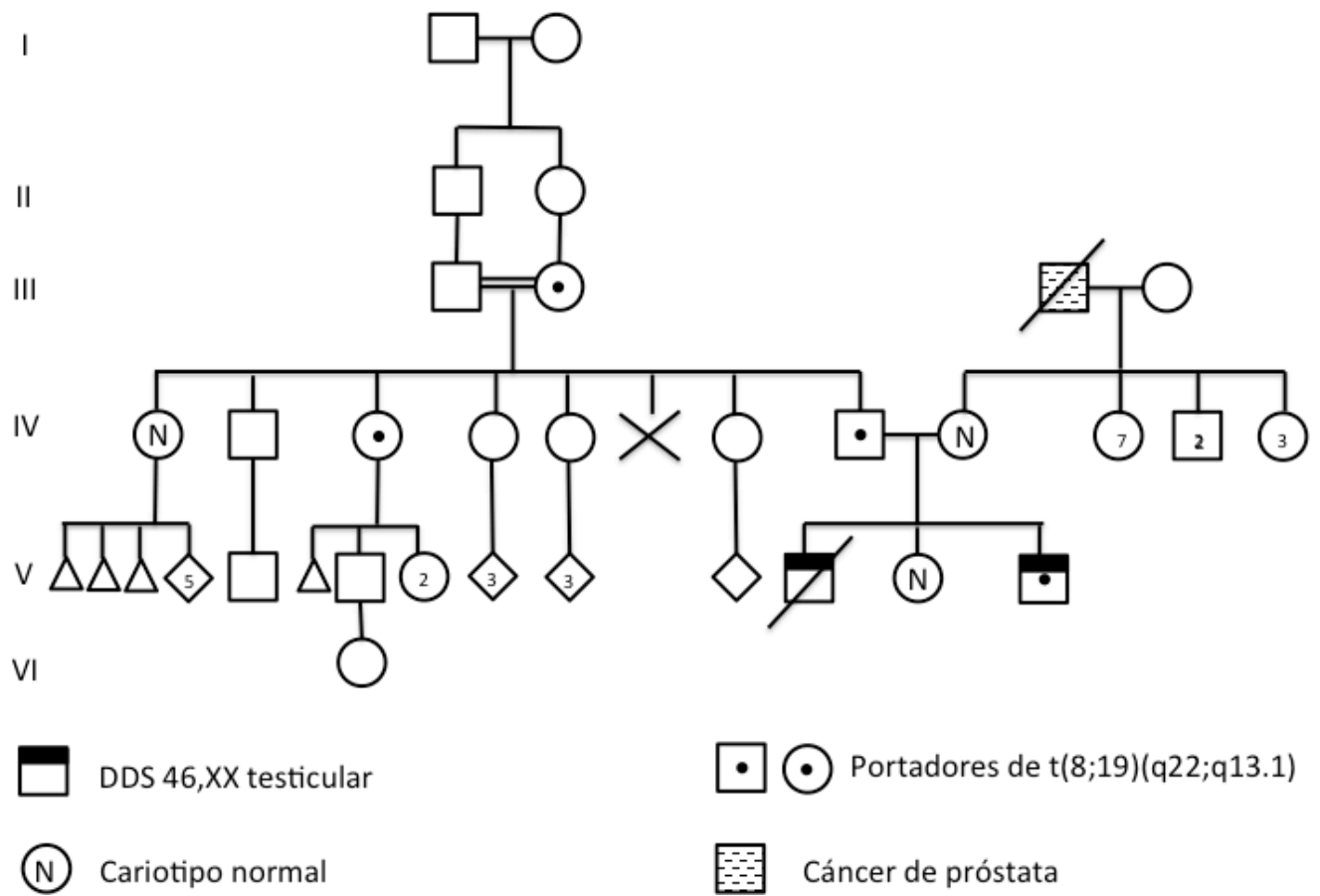


Figura 42 . Árbol genealógico de 6 generaciones donde se observa que los individuos III-2, IV-3, IV-6 y V-14 son portadores de la translocación t(8;19).

Al ampliar el árbol genealógico se informó que los abuelos paternos del paciente son consanguíneos, presentando un grado de parentesco de 1/8 y un coeficiente de consanguinidad de 1/16.

- Mapeo genómico con microarreglos

Se realizó el estudio por microarreglos de alta densidad (Dr. Fernando Fernández Ramírez, Servicio de Genética, HGM) (Anexo IV), el cual determinó que el paciente no presenta pérdidas ni ganancias de material genético relevantes, así como tampoco pérdida de heterocigosidad. Se analizaron las regiones donde se localizan genes implicados en la determinación testicular y ovárica con una resolución de 10 marcadores (Figura 43), así mismo se descartaron cambios en la dosis génica en los puntos de ruptura citogenéticos de la translocación (Figuras 44 y 45).

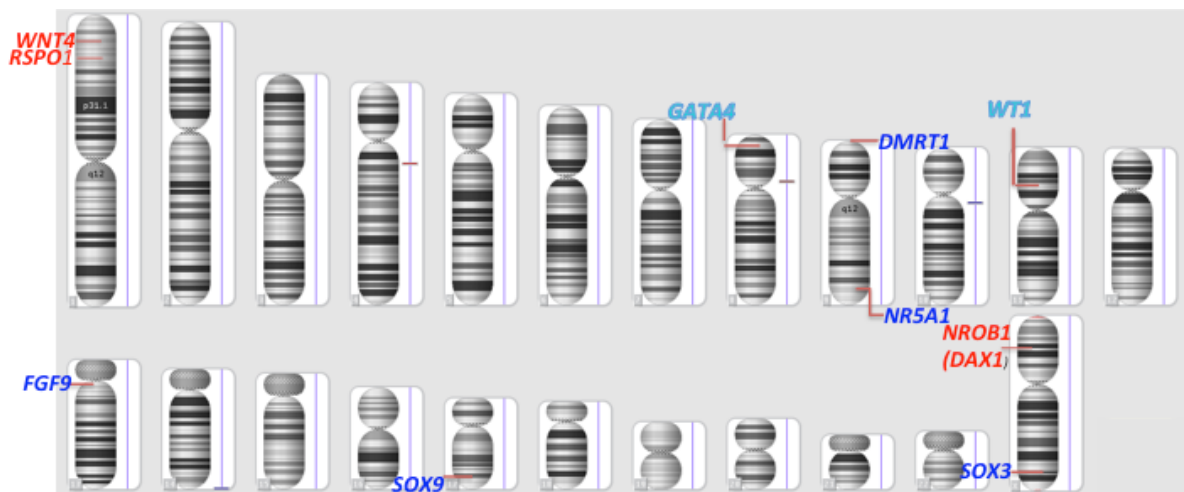


Figura 43 . Mapeo genómico con microarreglos Cytoscan (Affymetrix). Se señala en color rojo los genes que participan en la determinación ovárica y en color azul los que participan en la determinación testicular, se observa que en estas regiones no hay pérdida ni ganancia de material genético (Dr. Fernando Fernández Ramírez, Servicio de Genética, HGM).

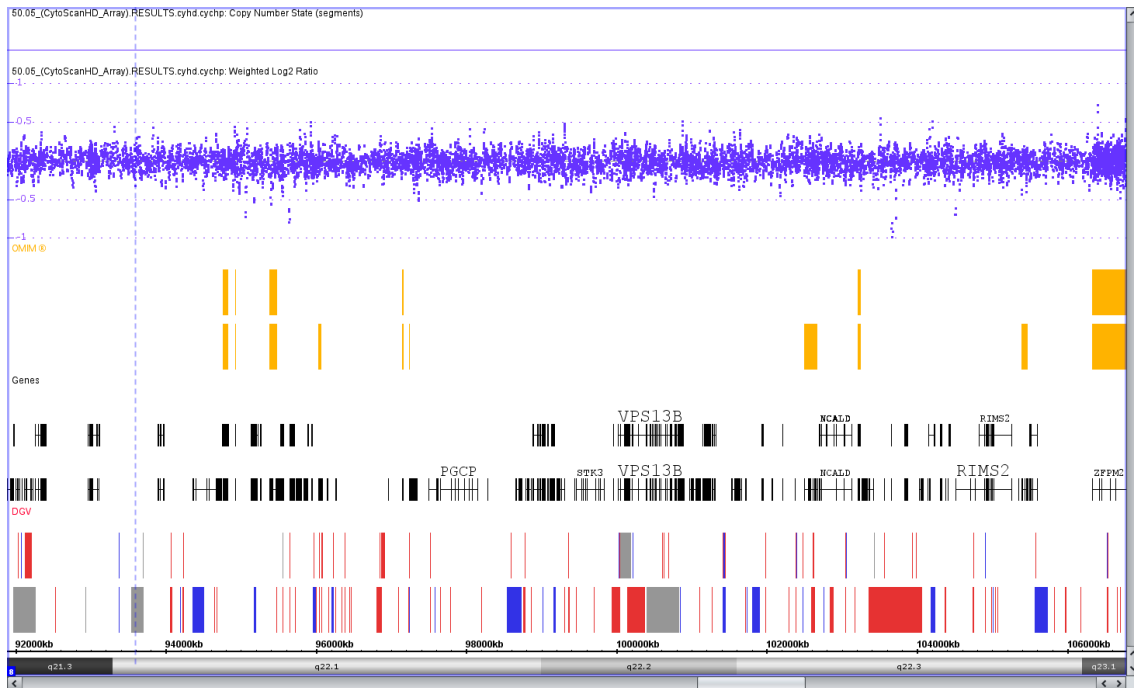


Figura 44. Punto de ruptura en 8q22; análisis con resolución de 10 marcadores. Se observa que no hay cambios en la dosis génica. (Dr. Fernando Fernández Ramírez, Servicio de Genética, HGM) .



Figura 45 . Punto de ruptura en 19q13.1; análisis con resolución de 10 marcadores. Se observa que no hay cambios en la dosis génica. (Dr. Fernando Fernández Ramírez, Servicio de Genética, HGM).

- Secuenciación del gen *RSP01*.

Se realizó la búsqueda de mutaciones del gen *RSP01* por secuenciación (M. en C. Alejandro Martínez Herrera, Servicio de Genética, HGM) (Anexo V). En el propositus (individuo II-3, figura 37) se encontró en el exón 2 una delección de GC y una inserción de AT (g.37616450_37616451delGCinsAT) en estado heterocigoto (Figura 46), de significado incierto, por lo que se analizó el gen *RSP01* en los padres. Se observó en la madre del paciente (individuo IV-8) el mismo cambio (Figura 47), mientras que en el padre (individuo IV-6) no se encontró algún cambio (Figura 48).

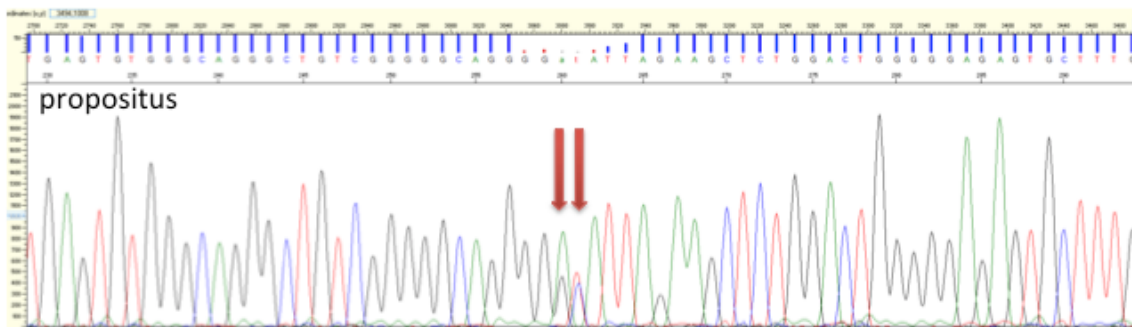


Figura 46. Cromatograma del propositus, se señala con las flechas rojas el cambio de guanina y citosina por adenina y timina en la posición 37616450 a la 37616451 del DNA genómico . (M. en C. Alejandro Martínez Herrera, Servicio de Genética, HGM).

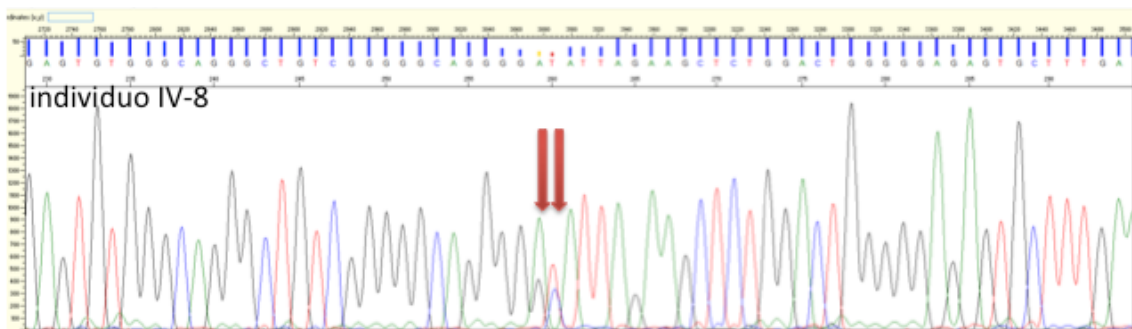


Figura 47. Cromatograma de la madre (individuo IV-8), se señala con las flechas rojas el cambio de guanina y citosina por adenina y timina en la posición 37616450 a la 37616451 del DNA genómico . (M. en C. Alejandro Martínez Herrera, Servicio de Genética, HGM).

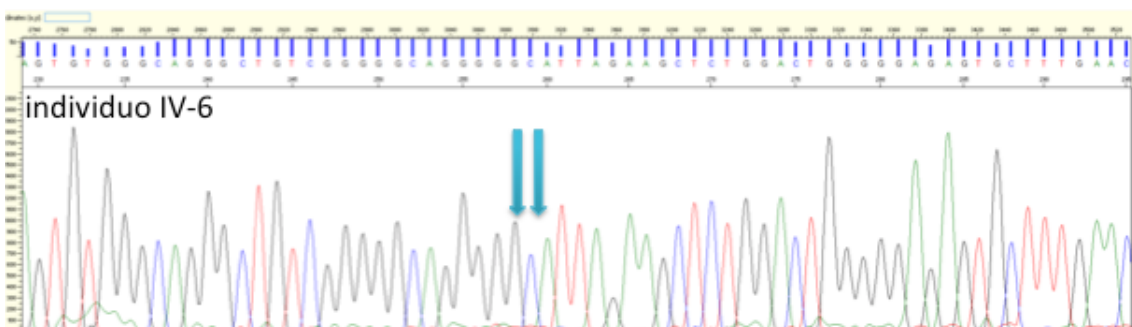


Figura 48. Cromatograma del padre (individuo IV-6), se señala con las flechas azules la secuencia normal de guanina y citosina en la posición 37616450 a la 37616451 del DNA genómico . (M. en C. Alejandro Martínez Herrera, Servicio de Genética, HGM).

8.2.1 Discusión de caso clínico de TDS

El caso familiar presenta a dos pacientes con ambigüedad de genitales, gónadas palpables, ausencia de ovarios y útero con cariotipo 46,XX y niveles bajos de testosterona, además uno de ellos era portador de una translocación (8;19), con los datos anteriores se realizó el diagnóstico de TDS 46,XX testicular de presentación familiar.

El TDS 46,XX testicular (MIM 400045), anteriormente llamado varón XX se caracteriza por presentar cariotipo 46,XX, presencia de testículos, genitales internos masculinos y ausencia de derivados Mülllerianos (Ergun-Longmire B, *et al.*, 2005). Los caracteres sexuales externos pueden presentar un fenotipo variable desde genitales masculinos hasta ambiguos, dependiendo de estas características, se ha propuesto dividir clínicamente a esta patología en dos categorías (Gao X, *et al.*, 2013):

1. Clásico: los pacientes presentan genitales internos y externos masculinos normales, sin embargo cursan con infertilidad.
2. Ambigüedad de genitales: generalmente se detecta al nacimiento por la presencia de micropene y/o hipospadias.

Los pacientes reportados en este estudio corresponderían, a la segunda categoría, es decir a un TDS 46,XX testicular con ambigüedad de genitales. La frecuencia de este síndrome se ha estimado en 1 en 20 000 recién nacidos (Gao X, *et al.*, 2013). El 90% de los casos se debe a la presencia del gen *SRY* (Zenteno-Ruiz JC, *et al.*, 2001) debido a un intercambio de información entre el cromosoma X y el Y originado por recombinación ilegítima ocurrida durante la meiosis paterna. Generalmente los pacientes *SRY* positivos no presentan ambigüedad de genitales, la manifestación clínica más común es infertilidad, por lo que el diagnóstico se retrasa hasta la edad adulta. En el caso de nuestro paciente (individuo II-3, figura 37) la búsqueda de secuencias de Y con técnicas de PCR y FISH fueron negativas por lo anterior, nuestro caso se clasificaría, de acuerdo a la propuesta de Ferguson-Smith y colaboradores, como un paciente Y-negativo (Ferguson-Smith MA, *et al.*, 1990).

En el 10% restante de los casos con esta patología se ha propuesto que se deban a cambios en otros genes como la duplicación de *SOX9* (Zenteno-Ruiz JC1, *et al.*, 2001). En 1999, Huang y colaboradores (Huang B, *et al.*, 1999) reportaron el caso de un paciente con TDS 46,XX testicular Y-negativo y genitales ambiguos con duplicación del gen *SOX9* de origen materno. Posteriormente Bishop y colaboradores observaron en ratones que el realizar una inserción transgénica de *Sox9* producía reversión sexual (Bishop CE, *et al.*, 2000).

Considerando la posibilidad de que en nuestro paciente tuviese duplicación de *SOX9*, se le solicitó mapeo genómico con microarreglos, haciendo énfasis en el locus de *SOX9* y en otros de los genes que participan en el desarrollo sexual, sin embargo se descartó esta etiología ya que el paciente no presentaba ganancias ni pérdidas de material genético.

Así mismo, llamó la atención que el paciente II-3 (Figura 37) presentara una translocación t(8;19) por lo que había que descartar que en los puntos de ruptura hubiera alguna interrupción de un gen que fuera la causante del TDS, esta situación se abordó de dos formas:

1. Se solicitó cariotipo a la familia, encontrándose individuos de ambos sexos portadores de la translocación y un individuo XX afectado (individuo II-3, Figura 36) con TDS quien era portador de la translocación y otro individuo XX (individuo II-1, Figura 36) con TDS pero sin translocación y basados en los estudios de citogenética molecular, se consideró que en todos los casos la translocación era balanceada y se descartó que fuera causa del TDS. Así mismo, otros individuos XX (individuo III.2 y IV.3, Figura 42) con presencia de la translocación (8;19) no presentaron reversión sexual.
2. Se realizó mapeo genómico con microarreglos, en el que se observó que no había alteraciones de dosis génica en los puntos de ruptura citogenéticos por lo que se confirmó nuevamente por otra técnica que la translocación no era la causa del TDS (Figuras 44 y 45).

Una de las características que más llama la atención de este caso es el hecho de que dos hermanos estuviesen afectados ya que la mayoría de los casos de TDS 46,XX testicular son esporádicos (Zenteno JC, *et al.*, 1997), si bien en la literatura se han reportado 21 casos familiares de TDS 46,XX testicular (McElreavey K, *et al.*, 1993; Kuhnle U, *et al.*, 1993; Ramos ES, *et al.*, 1996; Zenteno JC, *et al.*, 1997; Sarafoglou K y Ostrer H, 1999; Radi O, *et al.*, 2005; Temel SG, *et al.*, 2007; Maciel-Guerra AT, *et al.*, 2008; Vetro A, *et al.*, 2011, Cox JJ, *et al.*, 2011). Sólo en cuatro de estos estudios familiares, donde en ninguno se encontró la presencia de *SRY*, se realizó la búsqueda de mutaciones en otros genes. En dos casos familiares se describió que la duplicación de *SOX9* era la causa del TDS, mientras que en los estudios restantes no se encontró la causa (Temel SG, *et al.*, 2007; Maciel-Guerra AT, *et al.*, 2008; Vetro A, *et al.*, 2011, Cox JJ, *et al.*, 2011) (Tabla 13).

Tabla 13. Manifestaciones clínicas y estudios realizados a casos familiares de TDS 46,XX testicular

	Temel 2007	Maciel-Guerra 2008	Vetro 2011	Cox 2011	Estudio actual 2014
Número de familiares con TDS 46,XX testicular	6	1*	2	3	1
Rango de edad	10-33 años	NE	46-47 años	NE	9 años
Manifestaciones clínicas					
Ambigüedad de genitales		+			+
Criptorquidia	+				
Gónadas inmaduras	+		+		
Hipospadias		+			+
Ginecomastia	+		+		
Infertilidad			+	+	
Estudios realizados					
FISH					
<i>SRY</i>	negativo	-	-		negativo
<i>SOX9</i>	sin duplicación	-	-	duplicación	-
Microarreglos	-	-	duplicación (<i>SOX9</i>)	duplicación (<i>SOX9</i>)	sin alteraciones
PCR					
<i>SRY</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
RT-PCR					
<i>SOX9</i>	-	sin duplicación	duplicación	duplicación	-
Secuenciación					
<i>DAX1</i>	-	sin alteración	-	-	-
<i>RSPO1</i>	-	-	-	-	negativo

NE no especificado, +presente, - estudio no realizado

* El paciente tiene el antecedente de un hermano gemelo monocigoto con diagnóstico de TDS ovotesticular, presentó cariotipo 46,XX, sin presencia de *SRY*, ni duplicación de *SOX9*, ni alteración en el gen *DAX1*.

En el paciente reportado en este estudio se descartaron las dos principales causas referidas en la literatura de un TDS 46,XX testicular: la presencia de *SRY* y duplicaciones de *SOX9*, por ello se consideró la búsqueda de mutaciones en otros genes. Se decidió iniciar con la secuenciación de *RSP01* debido a que éste es uno de los genes principales en la formación del ovario y es el gen considerado determinante ovárico (Biaison-Lauber A, 2010). Además en el 2006, Parma y colaboradores (Parma P, *et al.*, 2006) realizaron la secuenciación de *RSP01* en un caso familiar de TDS 46,XX testicular con hiperqueratosis palmoplantar y predisposición a carcinoma de células escamosas de piel (Radi O, *et al.*, 2005) y observaron que los pacientes afectados presentaban una inserción en el gen *RSP01* posterior al nucleótido 896, en forma homocigota, que resultaba en un codón de paro prematuro, se concluyó que esta alteración al suprimir la función de *RSP01* no iniciaba la formación de tejido ovárico y por lo tanto era la causa del cuadro clínico de los pacientes (Parma P, *et al.*, 2006).

En nuestro caso, se encontró que el individuo II-3 presentaba un cambio en g.37616450_37616451delGCinsAT en estado heterocigoto en el gen *RSP01*. Se realizó la búsqueda de este cambio en las bases de datos internacionales, sin embargo no se encontró previamente reportado, por lo que la significancia clínica es desconocida. Por lo anterior se amplió el estudio a los padres y se encontró que la madre también presentaba en estado heterocigoto g.37616450_37616451delGCinsAT, con lo que se descartó que ésta fuera la causa del TDS, debido a que la madre quien tiene cariotipo 46,XX no presenta dato alguno de un TDS, por lo que se probablemente se trate de un polimorfismo.

Actualmente se propone que la causa del TDS 46,XX testicular en la familia estudiada sea una mutación en otro gen, cuya alteración active la diferenciación testicular por debajo de *SRY*.

A los familiares portadores de la translocación 8;19 se les informó el resultado y se otorgó asesoramiento genético con respecto a la segregación de este rearrreglo cromosómico en futuros embarazos.

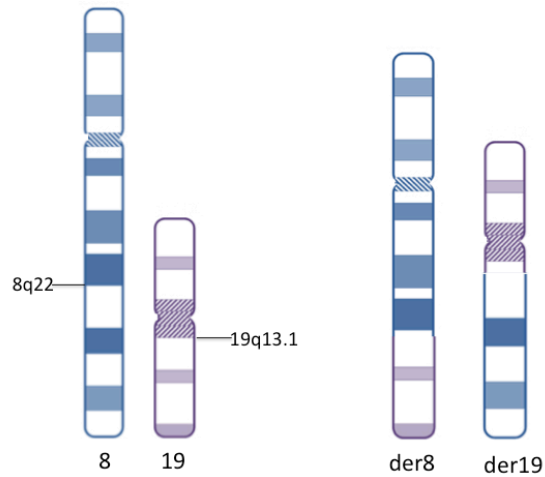


Figura 49. Se muestran los cromosomas 8 (azul) y 19 (morado) normales y los derivados de la translocación 8 y 19.

Las posibilidades de segregación que existen en individuos portadores de la $t(8;19)(q22;q13.1)$ son:

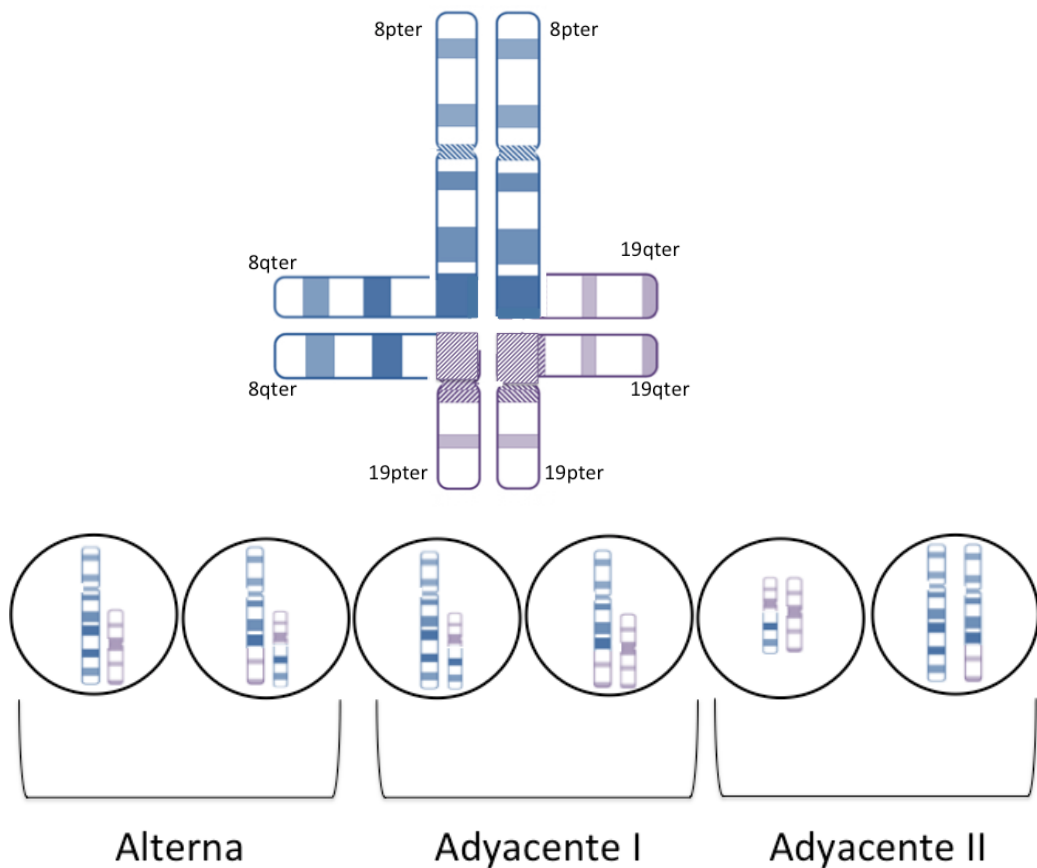


Figura 50. Se muestra la cruz de paquiteno con los cromosomas involucrados, para ejemplificar las posibilidades de segregación 2:2.

- Segregación alterna: Cromosomas 8 y 19; normales.
- Segregación alterna: Derivativos 8 y 19; portadores de la translocación balanceada.
- Segregación adyacente I: Cromosoma 8 normal y derivativo del 19; trisomía parcial 8q y monosomía parcial 19q.
- Segregación adyacente I: Derivativo del 8 y cromosoma 19 normal; trisomía parcial 19q y monosomía parcial 8q.
- Segregación adyacente II: Cromosoma 19 normal y derivativo del 19; trisomía casi completa del cromosoma 19 y monosomía casi completa del cromosoma 8.
- Segregación adyacente II: Cromosoma 8 normal y derivativo del 8; trisomía casi completa del cromosoma 8 y monosomía casi completa del cromosoma 19.

Por lo anterior, en el asesoramiento genético se les explicó a los familiares portadores de la translocación 8;19 que por cada embarazo tienen un 33.33% de probabilidad de tener un hijo sano, de estos 16.67% tendrán los cromosomas 8 y 19 normales y el 16.67% de serán portadores asintomáticos de la translocación.

Presentan un 16.67% de probabilidad de tener un hijo con trisomía parcial 8q y monosomía parcial 19q que se reflejaría en un conjunto de manifestaciones clínicas que se superpondrían con el síndrome de duplicación 8q caracterizado por peso bajo al nacer, retraso mental, frente prominente, occipucio aplanado, cara triangular, fisuras palpebrales oblicuas ascendentes, estrabismo, nariz corta con base ancha y pabellones auriculares de baja implantación (Hennekam RCM, *et al.*, 2010) y con características producidas por la delección de 19q, en el cual no hay un fenotipo clásico descrito en la literatura.

Un 16.67% de probabilidad de tener un hijo con trisomía parcial de 19q y monosomía parcial 8q, el cual presentaría características del síndrome de duplicación 19q como: peso bajo al nacimiento, retraso en el crecimiento postnatal, microbraquicefalia, retraso mental, fisuras palpebrales descendentes, hipertelorismo, ptosis, glabella prominente, nariz y filtrum cortos, labio y/o paladar hendido, cuello corto con piel redundante en nuca, hipotonía, diástasis de rectos, cifosis y pie valgo; y características del síndrome de Langer Giedion o síndrome tricorinofalángico tipo II (MIM # 150230), el cual se debe a la pérdida de los genes *TRPS1* y *EXT1*, con loci 8q23.3 y 8q24.11 respectivamente y cuyas manifestaciones clínicas son: pelo escaso, nariz bulbosa, labio superior elongado,

pabellones auriculares grandes y en antroversión, múltiples exostosis y retraso mental (Shinzel A, *et al.*, 2013).

El 33.33% restante tendrían de probabilidad de tener un aborto, debido a que la trisomía casi completa del cromosoma 19 y monosomía casi completa del cromosoma 8 es incompatible con la vida. Mientras que la trisomía del cromosoma 8 se presenta como síndrome de Warkany el cual tiene una supervivencia casi normal (Hennekam RCM, *et al.*, 2010), sin embargo, la monosomía casi completa del cromosoma 19 es incompatible con la vida, por lo que resultaría en un aborto.

En la literatura hay diversos casos reportados con una translocación 8:19, sin embargo, sólo se encontró un reporte con puntos de ruptura similares a este caso. En 1999 Xue y colaboradores describieron a 2 pacientes que presentaban leucemia mieloide aguda y una translocación (8;19)(q22;q13) encontrada en médula ósea, se postuló que este rearrreglo cromosómico ocasionaba la fusión del gen *ETO* con algún otro gen en 19q13 que producía la formación de una proteína quimérica que promovía la división celular (Xue Y, *et al.*, 1999). Posteriormente se redefinió el locus del gen *ETO* en 8q21.3, sin embargo no se han hecho estudios adicionales para definir la causa de la leucemia mieloide aguda en relación a la translocación (8;19)(q22;q13) por lo que a los portadores de la familia de este estudio podría ofrecerse un seguimiento periódico con biometrías hemáticas de control.

9. Conclusiones

En esta tesis se realizó un análisis de la estadística de los resultados de cariotipo realizados en el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez, del 2002 al 2012 en búsqueda de alteraciones de los cromosomas sexuales, concluyéndose lo siguiente:

- Las aberraciones de los cromosomas sexuales en nuestra población, no son tan frecuentes, como lo reportado en la población general. Sin embargo, en estudios similares a este donde se solicita el estudio citogenético a pacientes con alguna alteración clínica, sí coincide con lo referido en este estudio.
- El tipo de alteraciones cromosómicas observadas sí corresponde a lo referido en la literatura, es decir, las alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales si fueron más frecuentes que las estructurales y el síndrome de Turner, con cariotipo 45,X, fue la aberración más frecuente encontrada en la población pediátrica.
- Una causa frecuente por lo que se solicitó análisis citogenético es por la presencia de ambigüedad de genitales. El 21.11% de las alteraciones de los cromosomas sexuales estuvieron asociadas a un trastorno en el desarrollo sexual. De estos casos fue posible identificar un caso familiar en el cual, se pudo realizar en uno de los pacientes técnicas de citogenética molecular y biología molecular para ampliar su estudio.

Conclusiones del caso en particular.

- El TDS 46,XX testicular es una entidad compleja con expresividad variable y heterogeneidad genética. En la actualidad, hay casos similares al reportado en esta tesis, sin que se haya podido determinar su etiología aún, por lo que es importante continuar con la búsqueda de genes candidatos para ampliar el conocimiento y poder brindar a los pacientes y sus familiares un asesoramiento genético con bases moleculares.

10. Bibliografía

- Affara NA, Sargent CA (2006). Chromosome Y. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005925.
- Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet.* 2001; 2:59-67.
- Baillet A , Mandon-Pepin B. Mammalian ovary differentiation – A focus on female meiosis. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356:13-23.
- Balkan M, Akbas H, Isi H, Oral D, Turkyilmaz A, Kalkanli S, Simsek S, Fidanboy M, Alp MN, Gedik A, Budak T. Cytogenetic analysis of 4216 patients referred for suspected chromosomal abnormalities in Southeast Turkey. *Genet Mol Res* 2010; 9:1094-103.
- Barr ML, Bertram EG. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 1949; 163:676.
- Baxter RM, Vilain E. Translational genetics for diagnosis of human disorders of sex development. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013; 14:371-92.
- Bejjani BA y Shaffer LG. Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9:71-86.
- Bender BG, Linden MG, Harmon RJ. Life adaptation in 35 adults with sex chromosome abnormalities. *Genet Med* 2001; 3:187–191.
- Berletch JB, Yang F, Xu J, Carrel L, Disteche CM. Genes that escape from X inactivation. *Hum Genet* 2011; 130:237-45.
- Biason-Lauber A. Control of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24:163-86.
- Bickmore WA (2001). Karyotype analysis and chromosome banding. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0001160.
- Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, Harrison WR, *et al.* A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 2000; 26:490-4.
- Choi WS, Kim KH, Paik YK. A cytogenetic study in patients referred for suspected chromosomal abnormalities. *J Hanyang Med Coll* 1984; 4:565-97.
- Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, Migliaccio C, Miano MG, *et al.* Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet* 2000; 9:395-401.

- Consortium on the management of disorders of sex development. Clinical guidelines for the management of disorders of sex development in childhood. DSD guidelines. Disponible en www.dsdguidelines.org. (Fecha de consulta: 03-02-214).
- Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. A SOX9 duplication and familial 46, XX developmental testicular disorder. *N Engl J Med* 2011; 364:91-93.
- Crews D. Sex determination: where environment and genetics meet. *Evol Dev* 2003; 5:50-5.
- Delhanty J (2010). Origins of human aneuploidy. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0021444.
- Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:450-8.
- Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Res* 2012; 20:215-38.
- El-Mogharbel N , Graves JAM (2008). X and Y chromosomes: homologous regions. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005793.pub2.
- Ergun-Longmire B, Vinci G, Alonso L, Matthew S, Tansi S, Lin-Su K, et al. Clinical, hormonal and cytogenetic evaluation of 46,XX male and review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005; 18:739-48.
- Ferguson-Smith MA, Yates JRW. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative European study on 52,965 amniocenteses. *Prenat Diagn* 1984; 4:5–44.
- Ferguson-Smith MA, Cooke A, Affara NA, Boyd E, Tolmie JL. Genotype-phenotype correlations in XX males and their bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet* 1990; 84:198-202.
- Galland JG, Loupardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 63:378-83.
- Gao X, Chen G, Huang J, Bai Q, Zhao N, Shao M, *et al*. Clinical, cytogenetic, and molecular analysis with 46,XX male sex reversal syndrome: case reports. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30:431-5.
- Gartler SM , Goldman MA (2005). X-Chromosome inactivation. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0004172.
- Ghazaey S, Mirzaei F, Ahadian M, Keifi F, Semiramis T, Abbaszadegan MR. Pattern of chromosomal aberrations in patients from north East Iran. *Cell J* 2013; 15:258-65.

- Gilchrist S, Bickmore WA (2006). Chromosome structures: visualization. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005784.
- Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 1987; 51:887-898.
- Helena Mangs A, Morris BJ. The human pseudoautosomal region (PAR): origin, function and future. *Curr Genomics* 2007; 8:129-36.
- Hennekam RCM, Krantz ID, Allanson JE. Chromosomal syndromes: unusual variants. En: Gorlin's Syndromes of the Head and Neck. Oxford Univeristy Press; 2010. pp 76-118.
- Holmquist GP (2005). Chromosomal bands and sequence features. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005002.
- Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet* 1977; 29:94-7.
- Hsieh CL (2011). Cytogenetic techniques. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002650.pub2.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* 1999; 87:349-53.
- Hughes IA. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22:119-34.
- Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA; Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society/European Society for Paediatric Endocrinology Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol* 2006; 2:148-62.
- Hughes IA, Nihoul-Fékété C, Thomas B, Cohen-Kettenis PT. Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21(3):351-65.
- Jacobs PA. The incidence and etiology of sex chromosome abnormalities in man. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1979; 15:3-14.
- Kim SS, Jung SC, Kim HJ, Moon HR, Lee JS. Chromosome abnormalities in a referred population for suspected chromosomal aberrations: a report of 4117 cases. *J Korean Med Sci* 1999; 14:373-6.
- Kofman-Alfaro S, Queipo G. Diferenciación sexual normal y patológica. *Mensaje Bioquímico* 2005; 29: 109-118.
- Kuhnle U, Schwarz HP, Löhns U, Stengel-Ruthkowski S, Cleve H, Braun A. Familial true hermaphroditism: paternal and maternal transmission of true hermaphroditism

- (46,XX) and XX maleness in the absence of Y-chromosomal sequences. *Hum Genet* 1993; 92:571-6.
- Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA; International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. Consensus statement on management of intersex disorders. *International Consensus Conference on Intersex. Pediatrics* 2006; 118:488-500.
 - Li X. Sex chromosomes and sex chromosome abnormalities. *Clin Lab Med* 2011; 31:463-79.
 - Linden MG, Bender BG, Robinson A. Genetic counseling for sex chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 2002; 110:3-10.
 - Lucchesi JC (2014). Sex Chromosomes. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005791.pub2.
 - Luthardt FW, Keiteges E. Chromosomal syndromes and genetic disease. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0001446.
 - Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190:372-373.
 - Maciel-Guerra AT, de Mello MP, Coeli FB, Ribeiro ML, Miranda ML, Marques-de-Faria AP, *et al.* XX maleness and XX true hermaphroditism in SRY-negative monozygotic twins: additional evidence for a common origin. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:339-43.
 - Mason PJ, Perdignes N. Telomere biology and translational research. *Transl Res* 2013; 162: 333-42.
 - McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3368-72.
 - McIntosh JR, Molodtsov MI, Ataullakhanov FI. Biophysics of mitosis. *Q Rev Biophys* 2012;45:147-207.
 - Minkovsky A, Patel S, Plath K. Concise Review: Pluripotency and the transcriptional inactivation of the female mammalian X chromosome. *Stem Cells* 2012; 30:48-54.
 - Moore CM, Best RG (2007). Chromosome mechanics. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001441.pub2.

- Nielsen J y Wohlert M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark. *Hum Genet* 1991; 87:81-3.
- Ohhata T, Wutz A. Reactivation of the inactive X chromosome in development and reprogramming. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70:2443-61.
- Ohno S, Kaplan WD, Kinoshita R. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp Cell Res* 1959; 18:415-419.
- Ono M, Harley VR. Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9:79-91.
- O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:171-81.
- Oster H. Disorders of sex development (DSDs): an update. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:1503-9.
- Pack SD, Stratakis CA (2002). Chromosomes: methods for preparation. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0002709.
- Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008; 42:301-34.
- Paulson JR, Vagnarelli P (2011). Chromosomes and chromatin. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005766.pub2.
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, *et al*. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006; 38:1304-9.
- Pasterski V, Prentice P, Hughes IA. Impact of the consensus statement and the new DSD classification system. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24:187-95.
- Payer B, Lee JT. X Chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annu Rev Genet* 2008;42:733-72.
- Payer B, Lee JT, Namekawa SH. X-inactivation and X-reactivation: epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells. *Hum Genet* 2011; 130:265-80.
- Pessia E, Engelstädter J, Marais GA. The evolution of X chromosome inactivation in mammals: the demise of Ohno's hypothesis? *Cell Mol Life Sci* 2014; 71:1383-94.
- Pontier DB, Gribnau J. Xist regulation and function explored. *Hum Genet* 2011; 130:223-36.

- Radi O, Parma P, Imbeaud S, Nasca MR, Uccellatore F, Maraschio P, *et al.* XX sex reversal, palmoplantar keratoderma, and predisposition to squamous cell carcinoma: genetic analysis in one family. *Am J Med Genet A* 2005;138A:241-6.
- Ramos ES, Moreira-Filho CA, Vicente YA, Llorach-Velludo MA, Tucci S Jr, Duarte MH, Araújo AG, Martelli L. SRY-negative true hermaphrodites and an XX male in two generations of the same family. *Hum Genet* 1996; 97:596-8.
- Raudsepp T, Das PJ, Avila F, Chowdhary BP. The pseudoautosomal region and sex chromosome aneuploidies in domestic species. *Sex Dev* 2012; 6:72-83.
- Riegel M. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genet Mol Biol* 2014; 37:194-209.
- Robinson A, Bender BG, Linden MG, Salbenblatt JA. Sex chromosome aneuploidy: the Denver prospective study. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1990; 26:59– 115.
- Robinson WP, McFadden DE (2002). Chromosomal genetic disease: numerical aberrations. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001451.pub2.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 2005; 434:325-37.
- Sarafoglou K, Ostrer H. Clinical review 111: familial sex reversal: a review. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:483-93.
- Shaffer LG (2004). Karyotype interpretation. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005778.
- Sharkey FH, Maher E, FitzPatrick DR. Chromosome analysis: what and when to request. *Arch Dis Child* 2005; 90:1264-9.
- Schinzel A, Riegel M, Baumer A, Superti-Furga A, Moreira LM, Santo LD, *et al.* Long-term follow-up of four patients with Langer-Giedion syndrome: clinical course and complications. *Am J Med Genet A* 2013; 161:2216-25.
- Simon MD, Pinter SF, Fang R, Sarma K, Rutenberg-Schoenberg M, Bowman SK, *et al.* High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation. *Nature* 2013; 504:465-9.
- Speicher MR (2005). Fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques. En: *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005779.
- Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 2005; 6:782-92.

- Tate S, Ferrigno PK (2006). Cell Cycle: Synchronization at various stages. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0002570.
- Temel SG, Gulden T, Yakut T, Saglam H, Kilic N, Bausch E, *et al.* Extended pedigree with multiple cases of XX sex reversal in the absence of SRY and of a mutation at the SOX9 locus. *Sex Dev* 2007; 1:24-34.
- Thadani R, Uhlmann F, Heeger S. Condensin, chromatin crossbarring and chromosome condensation. *Curr Biol* 2012; 22:R1012-21.
- Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34:119-24.
- Tijo JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956; 42:1-6.
- Truman AW, Kitazono A, Fitz Gerald JN, Kron SJ (2012). Cell cycle: regulation by cyclins. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001364.pub3.
- Tsuchiya KD. Fluorescence in situ hybridization. *Clin Lab Med* 2011; 31:525-42.
- Tyler-Smith C (2005). Chromosome Y: general and special features. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0005796.pub2.
- Vetro A1, Ciccone R, Giorda R, Patricelli MG, Della Mina E, Forlino A, *et al.* XX males SRY negative: a confirmed cause of infertility. *J Med Genet.* 2011; 48:710-2.
- Walker LC y Waddell N (2010) Studying genomic aberrations by microarray profiling. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0022417.
- Walczak CE, Cai S, Khodjakov A. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 91-102.
- Warburton D (2005). Chromosome analysis and identification. En: Encyclopedia of Life Sciences (eLS). John Wiley & Sons Ltd, Chichester. DOI: 10.1038/npg.els.0005775.
- Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 1972; 239:197-201.
- Wegner RD, Bloechle M. Genetic testing in couples with infertility. *Gynakol Geburtsmed Gynakol Endokrinol* 2009;5: 168-181.
- Woodward M y Patwardhan N. Disorders of sex development. *Surgery* 2010; 28:396-491.
- Zenteno JC, López M, Vera C, Méndez JP, Kofman-Alfaro S. Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Hum Genet* 1997; 100:606-10.

- Zenteno-Ruiz JC, Kofman-Alfaro S, Méndez JP. 46,XX sex reversal. Arch Med Res 2001; 32:559-66.
- Zhang Y, Castillo-Morales A, Jiang M, Zhu Y, Hu L, Urrutia AO, *et al.* Genes that escape X-inactivation in humans have high intraspecific variability in expression, are associated with mental impairment but are not slow evolving. Mol Biol Evol 2013; 30:2588-601.

11. Anexos

Anexo I

Cariotipo con técnica de bandas GTG

Procedimiento:

- 1) Se obtienen 1.5ml de sangre periférica por punción directa, en jeringa previamente heparinizada con 0.1ml de heparina sódica de 1,000 UI.
- 2) Se agregan 700µl de muestra en 2 tubos de ensayo Falcon desechables de polipropileno esterilizados.
- 3) Se agregan 5ml de medio de cultivo PB-MAX (contiene RPMI 1640, fitohemaglutinina, suero bovino fetal, antibióticos estreptomycin y penicilina, L-glutamina).
- 4) Se incuba por 72 horas a 37-37.5°C.
- 5) A las 72 hrs se agregan 20µl de colchicina, a una concentración de 0.5 gr, a cada tubo, se agita y se incuban 30 min más a 37-37.5°C.
- 6) Se centrifuga por 10 minutos a 2,500rpm.
- 7) Se decanta el sobrenadante y se resuspende agitando en vortex y se agrega solución hipotónica para completar un volumen de 12ml.
- 8) Se incuba 30 minutos a 37-37.5°C.
- 9) Centrifugar 10 minutos a 2,500rpm.
- 10) Con pipeta se retira el sobrenadante y en agitación se agrega fijador frío o solución de Carnoy, gota a gota para completar un volumen de 80ml.
- 11) Se refrigera por 20 minutos.
- 12) Se centrifuga y se retira el sobrenadante, se lleva a un volumen de 8ml para el primer lavado.
- 13) Se centrifuga nuevamente, se retira el sobrenadante y se lleva a un volumen de 6ml para el segundo lavado.
- 14) Se gotea el cultivo en laminillas de vidrio y se revisa el material determinando la calidad y cantidad de metafases presentes.
- 15) Las laminillas obtenidas se incuban en una estufa a 60°C por espacio de 24 horas.
- 16) Sumergir de 10-30 segundos una laminilla en el primer coplin, (con tripsina para la digestión de proteínas).
- 17) Sacar la laminilla al término del tiempo y enjuagarla en el segundo coplin (con buffer a pH 7 para detener la actividad de la tripsina).

- 18) Sumergir la laminilla en el siguiente coplin 2 minutos (tinción con Wright).
- 19) Sumergir la laminilla en el siguiente coplin 2 minutos (tinción con Giemsa).
- 20) Sumergir y enjuagar la laminilla en el vaso de precipitados.
- 21) Secar.
- 22) Montar inmediatamente con 3 gotas de entellán y cubreobjetos.
- 23) Revisar la calidad de las bandas.
- 24) Dejar secar a temperatura ambiente.
- 25) Analizar al microscopio.

Anexo II

FISH (Hibridación *in situ* con fluorescencia)

Procedimiento:

- 1) Se realiza la técnica de cariotipo hasta la preparación de laminillas.
- 2) El ambiente de humedad relativa debe de estar en un rango de 50 - 60% y la temperatura entre 24–26°C.
- 3) Se resuspende el botón con la cantidad de solución fijadora para tener la concentración de metafases adecuada.
- 4) Sobre una laminilla prelavada (FISHERbrand™) se gotea el material celular en un área de acuerdo a la cantidad de sonda que se va a hibridar.
- 5) Se verifica la calidad del material celular en un microscopio de contraste de fase, los cromosomas se deben observar de color “gris rata” y libres de citoplasma para obtener una buena hibridación.
- 6) Se procede a la maduración de la muestra.
- 7) Las preparaciones celulares se incuban a 37°C en SSC 2X por 30 min, al término de esta, se deshidratan en series de etanol al 70%, 85% y 100% por 2 minutos en cada uno y se deja secar.
- 8) Se procede a la co-desnaturalización.
- 9) Las sondas previamente mezcladas con el amortiguador se colocan sobre la laminilla madurada en el área de mejor calidad celular, se coloca un cubreobjetos limpio de 22 x 22 mm, se sella con cemento de goma. La co-desnaturalización se realiza en el HyBryte (casa comercial) a 71°C por 2 minutos, se realiza un control estricto de la temperatura y tiempo de desnaturalización.
- 10) Se procede a la hibridación.
- 11) Se colocan las laminillas en una cámara húmeda protegida de la luz a 37°C por 16 a 24 horas.
- 12) 24 horas después, se remueve con cuidado el sellador y se retira el cubreobjetos, las laminillas son lavadas en 40 ml de SSC 0.4X/NP-40 al 0.3% a 73°C por 2 min y posteriormente en 40 ml de SSC 2X/NP-40 al 0.1% a temperatura ambiente en un tiempo no mayor a un 1 min, se deja secar la laminilla al aire en la oscuridad y se agrega como contratinción 8µl de DAPI/Antifade, se coloca un cubreobjetos, se sella con cemento de goma para su análisis en un microscopio de epifluorescencia con el programa Isis de Carl Zeiss ®.

Anexo III

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Procedimiento:

- 1) La reacción de PCR se llevó a cabo con 100 ng de DNAg con la enzima GoTaq Flexi DNA Pol (PROMEGA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante en un termociclador 2700 de AB.
- 2) Los productos de PCR se purifican empleando el kit GEL/PCR purification kit (FAVORGEN) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.
- 3) El producto de PCR purificado se cuantificó en nanodrop.
- 4) Finalmente el producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2%.

Anexo IV

Mapeo genómico con microarreglos de alta densidad

Procedimiento:

- 1) El DNA genómico del paciente se purificó a partir de una muestra de sangre periférica (3 mL) utilizando el *kit* Versagene DNA Purification (Gentra Systems Inc., Minneapolis, MN, USA).
- 2) El mapeo genómico se llevó a cabo con un microarreglo Cytoscan HD (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), el cual contiene aproximadamente 2.7 millones de sondas con una distribución promedio de 1.1 kb en el genoma.
- 3) Todo el procesamiento, hibridación y cuantificación se realizó de acuerdo al protocolo provisto por la compañía manufacturadora.
- 4) Los datos fueron analizados con el programa Chromosome Analysis Suite 1.2.2 (Affymetrix Inc.), utilizando como referencia el conjunto de controles provistos en el mismo (n=270).

Los parámetros de análisis fueron: resolución de 50 kb y un mínimo de 390 marcadores. Se utilizó la función *Joining* para fusionar interrupciones menores a 200 kb. El mapeo se realizó con base en el ensamble Feb 2009 (GRCh 37/hg19) del genoma humano.

Anexo V

Secuenciación automática

Procedimiento:

- 1) Previamente se obtuvieron por PCR amplificados de las regiones codificantes del gen en estudio, para ello se requirió de la síntesis en una casa comercial de los oligonucleótidos necesarios cuya secuencia se adquirió de referencias previas. La reacción de PCR se llevó a cabo según el Anexo III.
- 2) La reacción de secuenciación se llevó a cabo empleando el reactivo BigDye 3.1 sequencing kit de AB.
- 3) Se emplearon 10 ng de producto de PCR purificado, 4 µl del reactivo Big Dye, 2 µl de buffer de secuenciación y se llevará a 20 µl de volumen total con agua grado PCR.
- 4) Las reacciones se corrieron en el termociclador 2700 de AB.
- 5) Una vez finalizado, las reacciones se purificaron empleando precipitación EDTA-ET-OH.
- 6) Las reacciones desecadas se resuspendieron en 15 µl de Hi-Di Formamida para ser sometidas a análisis en el secuenciador automático modelo 3130 de Applied Biosystems empleando un capilar de 50 cm y polímero POP-7.
- 7) La señal obtenida se analizó en el software Sequencing Analysis de Applied Biosystems.

Anexo VI

Consentimiento informado para toma de muestra de sangre

	FORMATO DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACION
CUBICULO No. <input type="text"/>	FECHA <input type="text"/>
CONSENTIMIENTO <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> AÑOS	
PROCEDIMIENTO PROPUESTO Y EXPLICACION DEL MISMO:	
Toma de muestra	<input type="checkbox"/> SANGUINEA <input type="checkbox"/> ORINA <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> OTRO (explique) <u>CARIOTIPO</u>
Beneficio: DIAGNOSTICO OPORTUNO DE PADECIMIENTO Y/O SEGUIMIENTO AL TRATAMIENTO	
Riesgos y complicaciones: NINGUNO, SI SE PRESENTA ALGUNA CONTAMOS CON PERSONAL CAPACITADO EN ATENDER LA URGENCIA. EL MATERIAL ES NUEVO, ESTERIL Y DESECHABLE.	
Yo, _____ años de edad. Reconozco que se me explico y entendi el procedimiento para realizar los exámenes, estoy enterado de los beneficios, sé de los riesgos y las probables complicaciones que se me pueden presentar. Consciente de que se busca un beneficio, doy mi consentimiento sin obligación y por decisión propia para que los exámenes se efectúen así mismo para realizar la atención de contingencias y urgencias derivadas del acto autorizado, con base al principio de libertad prescripta.	
CONSENTIMIENTO O SU REPRESENTANTE LEGAL	
TESTIGO FAMILIAR (Nombre y Firma) _____	
TESTIGO SUPERVISOR (Nombre y Firma) _____	
NOMBRE Y FIRMA DEL FLEBOTOMISTA _____	
Este consentimiento deberá ser usado para todo procedimiento de Toma de Muestras en el Laboratorio a realizarse en todo paciente sin excepción alguna. El responsable de recibido es quien vaya a realizar el mismo. Esta carta es renovable mientras no se concluya el procedimiento y no obligará al Químico, Médico o Médico a realizar o omitir un procedimiento cuando ello entrañe un riesgo hacia el paciente.	
REFERENCIA: LEY GENERAL DE SALUD cda. IV, Art. 80,81,82, y 83, NOM-166-SSA1-1995.	

Anexo VIII

Consentimiento informado para toma de muestra de DNA para evaluación diagnóstica



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRA DE ADN PARA EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA

México D.F., a ___ de _____ de 201

Por medio de la presente autorizamos al Dr. (a) _____ para realizar el siguiente procedimiento.

1.- Extracción de 3ml de sangre venosa del brazo de nuestro (a) hijo (a)

Nombre:

El propósito de la toma de la muestra es la obtención de ADN para realizar el estudio de

Nuestro consentimiento se condiciona a que se mantenga en forma confidencial los datos de nuestro hijo (a) y nuestra familia. Entendemos que el procedimiento de obtención de sangre puede causar molestias.

Nuestra firma en este documento manifiesta nuestra participación voluntaria, la responsabilidad de los investigadores respecto a nuestras personas y nuestros derechos, y que podemos terminar en cualquier momento la participación en este estudio sin que se perjudique la futura atención de nuestro hijo (a). Se nos entrega una copia del documento.

La información anterior fue explicada por _____
Para cualquier duda contactar a la Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso en el Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez Tel: 52 28 99 17 Ext. 2037 o a la Dra. Rebeca Gómez-Chico Velasco, Subdirectora de Pediatría Ambulatoria.

Nombre y Firma de la Madre o Tutora

Testigo

Nombre y Firma del Padre o Tutor

Testigo



INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN, AFILIADA A LA UNAM
Dr. Márquez 162, Col. Doctores, C.P. 06720, México, D. F.
Teléfono: 52 28 99 17 www.himfg.edu.mx

