



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

BÚSQUEDA DE LÍNEA CELULAR NORMAL EN DOS TEJIDOS DE PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER

TESIS

Para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

Miguel Angel Martínez Martínez

Asesora de Tesis:

Dra. Sara Frías Vázquez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

BÚSQUEDA DE LÍNEA CELULAR NORMAL EN DOS TEJIDOS DE PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER

TESIS

Para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

Miguel Angel Martínez Martínez

Asesora de Tesis:

Dra. Sara Frías Vázquez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Búsqueda de línea celular normal en dos tejidos de pacientes con Síndrome de Turner.

Que presenta el pasante: Miguel Angel Martínez Martínez

Con número de cuenta: 411072210 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Septiembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sara Frías Vázquez	
VOCAL	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
SECRETARIO	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er. SUPLENTE	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

Agradecimientos académicos

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría e Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Unidad Periférica en el Instituto Nacional de Pediatría.

Las muestras fueron colectadas del Servicio de Endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría, del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Perinatología y del Laboratorio Diagen (Hospital ABC)

Financiamiento: Recursos Fiscales para Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, proyecto INP 84/2010; proyecto FONCICYT 95419, Estudio integral del genoma proteoma y metaboloma en abortos y nacidos vivos con aneuploidías. Búsqueda de biomarcadores no invasivos y proyecto CONACYT-FOSISS 142040, Búsqueda de CNV's en individuos con trisomía 21 y monosomía X, del Instituto Nacional de Pediatría, en colaboración con el Instituto Nacional de Perinatología y el Instituto Nacional de Medicina Genómica; del cual se obtuvo financiamiento para reactivos y materiales, así como beca para MAMM.

A la Dra. Sara Frías Vázquez, y su equipo de trabajo del laboratorio de Citogenética del INP.

Agradecimientos a título personal.

Mi más sincero agradecimiento y respeto a mi asesora de tesis la Dra. Sara Frías Vázquez, por todos los gestos de confianza y cariño que ha tenido conmigo, por aceptarme en su laboratorio como estudiante, su paciencia para ayudarme, su accesibilidad y transmisión de conocimientos, por acompañarme en este trabajo y por sus muestras de afecto que traspasan el ámbito académico. Dra Sara: sin usted este trabajo no sería un hecho, gracias.

A la M en C Silvia Rosalía Sánchez Sandoval, quién fue guía del presente trabajo. Gracias por su paciencia y por su continua supervisión durante el desarrollo experimental de este trabajo, por su trato amable, cariño y confianza.

A la Dra. Bertha Molina, por su cariño y consejo a lo largo de la realización de este trabajo, por su accesibilidad y su ayuda en las lecturas de microscopio.

Al laboratorio de citogenética y sus trabajadores por hacerme el espacio para poder trabajar con ustedes, por su convivencia y trato, así como por la facilidad para el uso de todos los reactivos y equipos necesarios, por el microscopio de fluorescencia al cual tuve acceso en todo momento. Y por los consejos vertidos durante este trabajo.

A los proyectos FONCICYT 95419 y CONACYT-FOSISSS 142040 por el financiamiento otorgado durante la realización de este proyecto.

A los profesores que participaron de mi formación académica.

A mis papás, amigos y seres queridos quienes sin saberlo, han sido sostén firme de mi persona, que me han apoyado y ofrecido su cariño, que han forjado mi carácter y que han sido participes no sólo del presente trabajo, sino también de mi formación personal.

A la UNAM, mi casa de estudios.

ÍNDICE

Índice de abreviaturas	i
Índice de figuras	i
Índice de tablas	i
I Resumen	1
II Introducción	2
II.1 Aneuploidías.....	2
II.1.1 Causas de aneuploidías.....	3
II.2 Síndrome de Turner.....	8
II.3 Mosaicismo.....	12
III Objetivo	14
IV Hipótesis	14
V Justificación	14
VI Materiales y Métodos	15
VI.1 Diseño experimental.....	15
VI.2 Población de estudio.....	15
VI.3 Criterios de inclusión.....	15
VI.4 Criterios de exclusión.....	15
VI.5 Obtención de la muestra.....	16
VI.6 Cosecha directa de leucocitos de sangre periférica.....	16
VI.7 Procesamiento de tejido epitelial.....	17
VI.8 Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia.....	18
VI.9 Análisis al microscópico.....	19
VII Resultados	21
VIII Discusión	29
IX Conclusiones	33
X Perspectivas	33
XI Referencias	36
Anexo (hojas de consentimiento informado)	i

Índice de Abreviaturas

Síndrome de Turner	ST
Hibridación in situ con fluorescencia	FISH
4',6-diamino-2-fenilindol	DAPI
Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato	FITC
Meiosis I	MI
Meiosis II	MII
Mililitro	mL
Microlitro	μL
Grados centígrados	°C
Isodicéntrico	idic

Índice de Figuras

Imagen 1. No disyunción en MI. Modificado de Gersen S. & Keagle M. The principles of clinical cytogenetics (2013)

Imagen 2. Separación prematura de cromátidas en MI. Modificado de Gersen S. & Keagle M. The principles of clinical cytogenetics (2013)

Imagen 3. No disyunción en MII. Modificado de Gersen S. & Keagle M. The principles of clinical cytogenetics (2013)

Imagen 4. Esquema de trabajo para la búsqueda de línea celular normal en pacientes con ST mediante FISH

Imagen 5. Diagrama de la cosecha directa de leucocitos en sangre periférica.

Imagen 6. Diagrama del procesamiento de células de mucosa bucal

Imagen 7. Proceso de hibridación *in situ* con fluorescencia.

Imagen 8. Células representativas de sangre periférica y mucosa oral de los casos 11, 13, 18 y 37

Índice de Tablas

Tabla 1. Alteraciones citogenéticas en ST. (Kesler, S. 2007; Davenport, L. 2010)

Tabla 2. Manifestaciones clínicas en Síndrome de Turner (Ranke, M. 2001)

Tabla 3. FISH en pacientes con síndrome de Turner en sangre periférica y mucosa oral.

I RESUMEN

El Síndrome de Turner, es la única monosomía compatible con la vida, sin embargo no todas las pacientes presentan el cariotipo 45,X sino que pueden presentar cromosomas sexuales con alguna alteración estructural que comprometa genes importantes ya sea para la diferenciación sexual o bien para la generación del fenotipo Turner. Existe además un grupo de pacientes que presentan más de una línea celular, es decir tienen mosaicismo. Se ha especulado sobre la mayor probabilidad de sobrevida así como la atenuación del fenotipo en estas pacientes, pues la línea celular normal, compensaría sus características clínicas. El análisis con FISH presenta múltiples ventajas en la determinación de mosaicismo, es por ello que es la técnica ideal para ello. En el presente trabajo se estudiaron dos tejidos de pacientes con el fin de detectar una segunda línea celular en tejidos que provienen de diferentes capas germinales embrionarias, leucocitos que provienen del mesodermo y células de descamación de mucosa bucal que proviene del ectodermo; esta estrategia se ha utilizado con éxito para la detección de mosaicismo en dos tejidos.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la existencia de mosaicismo en pacientes diagnosticadas con síndrome de Turner en leucocitos de sangre periférica y células epiteliales de mucosa bucal, provenientes de diferente línea germinal embrionaria con el fin de determinar el momento en que se genera este fenómeno. Para ello se estudiaron 37 pacientes con el diagnóstico clínico, en 20 de ellas se contó con las muestras para ambos tejidos y en las 17 restantes sólo se contó con sangre periférica. El método para la detección del mosaicismo fue hibridación *in situ* con fluorescencia el cual tiene la gran ventaja del ahorro de tiempo de análisis y además evita tratamientos previos a las células (estimulación del crecimiento) ya que se pueden estudiar células en interfase. La señales de estudio correspondieron a centrómeros de los cromosomas 18, X e Y. Fue posible detectar estado de mosaico en 4 de las 20 pacientes con ambos tejidos lo que representa un 20%, y en 5 de las restantes 17 con sólo un tejido, lo que representa un 27% de pacientes con mosaico del total. Además de la detección del mosaicismo fue posible hallar una paciente con una línea celular con un cromosoma isodicéntrico X y dos pacientes con centrómero del cromosoma Y. Los resultados indican que el evento que generó el estado de mosaico ocurrió antes de la diferenciación de tejidos embrionarios. El presente trabajo forma parte de un proyecto que persigue la identificación de factores de riesgo para este tipo de alteraciones que en un futuro puedan ser detectables al inicio del embarazo.

Palabras clave

Síndrome de Turner, FISH, Aneuploidía, Mosaicismo.

II INTRODUCCIÓN

La función más importante del DNA es contener los genes, la información sobre todas las proteínas y moléculas de RNA que componen un organismo, dicho material genético se encuentra distribuido en los cromosomas en delicado equilibrio tanto en su contenido como en su localización.

El material genético es dinámico, cambia lenta pero continuamente, produciendo así la inmensa variedad de caracteres biológicos de los seres vivos. A diferencia de los cambios moleculares que ocurren a nivel de genes específicos dentro del genoma, las patologías cromosómicas, afectan grandes porciones del material genético observables en microscopio.

Las anomalías cromosómicas o cromosomopatías son interesantes desde varios puntos de vista biológicos; resultan útiles para profundizar en la función génica a escala genómica, revelan aspectos importantes de la meiosis y de la arquitectura cromosómica, constituyen herramientas muy útiles para la manipulación genómica experimental y permiten profundizar en los procesos evolutivos. De igual forma, su conocimiento es básico para la Genética Médica y para la evaluación de las enfermedades de origen cromosómico. (Alberts, B. 2008; Griffiths, A. 1999)

II.1 Aneuploidías

Existe un amplio rango de anormalidades cromosómicas de la especie humana que dan lugar a fetos no viables que generalmente se abortan durante el primer trimestre del embarazo, sin embargo dependiendo de la naturaleza de la anormalidad así como del cromosoma implicado, el embarazo puede continuar y llegar a término, lo que implica generalmente que un neonato presente ciertos defectos o malformaciones congénitas. (Griffiths, A. 1999)

Las cromosomopatías son observadas en un 0.5 a un 1% de los recién nacidos vivos; se encuentran en un 6% de los fallecimientos en la etapa perinatal y en un 39% de los abortos espontáneos. (Griffiths, A. 1999; Heim, 1995)

Las anomalías cromosómicas en el ser humano se clasifican en numéricas y estructurales. Las numéricas implican pérdida o ganancia de cromosomas (aneuploidías) o ploidías, que implican ganancia o pérdida de un set haploide completo (euploidias aberrantes). Por otra parte, las alteraciones cromosómicas estructurales se generan por la presencia de por lo menos dos rupturas de doble hebra del DNA, con una consecuente reasociación anómala. Ambos tipos se pueden presentar en mosaico (presencia de más de una línea celular con diferente número cromosómico).

Muchas aneuploidías que involucran a los autosomas son incompatibles con la supervivencia fetal, por su parte las aneuploidías de los cromosomas sexuales son compatibles con la vida. (Gersen, S. 201; Gersen, S. 2013; Hassold, T. 1989; Jacobs, P. 1992; Warburton, D. 1991)

La aneuploidía es la anomalía cromosómica más frecuente en los seres humanos y es la causa principal de algunos defectos de nacimiento y abortos espontáneos, ya que sólo un 5% de los embriones aneuploides llegan a nacer, estos individuos son los que presentan trisomías de los autosomas 13 (Síndrome de Patau), 18 (Síndrome de Edwards) y 21 (Síndrome de Down), así como monosomía y polisomías de los cromosomas sexuales. Desde la identificación de las primeras condiciones aneuploides en humanos hace casi medio siglo, aunque existe una gran cantidad de información sobre estas alteraciones, poco se ha encontrado sobre su origen y etiología. Se sabe que la mayoría de las aneuploidías derivan de errores en la meiosis materna I, que la edad materna es un factor de riesgo para la mayoría y que las alteraciones en la recombinación son un importante contribuyente a la no disyunción meiótica. (Hassold, T. 2007)

II.1.1 Causas de las aneuploidías.

Los errores en la meiosis (no disyunción) dan lugar a gametos que contienen un número anormal de cromosomas que tras la fecundación, producen concepciones aneuploides. La no disyunción se puede producir durante la meiosis I (MI) o la meiosis II (MII). En la MI, los cromosomas homólogos se aparean y forman bivalentes. La mala segregación de los cromosomas homólogos puede ocurrir de dos maneras. La primera consiste en la no disyunción de los cromosomas bivalentes cuando ambos homólogos van al mismo polo. La segunda consiste en la separación prematura de las cromátidas en donde un centrómero se separa prematuramente y se genera una distribución inadecuada de un par de cromátidas hermanas, lo que resulta en un desbalance de uno de los cromosomas homólogos. (Wang, J. 2005)

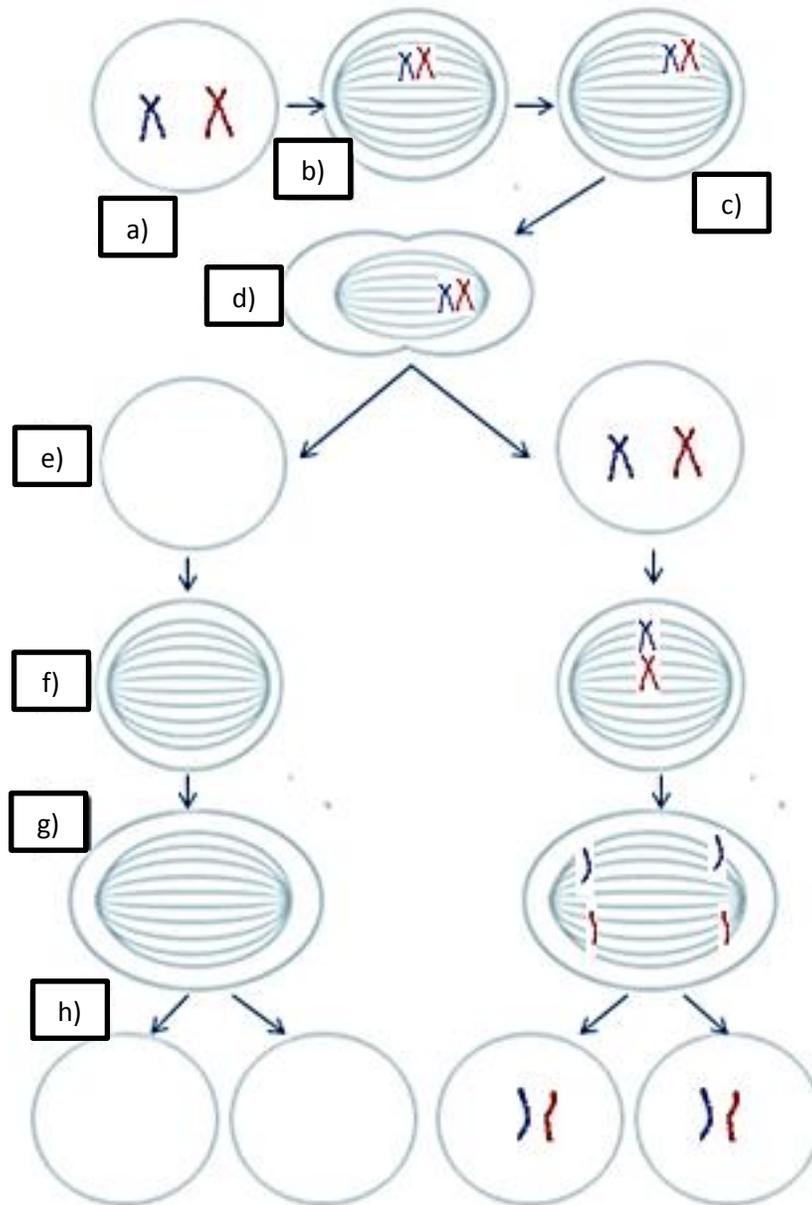


Imagen 1. No disyunción en MI. Modificado de Gersen S. & Keagle M. The principles of clinical cytogenetics (2013). **(a)** Profase I. **(b)** Metafase I. **(c)** Anafase I. **(d)** Telofase I, con ambos cromosomas homólogos segregados juntos. **(e)** Productos de la meiosis I. **(f)** Metafase II. **(g)** Anafase II. **(h)** Productos meióticos: dos gametos sin copia de cromosoma y dos con doble copia.

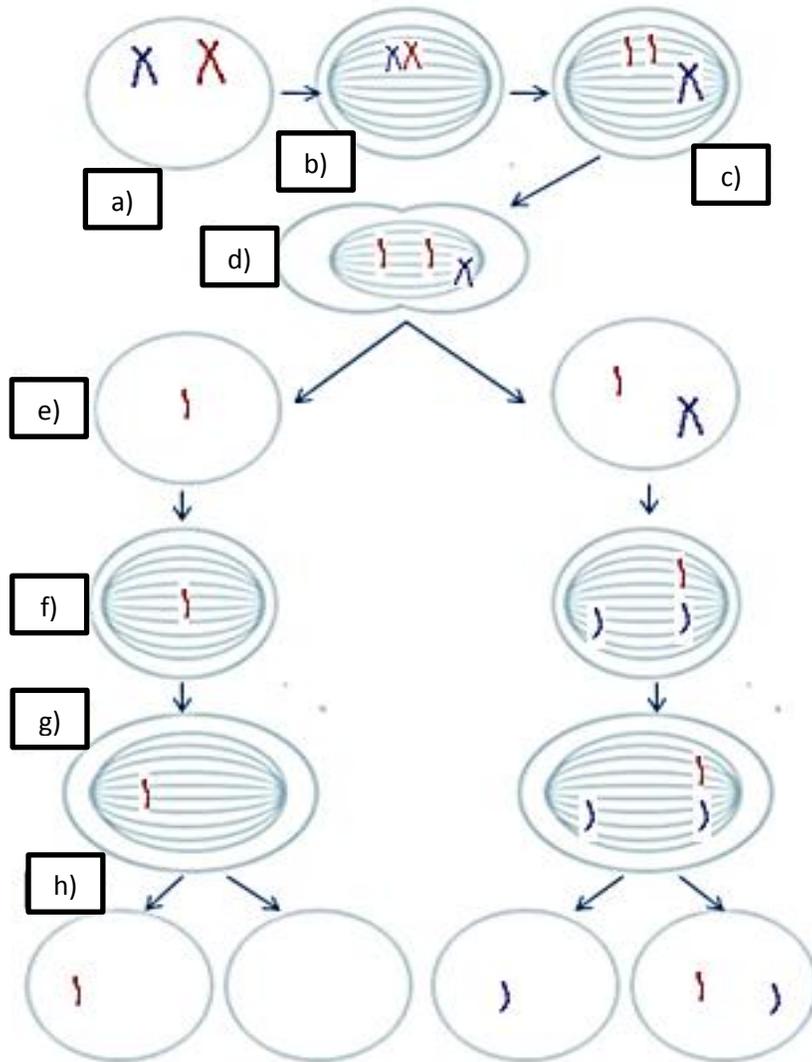


Imagen 2. Separación prematura de cromátidas en MI. Modificado de Gersen S. & Keagle M. The principles of clinical cytogenetics (2013). (a) Profase I. (b) Metafase I (c) Anafase I, con separación prematura del centrómero de un cromosoma. (d) Telofase I, con una cromátida separada prematuramente segregada con su cromosoma homólogo. (e) Productos de meiosis I. (f) Metafase II. (g) Anafase II. (h) Productos meióticos: dos gametos con un cromosoma normal completo, uno sin cromosoma y otro más con dos copias.

En MII, las cromátidas hermanas se separan y migran hacia polos opuestos. La segregación deficiente se produce cuando ambas cromátidas van hacia el mismo polo celular.

Factores como errores en la recombinación, los complejos proteicos de los centrómeros y la edad materna avanzada pueden influir en la mala segregación de los cromosomas. (Gersen, S. 2012)

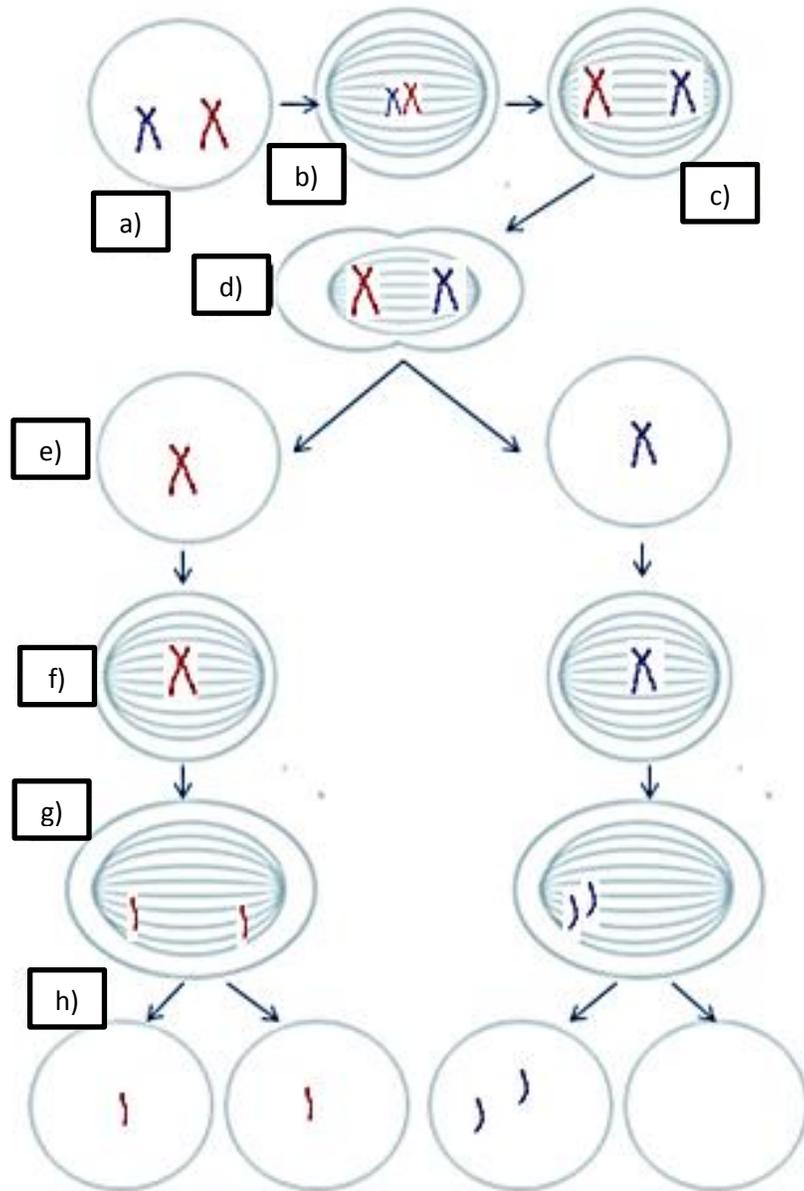


Imagen 3. No disyunción en MII. Modificado de Gersen S. & Keagle M. The principles of clinical cytogenetics (2013). (a) Profase I. (b) Metafase I. (c) Anafase I. (d) Telofase I. (e) Productos de meiosis I. (f) Metafase II. (g) Anafase II, con ambas cromátidas segregadas juntas. (h) Productos meióticos: dos gametos con un cromosoma normal, otro con dos copias y uno más sin cromosoma.

Desde la década de 1980, se ha investigado sobre el origen del cromosoma extra en las aneuploidías y la ausencia de un cromosoma sexual en el caso del ST, sin embargo las investigaciones se centraron en las trisomías debido a que en ellas es donde existe una mayor compatibilidad con la vida. Fue entonces que se obtuvieron tres aspectos importantes sobre la no disyunción en humanos, en

primer lugar, independientemente del cromosoma implicado, la mayoría de las trisomías ocurren durante la ovogénesis, en segundo, para la mayoría de los cromosomas es más común que se trate de Meiosis materna I que II y finalmente existe una correlación del número de casos con la edad materna avanzada. (Hassold, T. 2001; Hassold. T. 2007)

Algunas aneuploidías parecen tener una causa predominante, mientras que otras no, por ejemplo en trisomía 21 predominan los errores en MI materna, en trisomía 18 es más común MII, y en la condición 47, XXY el origen puede ser tanto materno como paterno (Hassold, T. 2007). Por su parte, en el ST, el cromosoma X presente es de origen materno en un 80% de los casos, por lo que la ausencia del segundo cromosoma sexual perdido se debe a un error durante la espermatogénesis o bien al momento de la fertilización. (Czpunkowski, B. 2001)

Conforme han pasado los años, la información respecto a las trisomías (incluidas las menos comunes), se ha ampliado permitiendo diferenciar, tres tipos de no disyunción, uno que afecta a todos los cromosomas, otro a un grupo de cromosomas y por último el que afecta a uno solo. Por ejemplo, los errores en MI materna, parecen ser un ingrediente importante en todas las trisomías a excepción del caso 47, XXY, esto parece estar relacionado con el hecho de que en la ovogénesis, la primera división meiótica inicia en el ovario fetal y se completa hasta el momento de la ovulación (rango de gran amplitud, donde la edad materna juega un papel fundamental). Por otro lado, los patrones de no disyunción son similares para los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22, lo que sugiere que los mecanismos de no disyunción se comparten en los cromosomas acrocéntricos. Además algunos patrones de no disyunción parecen ser específicos para ciertos cromosomas, especialmente los que involucran al cromosoma 16 y al 18, en donde predominan errores en MI y MII materna respectivamente. (Bugge, M. 2004; Hassold, T. 2007; Hall, H., Chan, E. 2007; Hall, H. Surti, U. 2007)

Cabe destacar además, que la recombinación durante la meiosis I, juega un papel importante en la generación de aneuploidías. Muy a menudo, el efecto es atribuible a homólogos que no recombinan, lo cual se espera que suceda al azar en la metafase 1 y se espera una probabilidad del 50% de no disyunción. Sin embargo, los mecanismos de no disyunción suelen ser variables y pueden implicar falta de recombinación de los cromosomas o localizaciones inusuales de quiasmas (ya sea muy cerca o muy lejos del centrómero), hay además otros ajenos a la recombinación pero atribuibles a anomalías en otros procesos meióticos como pérdida de la cohesión de las cromátidas hermanas y defectos en el huso. Por ejemplo en la trisomía 21, los intercambios teloméricos son de especial importancia en madres jóvenes, mientras que los pericentroméricos lo son en

madres de edad avanzada; los errores de ausencia de recombinación aparecen en ambos grupos. (Hassold, T. 2007; Lamb, N. 2005; Sherman, S. 2006)

Desde la identificación de las primeras aneuploidías en humanos, las investigaciones se han enfocado a la búsqueda de factores predisponentes. Esto ha llevado a ensayos de una amplia variedad de posibles asociaciones, incluidas las exposiciones ocupacionales (por ejemplo, los aplicadores de pesticidas), los tratamientos médicos (por ejemplo, quimioterapia o radioterapia), fármacos relacionados con la reproducción, como anticonceptivos orales, exposición por hábitos personales (por ejemplo, cigarrillos), exposiciones ambientales diversas (por ejemplo, pesticidas, exposición laboral a tóxicos) y factores intrínsecos (por ejemplo, los polimorfismos en genes de la vía de los folatos) (Warburton, D. 2004). Sin embargo, estos esfuerzos no han tenido el éxito esperado, y la edad materna, la recombinación aberrante y la aparición de una trisomía anterior siguen siendo los únicos tres factores indiscutiblemente ligados a aneuploidía humana. (Hassold, T. 2007)

II. 2 Síndrome de Turner

En 1938, el Dr. Henry Turner describió, tras estudiar a siete pacientes, el síndrome que lleva su nombre, caracterizado por talla baja, infantilismo sexual (amenorrea Primaria), cuello alado (pterigium colli) y cubitus valgus. Más tarde en 1959, Ford y col. así como Fraccaro y col. describieron por primera vez el cariotipo 45, X en estas pacientes (Salamanca, F.1990).

El síndrome de Turner (ST), se define como la combinación de una serie de características físicas y la ausencia total o parcial de un cromosoma X, siendo la única monosomía compatible con la vida (Saenger, P. 2001)

El ST es una de las anomalías cromosómicas más frecuentes, afecta aproximadamente al 3% de todos los fetos femeninos y tiene una incidencia aproximada de 1 por cada 2500 mujeres recién nacidas, se estima que sólo el 1% de los fetos 45, X sobreviven hasta llegar a término ya que la mayoría terminan en abortos espontáneos. Desde el punto de vista citogenético, las alteraciones presentes en el cariotipo de linfocitos de sangre periférica son variables. En aproximadamente el 50% de los casos se muestra una monosomía o ausencia completa del cromosoma X (45, X), siendo en la mayoría de las veces el cromosoma perdido de origen paterno. En un 10-20 % se encuentran alteraciones estructurales en un cromosoma X (monosomía parcial), como deleciones, isocromosomas o cromosomas en anillo, pudiéndose encontrar también derivados del cromosoma Y. El 30-40 % restante son pacientes con la presencia de dos o más líneas celulares derivadas de un mismo cigoto (mosaicismo) en

donde en al menos una de ellas presenta alteraciones numéricas o estructurales del cromosoma X, el mosaicismo puede ser generalizado o confinado a un tejido, por lo que su detección se dificulta a menos que se estudie dirigidamente el tejido en cuestión (Ranke, M. 2001; Elsheik, M.2002; Davenport, M. 2010). Los pacientes con ST que presentan una línea celular Y, tienen riesgo para desarrollar neoplasias gonadales: disgerminoma, seminoma, teratoma o gonadoblastoma, por lo que cualquier cromosoma no identificado por la citogenética convencional o “marcador”, tiene que ser identificado para poder descartar que provenga del cromosoma Y (Lopez, M. 1998; Kesler, S. 2007).

Tabla 1. Alteraciones citogenéticas en ST. (Kesler, S. 2007; Davenport, L. 2010; Jorde L. 2005)

Alteraciones citogenéticas encontradas en pacientes con Síndrome de Turner*		
Tipo de Alteración cromosómica	Cariotipo	%
Monosomía completa	45,X	~50
Alteraciones estructurales	46,X,i(Xq) 46,X,i(Yp) 46,X,r(X) 46,X,del(Xq) o (Xp) 46,X,del (Yp)	10-20
Mosaicismos	45,X/46,XX 45,X/47,XXX 45,X/46,XY o der(Y) 45,X/47,XXX /46,XX 45,X/46,X,i(Xq) 45,X/46,X,i(Xq)/47,X,i(Xq),i(Xq) 46,XX/46,X,i(Xq) y otras	30-40

En el ser humano, el segundo cromosoma sexual expresa una limitada cantidad de genes, en el caso del cromosoma Y esto se debe a que su densidad génica es de apenas unas decenas de genes y en el caso del X, porque durante etapas tempranas del desarrollo embrionario uno de ellos se inactiva, con fines de compensación de la dosis génica de la especie. Esta inactivación sigue los postulados de Lyon, los cuales establecen que: 1) la inactivación ocurre en la

etapa de blastocisto, 2) la inactivación se realiza al azar sobre uno de los dos cromosomas X generando un corpúsculo de Barr y 3) una vez que una célula ha inactivado un cromosoma X, todas las células hijas heredarán la marca epigenética y entonces inactivarán el mismo cromosoma (Lyon M. 1961). Ante esto, la expresión fenotípica del ST podría generar controversia, ya que si uno de los dos cromosomas X se inactiva en una mujer normal, ¿por qué la pérdida de un segundo cromosoma sexual puede condicionar un fenotipo anormal? Varias pueden ser las causas: la haploinsuficiencia de genes debido a que alrededor del 15% de los genes en el cromosoma X escapan a su inactivación (Peeters, S. 2014), otra posible causa de los defectos encontrados en ST, es que durante unos pocos días antes de la inactivación, ambos cromosomas X están activos, por lo que es de suponer que esta actividad génica es indispensable para un desarrollo sexual fetal normal.

El amplio espectro de signos somáticos presente en el ST indica que diferentes genes localizados en el cromosoma X pueden ser responsables del fenotipo completo. La talla baja se ha asociado con haploinsuficiencia de la región pseudoautosómica de los cromosomas X o Y (región distal a la región Xp22.2), en esta región está presente el gen SHOX (short stature homeobox) (X.22.33) y su homólogo en el cromosoma Y SHOXY localizado en Yp11.3 responsable del crecimiento así como de otros hallazgos esqueléticos como la deformidad de Madelung, este gen codifica para un factor de transcripción con homeodominio, se expresa en la vida fetal en el desarrollo del tejido óseo de húmero distal, radio, ulna y muñeca así como en huesos de pierna (Clement-Jones, M. 2000); posiblemente otros genes localizados en el brazo corto del cromosoma X contribuyan a la variabilidad observada en el retraso del crecimiento. Aunque no existen hallazgos genéticos que expliquen el daño visceral y de tejidos blandos, algunos datos fenotípicos como el linfedema, el pterigium colli y las anomalías cardíacas se han asociado con la haploinsuficiencia linfática relacionada con genes que escapan a la inactivación del X próximos a la región Xp11.3. Hay varios genes relacionados con la disgenesia gonadal como el DFFRX (Drosophilla fat facets related X) en la región Xp11.4, ZFX (zinc finger X) en la región distal Xp, RPS4X (que codifica una isoforma de la proteína ribosomal S4) y DIAPH2 (gen necesario para una adecuada función ovárica), estos dos últimos de Xq (Ranke, M. 2001).

El espectro clínico en el ST es muy variable y aunque ningún hallazgo aislado es específico, en su conjunto confieren un fenotipo característico que típicamente es suficiente para el diagnóstico. El retraso en el crecimiento es el aspecto más constante presente en más del 90% de los casos. El rasgo de la talla baja así como otros podrían estar relacionados con la fórmula cromosómica aunque no se

Otro aspecto que cabe destacar es el hecho de que las pacientes con ST, presentan mayor riesgo de padecer ciertas enfermedades en comparación con la población general. Entre ellas se encuentra el hipotiroidismo, diabetes, osteoporosis, malformaciones congénitas en rostro, cuello, oídos, tórax, afecciones neurovasculares, cirrosis y cáncer. En algunos casos la predisposición a enfermedades se debe a un defecto congénito, como en el caso de las afecciones cardíacas, pero en otros como el caso de la Diabetes tipo 2, la enfermedad es compleja y adquirida, en este caso debido al tratamiento con hormona del crecimiento, por presentar talla baja, se genera resistencia a la insulina durante el tratamiento, además este consumo de hormona de crecimiento, genera alteraciones en el estatus de la tiroides (Grayholt, C. 2005; Bondy, C. 2007; Bondy, C. 2013).

El otro aspecto clínico relevante por presentarse en la mayoría de las pacientes es el hipogonadismo ya que a pesar de que un 20% de las pacientes presentan signos de pubertad espontánea, sólo 2-5% tendrán menstruaciones y en ellas es importante comprobar la existencia de una función ovulatoria normal (medición de FSH, LH y progesterona), ya que es frecuente el patrón anovulatorio con riesgo de hiperplasia endometrial. La gran mayoría son infértiles describiéndose la posibilidad de embarazo en un bajo porcentaje (Saenger, P. 2001; Rosenfield, R. 1994; Fernández, A. 1994).

La mayoría de los casos detectados prenatalmente, son detectados accidentalmente en el curso de un estudio citogenético realizado por otro motivo, el más frecuente por edad materna avanzada, la cual no se asocia con un mayor riesgo de ST. El asesoramiento genético debe ser realizado de manera multidisciplinaria y un diagnóstico prenatal debe ser confirmado posnatalmente. Es importante enfatizar que las mujeres con ST, tienen posibilidades de vivir una vida sana y socialmente productiva (Saenger, P. 2001; Ranke, R. 1994; Rosenfield, R. 1994).

II.3 Mosaicismo

Es una anomalía en la cual coexisten dos o más líneas celulares (con distinta composición cromosómica) en un mismo organismo, cada línea celular debe aparecer en una proporción considerable, la cual varía según el método de análisis y la cantidad de células o metafases consideradas. Estas líneas celulares presentes en un mosaico pueden presentar distintos complementos, de modo que no siempre se encuentra una línea celular normal. Los mosaicos pueden presentarse desde contener células normales, con líneas aneuploides o euploides aberrantes, o solo líneas celulares anormales con aneuploidías o euploidías

aberrantes e incluso con rearrreglos estructurales (Griffiths, A. 1999; Klung, W. 1999; Solari, A. 1999).

El Síndrome de Turner, puede presentarse en forma de mosaico, asociado con una línea celular normal masculina o una línea femenina o con células asociadas a Klinefelter o triple X e incluso con líneas celulares portadoras de isocromosoma de brazo largo de cromosoma X (ver Tabla 1). Se ha postulado que los individuos con mosaicismo sobreviven más que aquellos que presentan la aneuploidía completa, pero sigue siendo una anomalía que amenaza la vida (Cummings, M. 1995).

Los mosaicos se originan sólo después de la fecundación y en cualquier etapa del desarrollo embrionario, por una inadecuada segregación de los cromosomas durante la mitosis. Los eventos responsables son no disyunción y retraso de una cromátida durante la anafase de la mitosis. El mosaicismo también puede ser considerado como resultado del impacto de virus y químicos sobre la división de las células durante la vida, esto se puede evidenciar en los análisis citogenéticos de muestras oncológicas en las cuales el mosaicismo es un factor que influye sobre el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del tratamiento, según el tipo de anomalía existente, su porcentaje de presentación y el tipo de tejido donde se detecte.

El nivel de mosaicismo depende de la etapa en que ocurre el error en la división durante el desarrollo del organismo. Si la división alterada ocurre en la primera división celular después de la fecundación, es posible que todos los tejidos del cuerpo sean afectados y se encuentren dos líneas celulares distribuidas en un 50% cada una. Por el contrario si la falla ocurre después que han sido establecidos los tres tipos celulares (Ectodermo, Mesodermo y Endodermo) las células anormales pueden localizarse en un tipo celular específico, si esto ocurre aún más tarde, las anomalías pueden aparecer en solamente un órgano del cuerpo, en algunos casos, las líneas celulares anormales pueden ser confinadas a membranas extraembrionarias (placenta, corion y amnios). La secuela clínica del mosaico, depende de la naturaleza de la anomalía, la proporción y localización de las células anormales en el cuerpo. Si se sospecha que un paciente presenta mosaicismo y este no se detecta en una muestra inicial de tejido, es necesario examinar tejidos derivados de los tres diferentes tipos celulares desarrollados durante el periodo embrionario, en estos casos los más comúnmente estudiados son sangre periférica (de origen mesodérmico) y mucosa bucal (de origen ectodérmico) (Barch, M. 1997).

III Objetivo

Determinar mediante hibridación *in situ* con fluorescencia, la existencia de mosaicismo (coexistencia de dos o más líneas celulares en un mismo individuo) en pacientes con síndrome de Turner en leucocitos de sangre periférica y células epiteliales de mucosa bucal, con previo cariotipo 45,X.

IV Hipótesis

Si se estudian dos tejidos de origen embrionario diferente y un número alto de células, entonces se puede encontrar mosaicismo en pacientes con ST en las que no se había detectado una segunda línea cromosómicamente diferente.

V Justificación.

En las pacientes con ST es posible encontrar diversas fórmulas cromosómicas en las que estén implicadas alteraciones de los cromosomas sexuales o bien estados de mosaicismo, además de la monosomía completa. Por su parte el mosaicismo puede ocurrir en distintas etapas del desarrollo embrionario, por lo que se deben estudiar tejidos originados en diferente capa embrionaria, sangre periférica de origen mesodérmico y mucosa bucal de origen ectodérmico, para tener una visión amplia de este fenómeno. La hibridación *in situ* con fluorescencia aplicada en células en interfase, nos permite un análisis de un número elevado de células en un tiempo más corto que el empleado por otros métodos, además no se generan sesgos por selección celular, como ocurre con la citogenética clásica, por lo que resulta un método idóneo para la búsqueda de mosaicismo. El presente trabajo se realizó en pacientes que cuentan con cariotipo previamente determinado como 45,X, para determinar posible mosaicismo de baja frecuencia.

VI Materiales y métodos

VI.1 Diseño experimental

El presente trabajo está enfocado a la búsqueda de mosaicismos en pacientes con ST en dos tejidos, sangre periférica y mucosa bucal.

Forma parte del proyecto FONCICYT 95419, Estudio integral del genoma proteoma y metaboloma en abortos y nacidos vivos con aneuploidías. Búsqueda de biomarcadores no invasivos y proyecto CONACYT-FOSISSS 142040, Búsqueda de CNVs en individuos con trisomía 21 y monosomía X.

VI.2 Población de estudio

Treinta y siete pacientes diagnosticadas con ST que acudieron a consulta al Instituto Nacional de Pediatría o bien al Instituto Nacional de perinatología, Laboratorio Diagen, Hospital ABC y que canalizaron sus muestras al INP durante un período de 1 año.

VI.3 Criterios de Inclusión

Treinta y siete pacientes con diagnóstico clínico de ST, que cuenten con estudio completo de manifestaciones clínicas, que los padres acepten y firmen la carta de consentimiento informado con que cuenta el proyecto. Que cuenten además con estudio de cariotipo, y que este se reporta como 45,X. Pacientes donde se quiera ampliar el estudio de mosaicismos.

VI.4 Criterios de exclusión

Aquellos casos en que no se confirme el ST a nivel citogenético. De manera temporal serán excluidas pacientes que hayan sido transfundidas en los últimos tres meses. Aquellas pacientes con mosaicismos claros determinados por bandeos cromosómicos, salvo en algunas excepciones, donde se halló otra línea celular misma que se desea sea estudiada con más amplitud.

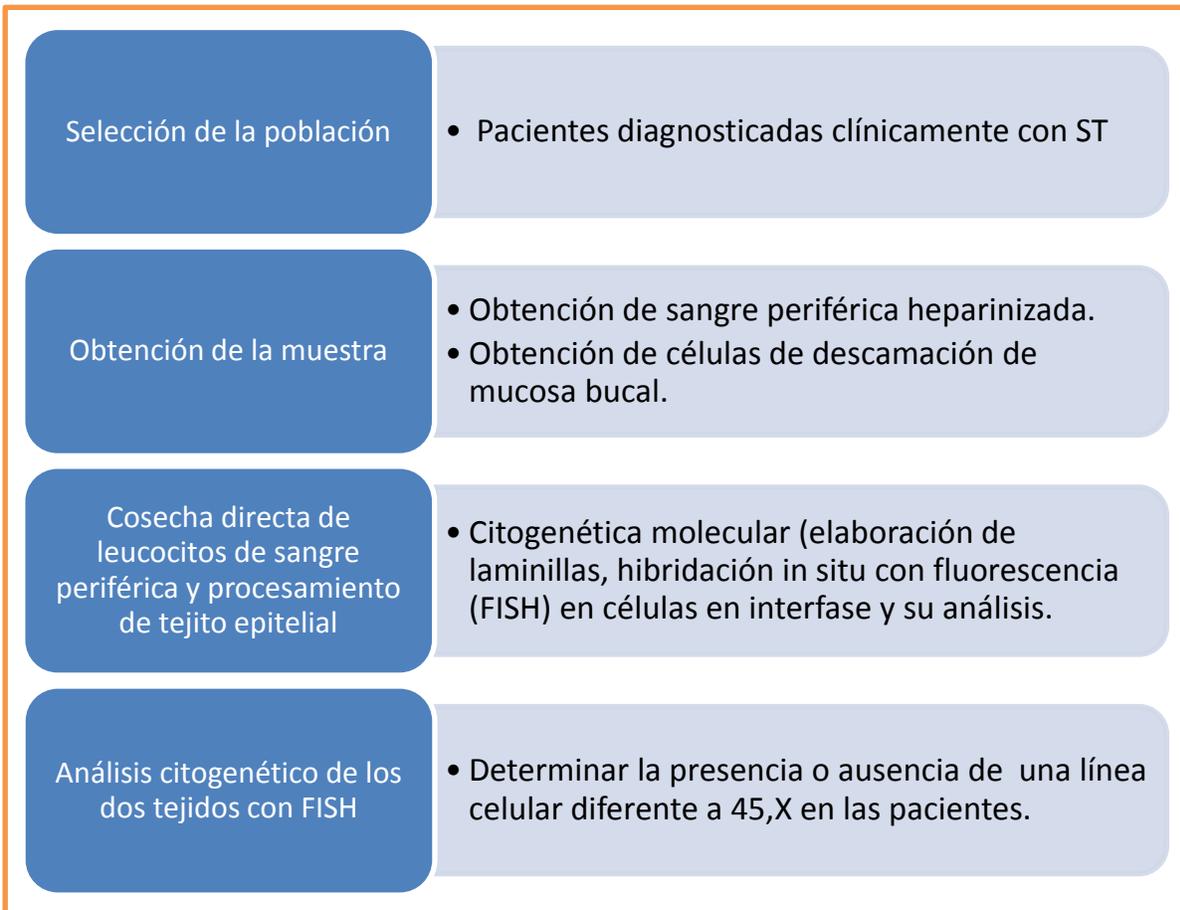


Imagen 4. Esquema de trabajo para la búsqueda de línea celular normal en pacientes con ST mediante FISH

VI.5 Obtención de la muestra

Las muestras de sangre fueron obtenidas mediante venopunción con sistema de extracción al vacío y anticoaguladas con heparina, el volumen fue variable (de 3 a 10 mL). Dichas muestras se emplearon para obtener células en interfase y realizar una hibridación *in situ* con fluorescencia o FISH.

Las muestras de tejido epitelial de mucosa bucal, fueron obtenidas por raspado de la cavidad oral, se mantuvieron en congelación con antibiótico al 2% hasta su procesamiento para la elaboración de laminillas de FISH.

VI.6 Cosecha directa de leucocitos de sangre periférica

La cosecha directa tiene por finalidad obtener células en interfase, para ello se toman de 0.7 a 1 mL de sangre periférica heparinizada y se coloca en un tubo falcon previamente incubado a 37°C con 4-7mL de solución hipotónica KCl 0.075M

para obtener un volumen final de 5 a 8 mL, posteriormente se incubaba a 37°C por 20-30 minutos. A continuación la muestra se prefija con solución fijadora Carnoy (ácido acético /metanol 1:3) agregando 1mL de ésta al tubo, se resuspende y centrifuga por 10 minutos a 1500 rpm. Se retira el sobrenadante y se resuspende el botón obtenido y se procede a realizar la fijación con 5-6 mL de solución fijadora y se centrifuga en las mismas condiciones, posteriormente se realizan dos lavados empleando solución fijadora hasta obtener un precipitado blanco homogéneo. La elaboración de laminillas, dicho botón se resuspende en volúmenes variables de solución fijadora (de hasta 2 mL), se colocan de dos a tres gotas de la muestra sobre una laminilla, posteriormente se coloca una gota de solución fijadora (también se puede poner previo a la muestra). Finalmente la laminilla se coloca en un baño seco. Se preparan como mínimo, 3 laminillas por paciente.



Imagen 5. Diagrama de la cosecha directa de leucocitos en sangre periférica

VI.7 Procesamiento de tejido epitelial

En este procedimiento se obtienen núcleos de mucosa bucal en interfase, de estas células el citoplasma no sólo es muy grande sino que además es muy resistente por poseer queratina por lo que el tratamiento enzimático es necesario, así como su resguardo con antibiótico, ya que por su origen se obtienen con gran cantidad de bacterias. Después de descongelar la muestra, esta se centrifuga por 10 minutos a 1500 rpm, se retira el sobrenadante, se resuspende y se agregan 3mL de lisozima 2mg/mL y se deja incubando por 20 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifuga en las mismas condiciones y se retira el sobrenadante, se resuspende y agregan 2mL de Tripsina/EDTA 0.05% y se deja incubando por 20 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifuga, retira el sobrenadante y resuspende, se agregan de 5 a 7 mL de solución hipotónica de citrato de sodio 0.8% y se deja incubando 20 minutos a 37°C. Posteriormente se centrifuga y sin retirar el sobrenadante se agrega 1mL de solución fijadora de Carnoy (prefijación), se centrifuga, se retira el sobrenadante y se resuspende, posteriormente se fija y

se realizan 2 lavados más para obtener un botón blanco homogéneo. Dicho botón se resuspende en volúmenes variables de solución fijadora (de hasta 2 mL), se colocan de dos a tres gotas de la muestra sobre una laminilla, posteriormente se coloca una gota de solución fijadora (también se puede poner previo a la muestra). Finalmente la laminilla se coloca en un baño seco. Se preparan como mínimo, 3 laminillas por paciente.

La adición de lisozima, pepsina y solución hipotónica debe realizarse en campana de flujo laminar.

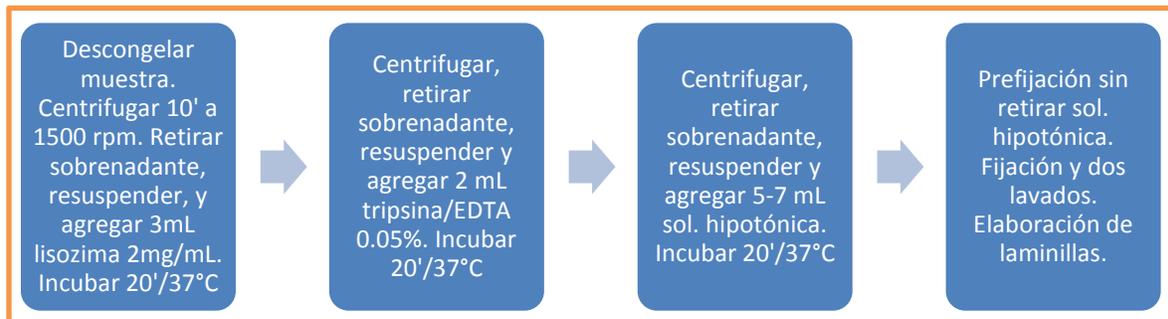


Imagen 6. Diagrama del procesamiento de células de mucosa bucal

VI.8 Hibridación *in situ* con fluorescencia

Para realizar el FISH se emplean los reactivos provistos por CEP® Chromosome Enumeration DNA FISH Kreatech probes y la metodología se divide en 5 etapas:

1. Selección de laminillas.

Se selecciona la laminilla para ser procesada con la técnica de hibridación FISH en interfase función de la calidad y cantidad de células observadas en contraste en objetivo 10X, estas deben observarse oscuras de un tono gris oscuro (no refringentes), deben estar esparcidas homogéneamente en el área de goteo de modo que se pueda delimitar como zona de hibridación.

2. Pre tratamiento.

La laminilla se coloca por 30 minutos en una solución salina citratos 2X (2XSSC) para su maduración y posteriormente se deshidrata en alcohol a concentraciones ascendentes (70, 80 y 100%) por 3 minutos en cada concentración. En caso de ser necesario eliminar proteínas y restos citoplasmáticos (en células epiteliales es necesario y en cosecha directa generalmente no lo es), se emplea un tratamiento enzimático con pepsina en solución HCl 0.01N, posteriormente, las laminillas se

lavan con PBS 1 % (solución buffer fosfato) y se fijan con formaldehído, se vuelven a lavar en PBS y vuelven a pasar por el tren de alcoholes y se dejan secar, de este modo se asegura que la sonda llegue a su DNA complementario. También es posible que se emplee en células de sangre periférica el procedimiento para retirar citoplasma al inicio de su procesamiento, el cual consiste en colocar la laminilla por 10 minutos en una solución de ácido acético/metanol (70-30%) y posteriormente 2 minutos en solución 2XSSC y una serie de alcoholes (70, 80 y 100%) que se utiliza para retirar el citoplasma, finalmente las laminillas se sumergen en la solución citratada por 30 minutos y la serie de alcoholes.

3. Desnaturalización e hibridación.

Una vez seca la laminilla, en la zona más rica en células, demarcada al microscopio de contraste de fases, se colocan 7 a 10 μ L de sonda lista para usarse, del kit de aneuploidías, que contiene sondas centroméricas para el cromosoma 18, X y Y. Se realiza una codesnaturalización a 73°C por 1 minuto 30 segundos (el tiempo puede variar dependiendo del tipo celular) y la hibridación del DNA con la sonda se realiza a 37°C durante 24 horas en condiciones de oscuridad y alta humedad.

4. Post hibridación

Dado que en la hibridación ocurre también hibridación inespecífica, es necesario eliminarla mediante dos lavados, el primero es a 73°C con la solución 0.4XSSC/0.3% NP-40 por 2 minutos y el segundo con 2XSSC/0.1% NP-40 por 2 minutos a temperatura ambiente. La muestra no debe dejarse secar para realizar el siguiente paso.

5. Tinción de Contraste

Se adicionan de 8 a 10 μ L de DAPI 1:20 en VECTASHIELD® para visualizar la hibridación y se procede al análisis en microscopio.

VI.9 Análisis al microscópico

El análisis se realizó en un microscopio Zeiss de epifluorescencia con los filtros adecuados de acuerdo al marcaje de las sondas utilizadas, espectros rojo, verde y aqua. . Los filtros empleados en el análisis fueron para detección de DAPI, con el cual se tiñe el DNA (y se delimita el área del núcleo), FITC, para la detección de la señal verde (centrómero del cromosoma X), Rodamina, para la detección de la señal roja (centrómero del cromosoma Y) y Cyane para la detección de la señal azul (centrómero del cromosoma 18).

Se consideran para su análisis, las células y núcleos que presentan bordes definidos y con su material íntegro, que no se encuentran traslapadas, que no se encuentran en los límites del área de hibridación, que cuentan con las señales bien definidas y con una hibridación completa que incluye no sólo al cromosoma implicado en la aneuploidía, sino también la señal control, con señales propiamente separadas entre sí, de modo que se distinga el dominio de cada señal. El porcentaje de hibridación mínimo considerado como óptimo es del 95% (eficiencia de hibridación). El análisis se realiza óptimamente en 1000 núcleos, con dos lecturas independientes que bien pueden ser en la misma laminilla o no, realizadas en tiempos diferentes de 500 núcleos cada una, lo anterior con la finalidad de detectar un mosaicismo cromosómico, aun cuando éste sea bajo.

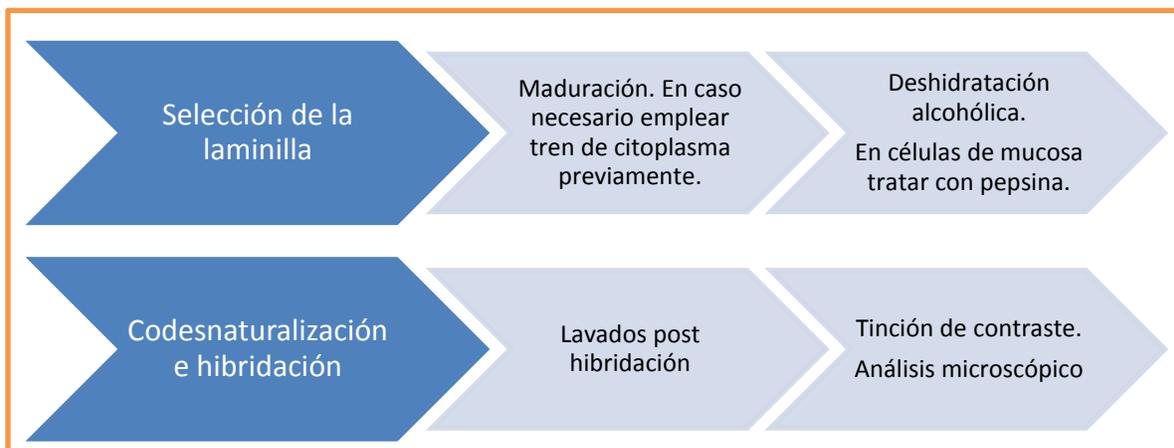


Imagen 7. Proceso de hibridación *in situ* con fluorescencia.

VII Resultados

A continuación se presentan los resultados encontrados en las pacientes estudiadas, así como imágenes representativas de algunas células analizadas.

El porcentaje promedio de hibridación fue del 99%, esto es, de cada cien células contadas, una de ellas no hibridó ya sea con la señal del centrómero X, 18 o ambas. Las lecturas fueron realizadas en dos tiempos. En el número de caso se especifica el código propio del laboratorio de citogenética del INP.

Para que en una paciente se considere que una línea celular consista en un estado de mosaicismo esta debe estar presente en al menos el 5% de las células analizadas (Vorsanova, S. 2005). Es importante aclarar que el mosaicismo en este trabajo, está dado a partir de la línea aneuploide pues representa el hallazgo esperado (al ser pacientes diagnosticadas con ST), otras líneas (como la 46,XX) pueden aparecer o no en estado de mosaico.

Tabla 3. FISH EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER EN SANGRE PERIFÉRICA Y MUCOSA ORAL

CASO	FISH EN SANGRE PERIFÉRICA	FISH EN MUCOSA BUCAL						
		%	%					
NÚMERO	HALLAZGO	TOTAL	MOSAICO	RESULTADO	TOTAL	MOSAICO	RESULTADO	
1 NV10	Aneuploide 45,X	1001	0	No	690	0	No	
	Disómica 46,XX	0			1			Mosaico
2 NV19	Aneuploide 45,X	1429	0	No	326	0	No	
	Disómica 46,XX	14			2			Mosaico
3 NV28	Aneuploides 45,X	1509	0	No	316	0	No	
	Disómicas 46,XX	0			0			Mosaico
	18(1),X(1)	0			2			

4 NV29	Aneuploides 45,X	1220	0	No Mosaico	234	0	No Mosaico
	Disómicas 46,XX	0			0		
	18(1),X(1)	0			2		
5 NV31	Aneuploides 45,X	1000	0	No Mosaico	260	0	No Mosaico
	Disómicas 46,XX	0			0		
6 NV34	Aneuploides 45,X	999	0	No Mosaico	652	0	No Mosaico
	Disómicas 46,XX	1			1		
7 NV36	Aneuploides 45,X	809	39.1	Mosaico	464	54.5	Mosaico
	Disómicas 46,XX	525			562		
	18(2),X(3)	9			4		
	18(4),X(4)	0			1		
8 NV40	Aneuploides 45,X	1511	0	No Mosaico	501	0	No Mosaico
	Disómicas 46,XX	0			0		
	18(1),X(1)	0			2		
	18(2)	0			2		
9 NV60	Aneuploides 45,X	1000	0	No Mosaico	497	0	No Mosaico
	Disómicas 46,XX	0			1		
	18(1),X(1)	0			2		
10 NV158	Aneuploide 45,X	999	0	No Mosaico	496	0	No Mosaico
	Disómica 46,XX	0			1		
	18(1),X(1)	1			3		

11 NV249	Aneuploide 45,X	127	87.2	Mosaico	163	83.5	Mosaico
	Disómica 46,XX	868					
	18(1),X(2)	4					
	18(1),X(1)	1					
	18(4),X(4)	0					
833							
0							
2							
2							
12 NV250	Aneuploide 45,X	983	1.3	No Mosaico	983	1.1	No Mosaico
	Disómica 46,XX	13					
	18(1),X	2					
	18(4),X(2)	2					
11							
5							
1							
13 NV251	Aneuploide 45,X	987	1.2	No Mosaico	976	2.2	No Mosaico
	Disómica 46,XX	12					
	18(1),X(1)	1					
22							
2							
14 NV261	Aneuploide 45,X	997	0	No Mosaico	985	1.1	No Mosaico
	Disómica 46,XX	0					
	18(1),X(1)	3					
11							
4							
15 NV263	Aneuploide 45,X	326	67.4	Mosaico	321	67.6	Mosaico
	Disómica 46,XX	672					
	18(4),X(4)	3					
676							
3							
16 NV269	Aneuploide 45,X	988	1	No Mosaico	984	1.2	No Mosaico
	Disómica 46,XX	9					
	18(1),X(1)	3					
12							
4							
17 NV271	Aneuploide 45,X	993	0	No Mosaico	492	0.5	No Mosaico
	18(1),X(1)	4					
	18(4),X(2)	3					
5							
3							

18 NV272	Aneuploide 45,X	356	45,X 35.2% 46,XX 33.5% 46,XidicX 31.1%	Mosaico	144 188 168 0	45,X 28.8% 46,XX 37.6% 46,XidicX 33.6%	Mosaico
	Disómica 46,XX	339					
	18(2),X(3) Línea idic	315					
	18(4),X(6)	1					
19 NV273	Aneuploide 45,X	988	1	No Mosaico	493 0 1 6	0	No Mosaico
	Disómica 46,XX	8					
	18(4),X(2)	0					
	18(1),X(1)	4					
20 NV279	Aneuploide 45,X	997	0	No Mosaico	989 5 6	0.5	No Mosaico
	Disómica 46,XX	1					
	18:1,X	2					
21 NV30	Aneuploides 45,X	462	77.2	Mosaico			
	Disómicas 46,XX	1568					
22 NV41	Aneuploides 45,X	1504	0	No Mosaico			
	Disómicas 46,XX	1					
23 NV42	Aneuploides 45,X	1000	0	No Mosaico			
	Disómicas 46,XX	0					
24 NV52	Aneuploides 45,X	998	0	No Mosaico			
	Disómicas 46,XX	2					
25 NV83	Aneuploides 45,X	976	2.4	No Mosaico			
	Disómicas 46,XX	24					

26 NV103	Aneuploides 45,X	992	0	No Mosaico
	Disómica 46,XX	3		
	18(3),X	1		
	18,X	4		

27 NV106	Aneuploide 45,X	441	56	Mosaico
	Disómicas 46,XX	558		
	18(1),X(2)	1		

28 NV108	Aneuploide 45,X	177	83.3	Mosaico
	Disómicas 46,XX	833		

29 NV114	Aneuploide 45,X	987	1.2	No Mosaico
	Disómica 46,XX	12		
	18(1),X(1)	1		

30 NV134	Aneuploide 45,X	427	57	Mosaico
	Disómica 46,XX	570		
	18(1),X(1)	2		
	18(1),X(2)	1		

31 NV244	Aneuploide 45,X	993	0.5	No Mosaico
	Disómica 46,XX	3		
	18(4),X(2)	2		
	18(1),X(1)	2		

32 NV246	Aneuploide 45,X	979	1.9	No Mosaico
	Disómica 46,XX	19		
	18(1),X	4		

33 NV256	Aneuploide 45,X	986	1.3	No Mosaico
	Disómica 46,XX	11		
	18(4),X(2)	2		
	18(1),X(1)	1		

34 NV267	Aneuploide 45,X	995	0	No Mosaico
	Disómica 46,XX	1		
	18(2)	1		
	18(1),X(1)	2		

35 NV270	Aneuploide 45,X	15	98.6	Mosaico
	Disómica 46,XX	1082		
	18(1),X(2)	3		

Casos de disgenesia gonadal

36 NV47	Aneuploide 45,X	3	99% de la línea 46,XY	Mosaico
	Disómica (XY)	497		
	Disómica (XX)	0		
	XXY	0		
	XYY	1		

294	13% de la línea 46,XY y 80% de la línea 45,X	Mosaico
49		
15		
6		
0		

37 NV107	Disómica 46,XY	500	0	No Mosaico
-------------	-------------------	-----	---	---------------

Las primeras 20 pacientes cuentan con análisis tanto de células sanguíneas como epiteliales, las 17 siguientes únicamente con el análisis de células sanguíneas; en las dos últimas pacientes, diagnosticadas con ST se encontró positiva la sonda centromérica de cromosoma Y.

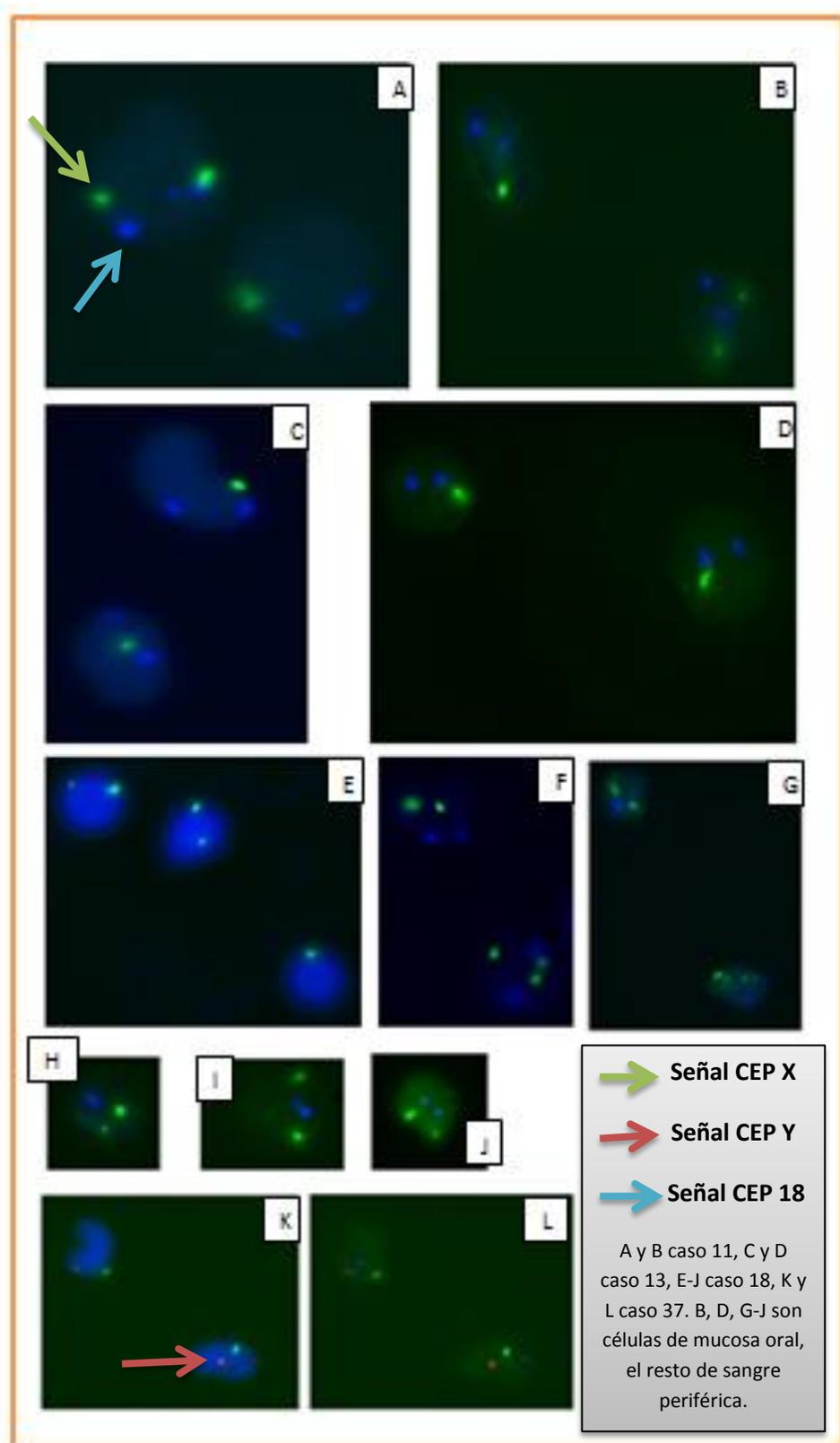


Imagen 8. Células representativas de sangre periférica y mucosa oral de los casos 11, 13, 18 y 37.

Casos Representativos. Se indica el color de las señales así como si trata de células de sangre periférica o de mucosa oral. **A)** Caso 11 (NV 249), células de sangre periférica. Se observa como señal verde el centrómero del cromosoma X y con azul el del cromosoma 18 (cromosoma control). La célula de la izquierda presenta dos señales del cromosoma X, mientras que la de la derecha sólo una, es decir su fórmula es 46,XX y 45,X respectivamente. Así mismo se observa el resto del núcleo contrastado con el fondo, este se tiñó con DAPI, sin embargo este colorante no se muestra en la imagen. **B)** Caso 11 (NV 249), células de descamación de mucosa bucal, en la célula de la izquierda tiene una señal del cromosoma X y dos del 18 (45,X) y la de la derecha dos de ambos cromosomas (46,XX). Este es un caso representativo de mosaicismo. **C)** Caso 13 (NV 251), células de sangre periférica, ambas células muestran una señal del cromosoma X y dos del cromosoma 18, (45,X). **D)** Caso 13 (NV 251), Células de descamación de mucosa bucal, ambas con una señal del cromosoma X y dos del 18, (45,X). Este es un caso representativo de ST clásico. **E)** Caso 18 (NV 272), este es el caso del cromosoma isodicéntrico del X. Células de sangre periférica. En este caso sólo se muestran las señales del cromosoma X y el núcleo contrastado con DAPI. La célula de la izquierda, muestra 3 señales (dos de ellas muy juntas en el extremo superior derecho) (46,X(idic)(X)) , la célula del centro presenta dos señales (46,XX) y la de la derecha sólo una (45,X), en esta imagen se pueden apreciar las tres líneas celulares de la paciente. **F)** Caso 18 (NV 272), células de sangre periférica, la célula de la izquierda presenta dos señales del cromosoma X y dos del 18 (46,XX) y la de la derecha tres del cromosoma X y dos del 18 (46,X(idic)(X)). **G-J)** Caso 18 (NV 272), células de descamación de mucosa bucal en las cuales se presentan diferentes fórmulas cromosómicas, con dos señales del cromosoma 18 y dos (46,XX) o tres (46,X(idic)(x)) señales del cromosoma X, también fueron halladas células con una señal (45,X), pero no se muestra imagen. **K)** Caso 37 (NV 107), las células se observan teñidas con DAPI, una señal del cromosoma X y una del cromosoma Y (46,XY), este es un caso representativo de disgenesia gonadal. **L)** Caso 37 (NV107), mismas células de la imagen anterior, sólo que en este caso se observan las señales de los cromosomas 18 junto con las de los cromosomas sexuales.

VIII Discusión

La detección de mosaicismo está dada por cuatro factores: el tipo y número de tejidos analizados; el número de células estudiadas; la sensibilidad de las técnicas utilizadas; y la posibilidad de selección de algún tipo celular, lo cual puede resultar en la desaparición de las líneas celulares. Un pequeño porcentaje de mosaicismo no se puede detectar por la técnica de citogenética clásica, porque este tipo de análisis requiere un gran número de células en mitosis. El uso FISH favorece la detección de líneas de baja frecuencia (Maciel-Guerra, A. 2012; Held, K. 1992; Gancho, E. 1983).

El emplear células de sangre periférica obtenidas por cosecha directa así como células de mucosa bucal obtenidas por la misma técnica, favorece la detección de mosaicismo de baja frecuencia, además el resultado es de dos tejidos de diferente origen embrionario (leucocitos de origen mesodérmico y células epiteliales de mucosa bucal de origen ectodérmico). Finalmente en el caso de células de sangre periférica, no se seleccionan los linfocitos T, por lo que el resultado abarca a todos los leucocitos presentes en sangre periférica (Quilter, C. 1998; Hanson, L. 2001).

Para el presente trabajo se analizaron 1000 células en dos conteos separados en sangre periférica, sin embargo en mucosa bucal sólo en algunos casos fue posible el análisis de 1000 células, en otros los conteos son inferiores, esto debido a la cantidad y calidad de la muestra.

Las pacientes 7, 11 (ver figura 8 A) sangre periférica e B) Mucosa oral), 15 y 18 (con análisis en dos tejidos) presentaron mosaicismo, en la paciente 7, hay una diferencia de más de 10% de mosaicismo de un tejido con respecto al otro, esto nos puede indicar que el número de células analizadas podría ser más amplio o bien que hay una diferencia del nivel de mosaico entre tejidos. Las pacientes 11 y 15 presentan un porcentaje de mosaicismo cercano entre tejidos. Finalmente la paciente 18 es mosaico pero de tres líneas celulares (más adelante se explica este caso). Las cuatro pacientes representan un 20% de las pacientes con, análisis en dos tejidos.

De las pacientes 21 a 35, en las cuales el análisis sólo se encuentra en sangre periférica, las pacientes 21, 27, 28, 30 y 35 presentan mosaicismo con distintos porcentajes. Sin embargo por no contar con el análisis en células de mucosa bucal, no se puede establecer diferencia entre tejidos.

En la población estudiada, se detectó un 70.2% de pacientes con monosomía X y un 27% de pacientes con mosaicismo, este último involucrando las líneas 45,X y 46,XX, así como una sola paciente con alteración estructural del cromosoma Y que representa un 2.7%, sin embargo cabe recordar que dicho estudio tiene como fin el estudio del mosaicismo en pacientes que fueron previamente seleccionadas con estudio citogenético, es decir que cuentan con cariotipo 45,X, por lo que el porcentaje de mosaicismo aquí encontrado se suma al teórico, mismo que oscila

entre 30 y 40% (o incluso más según el autor), dando como resultado un porcentaje mínimo de 57-67% de pacientes con estado de mosaico, mucho más alto que el reportado previamente. Este valor es determinado gracias a que el FISH en interfase en más de un tejido con estudio de un número elevado de células permite detectar alteraciones que pueden pasar desapercibidas por citogenética clásica.

Así mismo debe ser también mencionado que no se realizó una búsqueda dirigida de alteraciones estructurales, sólo en la paciente 37 (Ver figura 8 K) e L) ambos sangre periférica) se puede inferir una alteración estructural sin mosaicismo, pues presenta un cromosoma Y, que puede involucrar alguna alteración estructural como una deleción que involucre el gen SRY, por lo cual no pudo inducir el fenotipo masculino, sin embargo dicha paciente no cuenta con el estudio de mucosa bucal. Sin embargo si se suma el porcentaje equivalente de la paciente (2.7%) al teórico de 10-20% para las alteraciones estructurales (puesto que hubo una selección poblacional previa) el nuevo valor 12.7-22.7% no se aleja del reportado previamente.

En otras palabras, las pacientes estudiadas representaron el 100% de las pacientes con cariotipo 45,X, de la población pre seleccionada (con la excepción del caso 18 donde el cariotipo previo reconocía la existencia de dos líneas celulares, para el cual se determinó una adicional) sin embargo al realizar el presente trabajo ese porcentaje disminuye, perdiendo casi un 30%, que se reparte a las otras presentaciones del ST

ST mosaico con tres líneas celulares.

El caso 18 (Ver imagen 8 E) e F) sangre periférica e G-J) mucosa oral), es el único del presente trabajo en que se detectaron 3 líneas celulares. Se detectó una línea 45,X (no mostrada en imagen), una 46,XX y una más en la cual se observaron 3 señales correspondientes al centrómero del cromosoma X, en donde dos de ellas aparecían contiguas, a partir de ello y de la revisión del cariotipo de la paciente, se determinó que esta última línea es 46, X idic (X)(p11).

El cariotipo más común es 45,X, (como el caso 13, imagen 8 C) sangre periférica e D) mucosa oral) sin embargo también se pueden encontrar algunos rearrreglos estructurales del cromosoma X y de ellos el más común es el cromosoma isodiccéntrico, idic(X)(p11), el cual puede aparecer en una de 14000 mujeres con ST, ya sea en mosaico o no (Scott, S: 2010; Howell, R. 1976; Melaragno, M. 1993; Van Dyke, D. 1988). Aunque, en nuestro estudio no se buscaron marcadores moleculares para establecer el origen del cromosoma X isodiccéntrico, el mecanismo más común de formación de un idic (X) (p11) es el la ruptura en p11 y reunión en U de las dos cromátidas de los brazos cortos del cromosoma X , sin embargo el mecanismo de generación de este cromosoma, también podría ser

una translocación de dos homólogos X, lo cual aunque es más raro, no se puede descartar.

En el análisis de bandas G de la paciente, se determinó el resultado: mos 46,X i(Xq) [25]/45,X [5], de un análisis de 30 metafases; el análisis del FISH, reveló diferentes proporciones de las líneas y una línea 46,XX, que no fue detectada mediante citogenética convencional. Sin embargo es importante recordar que en el análisis de bandas G se lleva a cabo una selección de linfocitos T, por lo que el resultado no abarca a todos los leucocitos. Es importante incrementar en número de metafases analizadas, así como determinar los posibles puntos de ruptura. También es importante notar que en bandas G se determinó al cromosoma anómalo como un isocromosoma, información que fue complementada con el análisis de FISH, con el cual se determinó que se trata de un isodicéntrico.

ST y cromosoma Y

Los cromosomas sexuales evolucionaron a partir de un par autosómico, sin embargo, el cromosoma Y ha conservado sólo el 3% de los genes autosómicos ancestrales, contra un 98% en el cromosoma X. (Hughes, J. 2012; Bellot, D. 2013; Bellot, D. 2014; Dos Santos, A. 2013). El cromosoma Y humano tiene una longitud total de aproximadamente 60 MB y se compone de dos regiones pseudoautosómicas (PAR1 y PAR2), una región eucromática, que es rica en genes específicos de testículo, y una región heterocromática, que contiene ADN satélite altamente repetitivo. La región eucromática y algunas de las partes heterocromáticas del cromosoma Y se llaman MSY (male-specific region on Y chromosome), que comprende 95% de la longitud del cromosoma. MSY contiene 496 genes, incluidos 51 genes de codificación, 326 pseudogenes, y 119 genes no codificantes (Li, Y. 2007; Skaletsky, H. 2003; Ensembl, 2013).

De los genes en el cromosoma Y, cuatro (*SRY*, *RBMX*, *TSPY* y *HSFY*) han divergido claramente en función de sus homólogos en el cromosoma X (*SOX3*, *RBMX*, *TSPX* y *HSFX*) para generar roles masculino-específicos en la reproducción, desarrollo y en la gametogénesis. Existen además ocho reguladores globales de actividad génica presentes en los cromosomas sexuales, codificadores de isoformas de proteínas en diversos tejidos (*UTX* / Y, *EIF1AX* / Y, *ZFX* / Y, *RPS4X* / Y, *KDM5C* / D, *DDX3X* / Y, *USP9X* / Y, y *TBL1X* / Y) que contribuye a las diferencias existentes entre género (Bellott, D. 2014), así como los genes *DAZ*, *CDY1*, *DBY*, *UTY*, *AZF* a, b y c que contribuyen también en la diferenciación sexual (Premi, S. 2008).

En las pacientes 36 y 37, diagnosticadas con ST, se encontró el centrómero del cromosoma Y, esto mediante la sonda CEPY del kit de trabajo.

Se ha detectado mediante cariotipo que entre el 4 y 20% de las pacientes con ST tienen presente un cromosoma Y o derivados, sin embargo esta frecuencia puede ser mayor ya que mediante análisis de PCR, se ha detectado que entre 15 y 60% de las pacientes tienen material del cromosoma Y (Wolf, D. 2000; Alvarez-Nava, F. 2003). Sin embargo dicho intervalo es muy amplio y las secuencias del cromosoma Y no implican un hallazgo citogenético. En el 3% de los casos de ST, se detectan marcadores cromosómicos no identificados y de estos la mitad corresponden al cromosoma Y (Canto, P. 2004). En el presente trabajo, las pacientes con este hallazgo representan un 5% del total de la población, aunque la señal detecta únicamente el centrómero del cromosoma Y y no otras secuencias del mismo.

En aquellos casos de ST en que se encuentra un cromosoma Y, éste generalmente presenta alguna alteración estructural, como puede ser una deleción, inversión, cromosomas dicéntricos o en anillo, lo cual le vuelve un cromosoma inestable y puede generar un cariotipo 45, X (Liehr, T. 2007; Premi, S. 2008). El gen SRY localizado en Yp11.3 es un factor de transcripción que regula la expresión de otros genes necesarios para la diferenciación sexual, su presencia en ST se ha relacionado con tumores gonadales (Cassidy, S. 2005). Es importante mencionar que no siempre se encuentra alterado el gen SRY en pacientes con ST que presentan cromosoma Y, por lo que se hace hincapié en el papel importante que pueden tener los demás genes antes mencionados.

Se detectó mediante FISH, que el centrómero del cromosoma Y, se encuentra presente en estas dos pacientes, sin embargo, dado que únicamente se detectó el centrómero y no un cromosoma completo o regiones de manera dirigida (como SRY), no se pueden descartar alteraciones estructurales del Y..

La paciente número 36, presenta en sangre periférica ausencia de mosaicismo, con un resultado en FISH 46, XY, mientras que en mucosa bucal, si hay un estado de mosaico, con un 80% de la línea 45, X y un 13% de la línea 46,XY. Ello sugiere que el evento causal del mosaicismo ocurrió posterior a la diferenciación de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). Es necesario establecer posibles alteraciones en los genes SRY, RBMY, TSPY, HSFY, DAZ, CDY1, DBY, UTY y AZF a, b y c, importantes en la generación de roles masculinos, mediante estudios moleculares.

Por su parte la paciente 37, no presenta mosaicismo en sangre, el 100% de las células tienen el mismo complemento cromosómico, 46, XY. Sin embargo al no disponer de una muestra de mucosa bucal, no se puede asegurar el mismo resultado en dicho tejido. En lo que respecta al tejido sanguíneo, donde se encontró el centrómero del cromosoma Y, se puede inferir que éste presenta

alguna anomalía estructural, sin embargo no es inestable puesto que al encontrarse en todas las células analizadas, no se perdió en las divisiones celulares llevadas a cabo en la maduración de los leucocitos. En caso contrario, se habrían hallado células 45, X generadas a partir de la pérdida del cromosoma Y. De modo que la anomalía que presenta el cromosoma Y puede ser una deleción, u otra que no afecte la estabilidad del cromosoma, o bien una mutación puntual en alguno de los genes SRY, RBMY, TSPY, HSFY, DAZ, CDY1, DBY, UTY y AZF a, b y c. Esto debe ser estudiado mediante estudios moleculares.

IX Conclusiones

El ST se puede clasificar en tres grupos, uno clásico donde el cariotipo es 45, X, otro con alteraciones estructurales y finalmente el grupo de mosaicismo en donde podemos encontrar una segunda línea con o sin alteraciones estructurales. Este último representa al rededor del 30-40% de las pacientes. La detección del mosaicismo se debe realizar en un número amplio de células y en al menos dos tejidos de diferente origen embrionario.

En el presente trabajo fue posible determinar el estado de mosaicismo en 4 de las 20 pacientes con análisis en dos tejidos y en 5 de las 15 con análisis sólo en sangre periférica el cual involucró dos líneas celulares o bien tres en el caso 18. Además en dos pacientes se determinó la presencia de un cromosoma Y, una de ellas con análisis en dos tejidos en estado de mosaico y la otra con análisis sólo en sangre periférica sin mosaico.

La técnica de FISH en interfase es un método de elección ideal pues el análisis es rápido y además no hay selección de células, por lo que en sangre periférica se estudian todos los leucocitos, además permite la detección de mosaicismo sobre pacientes que no se consideraba lo presentaban.

Los resultados apuntan a que el evento que generó el mosaicismo en las pacientes con análisis en ambos tejidos ocurrió en una fase temprana del desarrollo embrionario pues afectó a ambos tejidos con porcentajes similares.

Así mismo los resultados indican que los valores reportados por la literatura para el caso específico del mosaicismo son menores a los reales, ya que se determinó un 27% de pacientes con mosaico que previamente no se consideraba que presentaban dicha condición cromosómica (salvo la paciente 18).

Es necesario complementar el estudio con metodología molecular con el objetivo de determinar si existe alteración estructural en el cromosoma Y o bien si hay mutaciones en el gen *SRY*, por lo que no masculinizó la paciente para poder determinar con mayor claridad si el valor reportado para las alteraciones estructurales puede cambiar.

X Perspectivas.

El presente trabajo forma parte de un proyecto que persigue la identificación de factores de riesgo para presentar abortos o hijos con alteraciones cromosómicas que estén asociadas a los cromosomas de las aneuploidías más frecuentes (trisomía 13, 18 y 21) así como al ST para que en un futuro estos factores sirvan de marca que evidencie estas alteraciones al inicio de un embarazo. Existe además, en el caso del ST una variabilidad genética amplia en la cual se ha

observado que el mosaicismo cromosómico no juega un papel determinante, pues no se observan diferencias en la sobrevivencia, abortos o neonatos en comparación con quienes presentan cariotipo clásico, la amplia variabilidad fenotípica no se explica satisfactoriamente. Cabe recalcar que la importancia de este trabajo para dicho proyecto es la selección de pacientes sin estado de mosaico, para que la búsqueda de factores de riesgo sea en aquellas pacientes con ST clásico.

Es indispensable ampliar el análisis del presente trabajo para:

- a) Completar el análisis con las 16 pacientes que no cuentan con su estudio en mucosa bucal.
- b) Alcanzar el número mínimo de 1000 células estudiadas por FISH
- c) Determinar los puntos de ruptura y mecanismos de formación en los casos con alteraciones estructurales
- d) Realizar estudios moleculares y de citogenética convencional en los casos con presencia de cromosoma Y, con el objetivo de determinar alteraciones estructurales o mutaciones génicas, que expliquen el fenotipo de las pacientes.
- e) También es de suma importancia en las pacientes 36 y 37 realizar una búsqueda de genes implicados en la diferenciación sexual, tales como SRY y DAZ pues de estar presentes se pueden relacionar con algunos tipos de cáncer.

Finalmente, el estudio completo, citogenético, molecular y clínico se debe complementar para tener una visión más integral de la condición genética de las pacientes con ST, determinar factores que expliquen la variabilidad fenotípica y la relación con el genotipo así como factores de riesgo identificables durante el embarazo.

XI Bibliografía

Alberts, B. et al. 2008. Biología molecular de la célula. Tercera edición. Omega. Barcelona

Álvarez-Nava F, Soto M, Martínez MC, Prieto M, Álvarez Z. 2003 FISH and PCR analyses in three patients with 45,X/46,X,idic(Y) karyotype: clinical and pathologic spectrum. *Ann Genet.* 46: 443-8.

Bachtrog D. 2013 Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nat Rev Genet.* 14(2):113–124.

Barch, M.J., Knutsen, T., Spurbeck, J. 1997. The AGT Cytogenetics. Laboratory Manual. Lippincott-Raven publishers. Philadelphia. New York.

Bellott, D. W., Hughes, J. F., Skaletsky, H., Brown, L. G., Pyntikova, T., Cho, T.-J., Page, D. C. 2014. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature*, 508(7497), 494–499. doi:10.1038/nature13206

Bondy, C. et al. 2013. Bicuspid aortic valve and aortic coarctation are linked to deletion of the X chromosome short arm in Turner syndrome. *J MedGenet* 50(10):662-665.

Bondy, C. 2007. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner syndrome Study group. *J Clin Endocrinol Metab* 92(1):10-25

Bugge, M., Collins, A., Hertz, J.M., Eiberg, H., Lundsteen, C., Brandt, C.A., Bak, M., Hansen, C., Delozier, C.D., Lespinasse, J. et al. 2007 Non-disjunction of chromosome 13. *Hum. Mol. Genet.*, 16, 2004– 2010.

Canto P, Kofman-Alfaro S, Jiménez AL, Söderlund D, Barrón C, Reyes E et al. 2004 Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45,X karyotype and Y chromosome sequences. *Cancer Genet Cytogenet.* 150: 70-2.

Cassidy SB, Allanson JE. 2005 Management of Genetics Syndromes. 2nd edition, Wiley-Liss. 569-605.

Clement-Jones, M., S. Schiller, et al 2000. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum Mol genet* 9(5):605-702.

Cummings M.R., 1995. Herencia Humana: Principios y Conceptos. Editorial Interamericana. McGraw-Hill. España.Tercera edición.

Czpunkowski B. 2001 Analyzing chromosomes. BIOS Scientific Publishers Limited. Pp 113-114.

Davenport, M. L. 2010. Approach to the patient with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(4):1487-1495.

Dos Santos, A. P., Ribeiro Andrade, J. G., Piveta, C. S. C., de Paulo, J., Guerra-Junior, G., de Mello, M. P., & Maciel-Guerra, A. T. 2013. Screening of Y chromosome microdeletions in 46,XY partial gonadal dysgenesis and in patients with a 45,X/46,XY karyotype or its variants. *BMC Medical Genetics*, 14, 115. doi:10.1186/1471-2350-14-115

Elsheik M. D. G., Conway S. Wass J. 2002. Turner's syndrome in adulthood. *Endocrine Reviews* 23(1):120-140.

Ensembl Genome Browser. 2015 Disponible en:
<http://www.ensembl.org/index.html>.

Fernández A., et al. 2002. Síndrome de Turner. Tratado de endocrinología pediátrica. Tercera edición. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid. 780-803

Gancho EB, Warburton D. 1983 La distribución de genotipos cromosómicas asociadas con el síndrome de Turner: las tasas de prevalencia de nacimientos vivos y la evidencia de la mortalidad fetal disminuida y la severidad en los genotipos asociados con anomalías estructurales X o mosaicismo. *Hum Genet.* 64 (1): 24-7.

Gersen, S. and Keagle, M. 2012 Autosomal aneuploidy. Chapter 8 in *The principles of clinical cytogenetics*. Humana Press. 134-135.

Gersen S. Keagle M. 2013. *The principles of clinical cytogenetics*. Springer. Tercera edición. New York.

Gravholt, C. H. 2005. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 49(1):145-156

Griffiths, A., Gelbart, W. M., Miller, J., Lewontin, R. 1999. *Genética Moderna*. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. Madrid.

Hall, H., Chan, E.R., Collins, A., Judis, L., Sofia, S., Surti, U., Hoffner, L., Cockwell, A., Jacobs, P.A. and Hassold, T. 2007 The origin of trisomy 13. *Am. J. Med. Genet.*

Hall, H., Surti, U., Hoffner, L., Shirley, S., Feingold, E. and Hassold, T. 2007 The origin of trisomy 22: evidence for acrocentric chromosome-specific patterns of nondisjunction. *Am. J. Med. Genet.*

Hanson L, Bryman I, Barrenas ML, et al. 2001 El análisis genético de mosaicismo en 53 mujeres con síndrome de Turner. *Hereditas.* 134 (2): 153-9.

Hassold T., Hall H., Hunt P. 2007 The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics*. 16:203-208

Hassold T., Hunt P. 2001 To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* 2:280-291.

Hassold T.J., Takaesu N. 1989 Analysis of non-disjunction in human trisomic spontaneous abortions. In: Hassold TJ, Epstein CJ, editors. *Molecular and cytogenetic studies of non-disjunction*. New York: Alan R. Liss Inc. p. 115–34.

Heim, S and Mitelman, F. 1995. *Cancer Cytogenetics*. Second Edition. Wiley – Liss. Canadá.

Held KR, Kerber S, E Kaminsky, et al. 1992 El mosaicismo en el 45, el síndrome de Turner X: la no supervivencia en el embarazo temprano depende de la presencia de dos cromosomas sexuales *Hum Genet.* 88 (3): 288-94.

Howell R.T. ,Roberts S.H. ,Barba R.J. 1976 Dicéntrico X isocromosomas en el hombre . *J. Med. Genet.* 13 : 496 - 500 . doi: 10.1136 / jmg.13.6.496.

Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG, Pyntikova T, Graves T, Fulton RS, Dugan S, Ding Y, Buhay CJ, Kremitzki C, Wang Q, Shen H, Holder M, Villasana D, Nazareth LV, Cree A, Courtney L, Veizer J, Kotkiewicz H, Cho TJ, Koutseva N, Rozen S, Muzny DM, Warren WC, Gibbs RA, Wilson RK, Page DC. 2012 Strict evolutionary conservation followed rapid gene loss on human and rhesus Y chromosomes. *Nature*. 483(7387):82–86. doi: 10.1038/nature10843.

Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. 1992 Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet.* 29:103–8.

Jorde Lynn B., et al 2005, *Genética Médica*. Tercera edición. Elsevier, Madrid.

Kesler, S.R. 2007 Turner syndrome. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 16(3): 709-722

Klung, W. S. y Cummings, M. R. 1999. Traducción Mensua Fernández José Luis. *Conceptos de genética*. Quinta edición. Madrid. Editorial Prentice Hall.

Lamb N.E., Yu K., Shaffer J., Feingold E., Sherman S.L. 2005 Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. *Am. J. Hum. Genet.* 76:91-9

Li Y, Vilain E, Conte F, Rajpert-De Meyts E, Lau YF. 2007 Testis-specific protein Y-encoded gene is expressed in early and late stages of gonadoblastoma and

testicularcarcinoma in situ. *Urol Oncol.* 25(2):141–146. doi: 10.1016/j.urolonc.2006.08.002. [PubMed] [Cross Ref]

Liehr T, Claussen U, Starke H. 2007 Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in patients with a 45,X/46,X,+mar Karyotype -17 new cases and a review of the literature. *Sex Dev.* 1: 353-62.

Lippe BM 1990 Physical and anatomical abnormalities in Turner syndrome. New York. 183-196

Lopez, M.,P. Canto, et al. 1998 Frequency of Y chromosomal material in Mexican patients with Ullrich-Turner síndrome *Am J Med Genet* 76(2):120-124.

Lyon Mary F. 1961. Gene Action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.) *Nature* 190, 372 – 373

Maciel-Guerra, Andréa Trevas et al. 2012 The use of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of hidden mosaicism: apropos of three cases of sex chromosome anomalies. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. vol.56, n.8 ISSN 0004-2730.

Melaragno M.I. , Fakh L.M., Cernach M.C. , Maccagnan P. 1993. Isodicéntrico cromosoma X y mosaicismo: informe sobre dos casos de 45, X / 46, X, idic (Xq) / 47, X, idic (Xq), idic (Xq) y revisión de la literatura . *Am. J. Med. Genet.* 47: 357 - 359 . doi: 10.1002 / ajmg.1320470312.

Premi S, Srivastava J, Panneer G, Ali S. 2008 Startling mosaicism of the Y-chromosome and tandem duplication of the SRY and DAZ genes in patients with Turner syndrome. *PLoS One.* 3(11): e3796.

Quilter CR, Taylor K, Conway GS, Nathwani N, Delhanty JD. 1998 Investigaciones citogenéticas y moleculares de secuencias del cromosoma Y y su papel en el síndrome de Turner. *Ann Hum Genet.* 62 (Pt 2): 99-106.

Ranke M. Saenger P. 2001 Turner syndrome. *Lancet* 358:309-314

Rodríguez F. 2000. Disgenesias gonadales. Tratado de endocrinología pediátrica y de la adolescencia. Segunda edición. Barcelona. 798-806

Rosenfield R. G. et al. 1994. Recommendations for diagnosis, treatment and management of individuals with Turner syndrome. *Endocrinologist* 1994 (4):351-358

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG. et al. 2003 The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete

sequence classes. *Nature* 423(6942):825–837. doi: 10.1038/nature01722. [PubMed] [Cross Ref]

Saenger P, Albertsson Wikland, et. al. 2001 Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3061-3069

Salamanca F. 1990 *Citogenética Humana. Fundamentos y aplicaciones clínicas*. 2ª ed. México DF: Ed. Médica Panamericana; 159-161.

Scott, S. A., Cohen, N., Brandt, T., Warburton, P. E., & Edelmann, L. 2010. Large inverted repeats within Xp11.2 are present at the breakpoints of isodicentric X chromosomes in Turner syndrome. *Human Molecular Genetics*, 19(17), 3383–3393. doi:10.1093/hmg/ddq250

Sherman S.L., Lamb N.E., Feingold E. 2005 Relationship of recombination patterns and maternal age among non-disjoined chromosomes 21. *Biochem. Soc. Trans.* 34:578-580.

Solari, A. J. 1999. *Genética Humana. Fundamentos y Aplicaciones en Medicina.. Segunda edición*. Buenos Aires. Médica panamericana.

Van Dyke D.L. 1988. *La Citogenética de mamíferos autosómicos reordenamientos*. Daniel A., editor. Vol. 8. Nueva York: AR Liss , p 635 -665.

Vorsanova, S.G. Kolotii, A.D. Iourov, I.Y. Monakhov, V.V., Kirillova, E.A. Soloviev, I.V. and Yurov Y.B. 2005. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis *J Histochem Cytochem.* 53: 375.

Warburton D, Byrne J, Canki N. 1991. *Chromosome anomalies and prenatal development: an atlas*, Oxford monographs on medical genetics no. 21. New York/Oxford: Oxford University Press.

Warburton D., Dallaire L., Thangavelu M., Ross L., Levin B., Kline J. 2004. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. *Am. J. Hum. Genet.* 75:376-385.

Wang, J. C. C. 2005 Autosomal aneuploidy. Chapter 8 in *The principles of clinical cytogenetics*. Eds Gersen S. and Keagle M, Humana Press. pp 133-139.

Wolff DJ. 2000 Advances in laboratory evaluation of turner syndrome and its variants: beyond cytogenetics studies. *Indian J Pediatr.* 67(11): 825-9.

Anexo Hojas de Consentimiento.

LOGOTIPO DE INSTITUCIÓN PARTICIPANTE

Carta de Consentimiento Informado.

Título del Proyecto

“ESTUDIO INTEGRAL DEL GENOMA, PROTEOMA Y METABOLOMA EN ABORTOS Y NACIDOS VIVOS CON ANEUPLODÍAS. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES NO INVASIVOS

México,D.F., a ____ de _____ de 20__

Yo _____ padre,

y yo _____ madre

del niño (a) _____

estamos enterados del proyecto del cual se nos ha explicado que:

1.- Es un proyecto de investigación para tratar de identificar factores de riesgo para presentar abortos o hijos con alteración en parte de su material genético que son los cromosomas, y que en un futuro estos factores podrían se útiles para detectar este tipo de alteraciones al inicio del embarazo.

2. Nuestra participación es completamente voluntaria, sin costo por los estudios de este protocolo de investigación

3.-Los procedimientos para este estudio son que un médico genetista realizará la historia clínica genética con árbol genealógico. Posteriormente a nuestro hijo(a) se le tomarán dos muestras, una de sangre y otra de orina. De acuerdo a la edad se decidirá tomar de 3-10 ml de sangre con aguja y jeringa nuevas y una muestra de orina previa a su alimento o de la primera orina de la mañana. A nosotros se nos tomarán 10 ml de sangre, siempre con agujas y jeringas nuevas.

4.- Puede haber dolor leve o molestia al pinchar con la aguja durante la extracción de sangre y que pueden presentarse complicaciones mínimas como la formación de un “moretón” o infección en el sitio de punción, pero que el riesgo es muy bajo por contar con condiciones de limpieza y personal capacitado.

5.- Las muestras obtenidas serán codificadas y se guardarán bajo la responsabilidad de los investigadores relacionados al proyecto de investigación.

6.- En la consulta del servicio de Genética el médico tratante nos proporcionará información sobre los resultados de las alteraciones cromosómicas.

7.- Es posible que como resultado de esta investigación se puedan generar productos comerciales, de los cuales no recibiremos beneficio de tipo financiero.

8.-Todos los resultados obtenidos de este estudio serán confidenciales y sólo podrán ser utilizados para ser publicados o comunicados en congresos y en alguna revista médica, con finalidad exclusivamente científica y respetando nuestra privacidad.

9.- Las muestras sobrantes o no utilizadas en este estudio, podrían ser eliminadas o bien guardadas en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría para realizar en un futuro algún otro estudio genético complementario

10.- Las muestras almacenadas serán codificadas y sólo identificadas por el investigador responsable y los resultados de un nuevo estudio se nos informarán o no de acuerdo a nuestra decisión.

11.- Aún después de haber decidido autorizar el almacenamiento y uso de la muestra para otros estudios, en cualquier momento podemos solicitar que sea destruida, sin que esto afecte la relación con el grupo médico ni la atención de mi hijo(a) en este Instituto.

Por favor, marque con una X lo que considere apropiado

Autorizo / No autorizo que se realicen las pruebas genéticas que me han explicado

Aceptamos el almacenamiento de las muestras para otros estudios relacionados, de manera anónima sin vinculación con nosotros y nunca sabremos resultados_____

Aceptamos el almacenamiento de las muestras para otros estudios relacionados, con identificación codificada y nos informarán resultados _____

Hemos tenido la oportunidad de hacer preguntas las cuales fueron contestadas claramente. Si es necesario localizarnos podrá ser en la siguiente dirección o teléfono:

Cualquier duda, podrá resolverla con la investigadora responsable,

Recibí copia de este documento.

Nombre y firma del Padre o Tutor

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma de Testigo

Nombre y firma de Testigo

Nombre y firma del Investigador

Hoja de recolección de información del paciente y datos clínicos.

Logotipo de Institución participante	TÍTULO DEL PROYECTO: “ESTUDIO INTEGRAL DEL GENOMA, PROTEOMA Y METABOLOMA EN ABORTOS Y NACIDOS VIVOS CON ANEUPLOIDÍAS. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES NO-INVASIVOS.”		
<i>HOJA DE RECOLECCION DE DATOS CLINICOS</i>			
FAVOR DE LLENAR LOS SIGUIENTES DATOS O BIEN, ANEXAR COPIA DE LA HISTORIA CLÍNICA			
1. DATOS DEL PACIENTE.			
NOMBRE:			
NO. EXPEDIENTE:	CLAVE:	SEXO: 0 (M) <input type="checkbox"/> 1 (F) <input type="checkbox"/>	
EDAD MADRE:	EDAD PADRE:		
DIRECCIÓN:			
TELÉFONO:		TELÉFONO MÓVIL:	
CORREO ELECTRÓNICO:			
FECHA DE NACIMIENTO:		EDAD(años/meses):	
2. ARBOL GENEALÓGICO.			
3. ANTECEDENTES PRENATALES.			
G:	P:	C:	A:
En caso de abortos, especificar:			
<input type="checkbox"/> Ultrasonidos anormales. Especificar:			
<input type="checkbox"/> Hipomovilidad fetal	<input type="checkbox"/> Oligohidramnios	<input type="checkbox"/> Polihidramnios	
<input type="checkbox"/> Infecciones maternas. Especificar:			
<input type="checkbox"/> Diabetes Mellitus materna	<input type="checkbox"/> Hipertensión materna	<input type="checkbox"/> Otras:	
4. ANTECEDENTES PERINATALES.			
<input type="checkbox"/> Parto vaginal	<input type="checkbox"/> Parto abdominal	Presentación:	
Indicación de la cesárea:			

