

11216

3

2e)



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA

División de Estudios de Posgrado e Investigación

SECRETARÍA DE SALUD
ESCUELA DE PEDIATRIA
DEPARTAMENTO DE

SECRETARIA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

DETERMINACION DEL ORIGEN DE CROMOSOMAS SEXUALES MARCADORES MEDIANTE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

T E S I S

Que para obtener el Título de:

ESPECIALISTA EN GENETICA MEDICA

p r e s e n t a

DRA. ARIADNA ESTELA GONZALEZ DEL ANGEL



INP

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Febrero 1994



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 está 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.



DR. HECTOR FERNANDEZ VARELA
DIRECTOR GENERAL



DR. RIGOBERTO MARTINEZ
SUBDIRECTOR GENERAL
DE ENSEÑANZA



DR. LUIS HESHIKI NAKANDAKARI
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE
ENSEÑANZA DE PRE Y POSGRADO



BIOL. BEATRIZ BLANCO
TUTOR DE TESIS



DRA. ALESSANDRA CARNEVALE
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

Con gran admiración y cariño a mis padres Roberto González y Estela del Angel por su apoyo, amor y enseñanza en mi formación como persona y profesionista.

A mis hermanos Ricardo, Roberto y Raziél por el cariño y apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A las Dras. Victoria del Castillo y Alessandra Carnevale por compartir sus conocimientos y su gran interés en mi formación académica.

A la Biol. Beatriz Blanco por su guía y participación entusiasta en la realización de este trabajo.

A Sara Frias, Laura Gómez, Bertha Molina, Lorena Orozco, Patricia Pérez y Hortencia Valdéz por su enseñanza y amistad.

**DETERMINACION DEL ORIGEN DE CROMOSOMAS SEXUALES MARCADORES
MEDIANTE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH).**

Ariadna González-del Angel, Beatriz Blanco, Victoria del Castillo, Alessandra Carnevale.
Departamento de Investigación en Genética Humana. Instituto Nacional de Pediatría. Secretaria de Salud. México, D.F. México.

RESUMEN: Del 6 al 15% de los casos con síndrome de Turner presentan un cariotipo en mosaico con una línea 45,X y otra con un pequeño cromosoma sexual marcador de origen no determinado que puede ser un anillo o un fragmento céntrico. La identificación de su origen que frecuentemente se dificulta por la falta de resolución de las técnicas citogenéticas y la variabilidad en el fenotipo clínico, es de vital importancia ya que si provienen de un cromosoma Y, el paciente tiene un riesgo elevado de desarrollar gonadoblastoma.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el origen de pequeños cromosomas sexuales marcadores mediante "hibridación in situ con fluorescencia" (FISH). Se estudiaron 8 pacientes; siete mostraban un fenotipo Turner con genitales externos femeninos y la octava tenía talla baja con ambigüedad de genitales. En todos los casos, se identificó en el cariotipo de sangre periférica un mosaico, con una línea celular que presentaba un cromosoma sexual marcador y en tres se corroboró el mosaico en fibroblastos. Para la técnica de FISH se utilizaron sondas de DNA marcadas con biotina, con secuencias complementarias a la región centromérica alfa satélite de los cromosomas X y Y. Con la sonda alfa satélite del X se estableció que el cromosoma marcador provenía del X en siete pacientes. En la paciente con genitales ambiguos se determinó que el marcador derivaba de un cromosoma Y. Podemos concluir que la técnica de FISH es altamente confiable para identificar el origen de cromosomas sexuales marcadores.

Palabras claves: Síndrome de Turner, mosaico cromosómico, cromosoma marcador, cromosoma X, cromosoma Y, FISH.

**ORIGIN IDENTIFICATION OF SEX CHROMOSOME MARKERS WITH
FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH).**

Abstract: Between 6 and 15% of patients with Turner syndrome have a mosaic karyotype, with one 45,X cell line and another with a small sex chromosome marker of undetermined origin which may be a ring or a centric fragment. The identification of the origin of this marker chromosome is often difficult to achieve because of phenotype variability and since poor resolution is obtained with classical cytogenetic techniques. However, it is crucial because the presence of a Y derived chromosome marker implies the patient has a high risk of developing gonadoblastoma.

The objective of the present paper was to identify the origin of small sex chromosome markers using fluorescence in situ hybridization (FISH). Eight patients were studied; seven had a Turner phenotype and the eight had short stature with ambiguous genitalia. In all cases karyotype in peripheral lymphocytes showed mosaicism, with one cell line that had a sex chromosome marker and in three cases mosaicism was corroborated in fibroblast cultures. Biotin labeled DNA probes with complementary centromeric alpha-satellite sequences of chromosomes X and Y were used for the FISH technique. In seven patients the chromosome marker came from the X chromosome as established with the X chromosome alpha-satellite probe. In the patient with ambiguous genitalia, the marker derived from the Y chromosome. We conclude that the FISH technique is highly confident to establish the origin of sex chromosome markers.

Key words: Turner syndrome, mosaicism, marker chromosome, X chromosome, Y chromosome, FISH.

INTRODUCCION:

Las pacientes con síndrome de Turner se presentan con una frecuencia de 1 por cada 2,500 a 3,000 niñas recién nacidas y se menciona que representan una quinta parte de los abortos del primer trimestre.

Dentro de las características clínicas de este síndrome se encuentra peso bajo al nacer (2,933 g) así como retardo en el desarrollo con una talla baja final que oscila entre 135 a 150cm. Dentro de las alteraciones somáticas que se observan en este síndrome se encuentran:

A) CRANEOFACIALES

epicanto
paladar alto
anomalías dentarias, visuales y auditivas.

B) CUELLO

ptorigium colli
cuello corto con implantación baja del cabello

C) TORAX

teletelia
tórax ancho

D) CARDIOVASCULARES

coartación de la aorta
defectos del tabique interventricular

E) RENAL

rifones en herradura
duplicación o alteración de ureteros
aplasia o hipoplasia unilateral renal

F) PIEL Y LINFATICOS

nevus pigmentados
linfedema de manos y pies

G) UÑAS

hipoplasia o displasia de uñas

H) ESQUELETICO

cubitus valgo
acortamiento del cuarto metacarpiano
deformidad del cóndilo medial de la tibia
osteoporosis

Los ovarios de los individuos con síndrome de Turner presentan folículos primordiales durante la vida prenatal y al nacimiento, sin embargo sufren un proceso de degeneración siendo reemplazados por estrias gonadales que carecen de folículos por lo cual no se presenta la menarquia y las pacientes son estériles. Por la falla ovárica las pacientes tienen una producción de estrógenos disminuida, la excreción de gonadotropinas es muy alta y las características sexuales secundarias se mantienen infantiles.

Existe una minoría (5-10%) que presenta menarquia espontánea que continúa con menstruaciones en ocasiones irregulares para terminar en una menopausia temprana. Se han reportado casos de mujeres con síndrome de Turner que se han reproducido, siendo los hijos clínica y cromosómicamente normales.

La mayoría de los individuos con síndrome de Turner tiene una inteligencia normal sin embargo se refiere una personalidad inmadura con un comportamiento infantil, en algunos casos pueden existir problemas psicológicos durante la adolescencia por la falta de desarrollo sexual secundario.

De las enfermedades sistémicas que se ven con mayor frecuencia en estas pacientes esta la tiroiditis autoinmune así como hipertensión arterial de etiología desconocida ya que aparentemente no se relaciona con anomalías renales.

La causa más frecuente del síndrome de Turner es una aberración cromosómica que en el 40-60% de los casos se caracteriza por un complemento cromosómico 45,X; en menor porcentaje las pacientes presentan cariotipos: 46,X,i(Xq); 46,X,del(Xp); 46,X,del(Xq); 46,X,r(X); 46,X,i(Xp). El fenotipo Turner también puede originarse por mosaicismos siendo las variedades más frecuentes: 45,X/46,XX; 45,X/47,XXX; 45,X/46,XY.

En el 6 al 15% de las pacientes con síndrome de Turner el cariotipo muestra una línea celular 45,X y otra con un pequeño cromosoma marcador que puede ser un anillo o un fragmento céntrico (45,X/46,X+mar).

Se han realizado varios intentos para tratar de correlacionar el fenotipo con el cariotipo (1), pero la interpretación de los hallazgos se dificulta por varios factores como es la presencia frecuente de la línea celular 45/X en pacientes con rearrreglos estructurales del X, la inactivación preferente por el cromosoma X estructuralmente anormal, así como el porcentaje de células normales en los diferentes tejidos.

Existe otro grupo de pacientes con mosaicismos cromosómicos 45,X/46,XY, que pueden manifestar una variedad de fenotipos clínicos los cuales van desde un hombre casi normal con criptorquidia o hipospadias, ambigüedad de genitales o hasta un fenotipo femenino indistinguible de las pacientes con síndrome de Turner. (2). Este tipo de fenotipos también se pueden presentar, en los casos en que se presente un mosaico 45,X/línea celular con alteración del Y, incluyendo anillos o fragmentos céntricos. La diversidad en los fenotipos probablemente reflejan la diferente distribución en los tejidos de las líneas celulares.

Cuando en pacientes fenotípicamente mujeres con o sin características del síndrome de Turner se presenta un cariotipo 45,X/46,X+marcador, no se puede saber si el pequeño marcador cromosómico deriva ya sea de un cromosoma X o de un cromosoma Y, y se supone que dicho marcador se pierde en la línea celular 45,X. Si el mismo cariotipo se presenta en pacientes con genitales masculinos o ambiguos, se puede asumir que el marcador se origina del cromosoma Y. (3,4)

Determinar el origen del marcador en este tipo de pacientes es crucial ya que si el marcador tiene su origen en el cromosoma Y, se asocia a un riesgo de 15 a 30% de desarrollo de gonadoblastoma (5). La edad de ocurrencia es variable, pero se han descrito casos desde los 6 años de edad, es por ello que en estos pacientes generalmente se recomienda una gonadectomía profiláctica.

Han existido múltiples intentos para identificar el origen de estos marcadores utilizando técnicas citogenéticas de rutina (bandas G, R, Q y C) sin obtenerse resultados satisfactorios. En algunos casos, la presencia de un marcador cromosómico fluorescente con bandas Q puede sugerir que deriva del Y, sin embargo no todos los marcadores que tienen su origen en el cromosoma Y fluorescen debido a que carecen de la región heterocromática Yq. (6).

Hace algunos años se utilizó la técnica de Giemsa 11, la cual produce una tinción oscura en la región adyacente al centromero en el cromosoma Y; sin embargo es una técnica difícil de obtener y frecuentemente no es informativa. (7,8).

Un avance extraordinario en la citogenética ha sido la introducción de la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) para el estudio molecular de los cromosomas. Esta nueva metodología es aplicable en cromosomas en metafase o en células en interfase.

Esta técnica utiliza secuencias de DNA o RNA complementarias para una región de un cromosoma y funcionan como sondas al marcarse con una molécula reportera (Biotina, digoxigenina, dinitrofenol, aminoacetilfluoreno, mercurio o sulfonato).

La sonda y el material cromosómico previamente desnaturalizados, hibridan, formando una señal fluorescente observable en el microscopio de fluorescencia; para las sondas marcadas con Biotina se utiliza como fluorocromo avidina conjugada o anticuerpos anti-biotina.

Hasta el momento existen sondas que hibridan específicamente con un cromosoma completo, con ciertas regiones cromosómicas tales como centrómeros o telómeros y con aquellas que determinan una secuencia génica única.

Estas técnicas están revolucionando la citogenética actual ya que permiten conocer con precisión el origen y estructura de cromosomas anormales.

En los pacientes con mosaico 45,X/46,X+mar, el método de FISH ha permitido establecer certeramente el origen de cromosomas sexuales marcadores utilizando sondas de DNA complementarias a la región centromérica alfa satélite del cromosoma X y del cromosoma Y. (3,4,9,10,11)

Estos avances representan una ayuda diagnóstica que además de permitir al genetista clínico, correlacionar el fenotipo de los pacientes le permite establecer la conducta a seguir en forma oportuna.

JUSTIFICACION: En el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Pediatría se estudiaron 8 casos de 1986 a la fecha con fenotipo Turner o con ambigüedad de genitales que presentaban citogenéticamente un mosaico (45,X/64,X+mar) con un marcador (fragmento céntrico o anillo) cuyo origen se desconocía siendo importante determinarlo por el riesgo de desarrollo de neoplasia en caso de que proviniera del cromosoma Y; recientemente en dicho departamento se implementó la técnica de Hibridación in situ con Fluorescencia (FISH) que permite establecer certeramente el origen de estos marcadores.

OBJETIVO: Determinar el origen cromosómico y la estructura de cromosomas marcadores que se observan en pacientes con un mosaico 45,X/46X+marcador en linfocitos de sangre periférica y en fibroblastos a través de la técnica de FISH y su correlación con el fenotipo clínico.

HIPOTESIS: La técnica de FISH permite identificar el origen cromosómico del marcador en pacientes con mosaico 45,X/46,X+marcador y correlacionarlo con el fenotipo clínico del paciente.

POBLACION EN ESTUDIO:

INCLUSION: Se incluyeron pacientes previamente estudiados citogenéticamente en el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Pediatría de 1989 a 1993, cuyo cariotipo de sangre periférica mostró un mosaico 45X/46X+marcador.

EXCLUSION: Se excluyeron aquellos pacientes en quienes se requería una muestra de sangre periférica y/o de piel para realizar FISH y que no aceptaron cooperar para la toma de la misma.

METODOLOGIA:

- 1.- Se localizó a los pacientes a través de los registros del servicio de Genética y del laboratorio de citogenética del Instituto Nacional de Pediatría.
- 2.- Se registraron las variables clínicas y de laboratorio en las hojas de captación de datos.
- 3.- SIEMBRA Y CULTIVO DE LINFOCITOS.

Se obtuvieron 3ml. de sangre periférica con una jeringa estéril con heparina en cada paciente para cultivo de linfocitos.

- a) Se sembraron en frascos estériles 0.4 ml. de sangre en 4.5 ml. de medio McCoy 5a modificado con 0.25ml de fitohemaglutinina y dos gotas de antibiótico (penicilina-estreptomycin) y se incubaron durante 72 horas a 37°C.
- b) Se cosecharon de acuerdo a la técnica habitual del laboratorio y se prepararon las laminillas.

4.- SIEMBRA Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS.

Para determinar la presencia del cromosoma marcador en otros tejidos se realizó biopsia de piel con un sacabocado de 4mm de diámetro previa asepsia y antiseptia de la zona.

- a) Se sembraron los explantes en cajas de cultivo con medio Gibco suplementado con Glutamina y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 15 días.
- b) Cuando las células eran confluentes se procedió a subcultivarlas en 6 cubreobjetos cada uno colocado en una caja de Petri.
- c) A las 72 horas se realizó la cosecha in situ siguiendo los mismos pasos que en linfocitos.

5.- TINCIONES.

Para identificar a los cromosomas de acuerdo a su patrón de bandas específico se tificaron los cromosomas con Giemsa (bandas G); y para identificar la región heterocromática del brazo largo del cromosoma Y se realizó bandas Q y C de acuerdo a la metodología habitual del laboratorio.

6.- HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

Se realizó FISH en cromosomas en metafase utilizando los reactivos comerciales y la metodología propuesta por el laboratorio de Oncor.

- a) Tratamiento con RNasa: se incubaron con una solución de RNasa a 37°C por una hora en un baño de agua.
- b) Deshidratación: Se deshidrataron las laminillas en tres series de etanol frío: 70%, 80% y 95%, por dos minutos cada uno. Se secaron las laminillas con aire.
- c) Desnaturalización: Se precalentaron las laminillas a 37°C, posteriormente se colocaron en un vaso Coplin con solución desnaturalizante durante 2 minutos a 70°C y con agitación periódica. Inmediatamente se transfirieron a un vaso Coplin con etanol frío al 70% por dos minutos y sucesivamente en vasos Coplin con etanol frío al 80%, 90% y 100%.
- d) Hibridación: Las laminillas se precalentaron a 37°C. Se realizó una laminilla por paciente utilizandose 1.5 microlitros (mcl) de la sonda específica (10ng/mcl) en cada una de ellas; en todas las pacientes se realizó FISH con la sonda complementaria a la región centromérica alfa satélite del cromosoma X y en caso de un resultado negativo se realizó una segunda laminilla a la que se le aplicó la sonda de DNA alfa satélite del cromosoma Y. Ambas sondas fueron marcadas con biotina, la sonda se resuspendió en 30 microlitros de Hibrisol VI en un tubo de microcentrifuga de .5 ml.

La sonda se desnaturalizó al colocar el tubo en un baño a 70°C por 5 minutos, posteriormente se paso a un baño frío de 4°C, y se centrifugó de 2 a 3 segundos para recolectar el contenido en el fondo del tubo.

De la mezcla de hibridación se aplicaron 30 mcl en cada laminilla y se colocó un cubreobjetos con sellador, se incubaron a 37°C durante 4 a 16 horas en una cámara húmeda.

- e) Post-lavado: se retiró la capa del sellador, y se lavaron las laminillas en un vaso de coplin con 40 ml de Solución Postlavado a 43°C con agitación constante por 20 minutos. Posteriormente se lavaron las laminillas dos veces en 40 ml de 2x SSC a 37°C por cuatro minutos cada lavado. Durante este paso se podían guardar las laminillas en 1X PBD a 4°C por dos semanas antes de la detección.
- f) Detección: Se retiraron las laminillas del 1X PBD. Se aplicaron 60 mcl de Agente Bloqueador Uno en cada laminilla. Se colocó un cubreobjetos de plástico y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicó 60 mcl de Avidina marcada con Fluoresceína en cada laminilla y se incubaron durante 20 minutos en una cámara húmeda a 37°C. Posteriormente se lavaron 3 veces en 40 ml. de 1X PBD por dos minutos cada lavado a temperatura ambiente.
- g) Amplificación: Se aplicaron 60 mcl de Agente Bloqueador Dos a cada laminilla, se colocó un cubreobjetos de plástico y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, se retiró el cubreobjetos para posteriormente aplicar 60 mcl. de Anticuerpo Anti-Avidina a cada laminilla, se colocó un cubreobjetos nuevo y se incubó por 20 minutos en una cámara húmeda a 37°C.

Se lavaron las laminillas en 1X PBD tres veces a temperatura ambiente, se aplicaron 60mcl. de Agente Bloqueador Uno a cada laminilla se colocó un cubreobjetos y se dejo incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente se retiró el cubreobjetos y se aplicó 60mcl. de Avidina marcada con Fluoresceína se colocó un cubreobjetos nuevo y se incubó por 20 minutos a 37°C en una cámara húmeda.

Por último se lavaron tres veces en 1X PBD a temperatura ambiente.

- h) Tinción de los cromosomas: Se tificaron los cromosomas agregando 18 mcl de yoduro de propidio a cada laminilla y se observó al microscopio la señal fluorescente.
- i) En cada paciente se analizaron 25 metafases en la laminilla tratada con la sonda complementaria a la región centromérica alfa satélite del X así como en el caso en que se requirió una segunda laminilla tratada con la sonda para la región centromérica alfa satélite del Y.

Si el marcador derivaba de un cromosoma X, en las laminillas en donde se utilizó la sonda complementaria a la región centromérica alfa satélite del cromosoma X se observaron dos señales: una señal en el centrómero del cromosoma X normal y otra en el centrómero del marcador; cuando el cromosoma derivaba de un cromosoma Y sólo se observó la señal del cromosoma X normal; en este caso cuando una segunda laminilla fue tratada con la sonda complementaria para la región centromérica alfa satélite del Y se observó sólo una señal positiva sobre el centrómero del cromosoma sexual marcador.

RESULTADOS:

HALLAZGOS CLINICOS

Se estudiaron 8 pacientes que acudieron a la consulta del servicio de Genética hasta octubre de 1993.

Las edades fluctuaron de 4 meses hasta los 13 años 11 meses.

Los hallazgos a la exploración física se presentan en la tabla 1. En 7 casos las características clínicas eran compatibles con síndrome de Turner (Fig. 1). Cabe señalar que 6 de estas pacientes presentaban talla y peso bajo, mientras que 7 tenían cubitus valgo.

El resto de las manifestaciones clínicas se observaron en forma variable.

El caso 8 a la exploración física no presentaba fenotipo Turner excepto por la presencia de talla baja.

Ninguno de los 8 casos presentó cardiopatía, linfedema de manos y pies al nacimiento o pterigium colli

Una paciente (Num. 7) presentaba un organo dentario supernumerario en el maxilar superior.

No se encontraron alteraciones visuales excepto en el caso 3 que presentaba ametropia.

Cuatro pacientes tenían alteraciones en la posición o forma de los pabellones auriculares, pero sólo una paciente (caso 6) tenía historia de otitis frecuentes y requirió la colocación de tubos de ventilación.

La paciente 5, presentó alteraciones en la pigmentación de la piel en forma generalizada compatibles con una Hipomelanosis de Ito.

Dos de los casos (5 y 7), requirieron apoyo psicopedagógico por mal aprovechamiento escolar en el primero y por un rendimiento escolar regular y alteraciones del lenguaje en el segundo. La paciente 4 a los 2 años 6 meses presentó un coeficiente global de retraso de 28%, una segunda valoración a los 3 años 4 meses reportó un retraso del 7%, sin que hubiera problemas de aprendizaje. Los otros 4 casos presentaron un desarrollo psicomotor normal.

GENITALES EXTERNOS

Las pacientes 1 a 7 tenían genitales externos femeninos (tabla 1), sin características sexuales secundarias; el caso 8 fue el único que presentaba ambigüedad de genitales caracterizada por la presencia de un falo de aproximadamente 2 cm., con un orificio uretral en la base del mismo. En la región inguinal izquierda se palpaba una estructura probablemente gonadal de forma ovoide mientras que en la región inguinal derecha no se palpó gónada; además existía fusión y escrotalización de labios.

ESTUDIOS DE GABINETE.

Los hallazgos se muestran en la tabla 2.

La edad ósea se encontró retrasada en todos los casos.

Las radiografías de huesos largos mostraron osteoporosis importante en dos casos. (Núm. 1 y 5)

Por urografía excretora se detectaron anomalías renales en dos de las pacientes (Núm. 4 y 8), la primera por falta de rotación de ambos riñones con pelvis izquierda extrarrenal; en la segunda se encontró un doble sistema pielocalicial izquierdo.

A todas las pacientes se les realizó un ultrasonido pélvico; en los casos 1 a 6 se visualizó un utero hipoplásico sin evidencia de gónadas, y en el caso 7 se reportó un utero hipoplásico con presencia de unas estructuras probablemente gonadales en región pélvica. En el caso 8 con ambigüedad de genitales el ultrasonido pélvico evidenció una probable estructura uterina sin la presencia de gónadas.

ESTUDIO CITOGENETICO EN LINFOCITOS.

En los cultivos de linfocitos de sangre periférica se analizaron 100 células con bandas G excepto en el caso 6 donde sólo se analizaron 22 metafases (tabla 3); en todas las pacientes se encontró un mosaico con la presencia de una línea con un cromosoma sexual marcador (Fig. 2) el cual tenía la morfología de un anillo en todos los casos con un tamaño variable; el porcentaje de la línea 46,X+mar varió desde un 10 hasta un 77%.

En el caso 2 con un cariotipo 45,X/ 46,X+mar, se encontró una célula 46,XX la cual no se volvió a observar en otras 100 células analizadas.

En las pacientes 3 y 5, por el tamaño y por el patrón de bandas se determinó que el marcador era un anillo proveniente del cromosoma X; en el caso 3 los puntos de ruptura se localizaron en p22 y q26, y en el caso 5 en p11.4 y q28; en este último caso previo a este estudio se determinó que el anillo era inactivo por la técnica de replicación tardía del X. En el caso 4 también se había realizado la técnica de replicación tardía del X que mostró que el marcador era inactivo por lo que probablemente provenía de un cromosoma X.

En la paciente 6 se encontró una célula 47, X + 2 marcadores.

En el caso 8 la mayoría de las metafases en linfocitos eran 45,X (89%), el resto mostró 46,X + mar y una célula de 100 tenía un cariotipo 46,XY que no se volvió a observar en el cultivo de fibroblastos. En este caso, tanto las características clínicas como citogenéticas sugerían que el marcador derivaba de un cromosoma Y.

ESTUDIO CITOGENETICO EN FIBROBLASTOS.

En los casos 1, 2 y 8 se realizó estudio citogenético en fibroblastos y se corroboró la presencia de mosaico (tabla 3). En el caso 1 la proporción de las líneas celulares se invirtió en este tejido ya que a diferencia de lo observado en linfocitos el cariotipo más frecuente fue 46, X+mar., mientras que en los casos 2 y 8 la proporción celular se mantuvo.

BANDAS Q, C Y FISH.

Los resultados aparecen en la tabla 3. El estudio citogenético del marcador con bandas Q fue negativo para la región heterocromática del brazo largo del cromosoma Y (Yq) en todos los casos.

Con bandas C se observó que todos los marcadores presentaban sólo una señal lo que indicaba que eran monocéntricos sin evidencia de la región heterocromática Yq.

Al realizar la técnica de Hibridación in situ con Fluorescencia se estableció que los marcadores de 7 pacientes eran anillos que derivaban de un cromosoma X ya que al utilizar la sonda complementaria a la región alfa satélite del cromosoma X, se observaron dos señales fluorescentes una sobre el centromero del cromosoma X normal y otra sobre el marcador. (Fig. 3)

En la paciente 8 con ambigüedad de genitales no se obtuvo señal fluorescente sobre el marcador con la sonda complementaria al X (Fig. 4), pero éste fue positivo con la sonda del Y, lo cual permitió establecer que en este caso el marcador derivaba de un cromosoma Y. Además por las características morfológicas del marcador y por la señal fluorescente obtenida se consideró que se trataba de un anillo. (Fig. 5)

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

A la paciente 8 se le realizó gonadectomía y el estudio histopatológico mostró tejido testicular disgenético en las estrias gonadales además de la presencia de derivados Mullerianos.

DISCUSION.

Mediante los hallazgos clínicos y de citogenética clásica se pudo determinar en 4 de nuestros 8 casos el origen del marcador. En dos (casos 3 y 5) por el patrón de bandas y la morfología del marcador se consideró que derivaban de un cromosoma X, en el caso 4 la técnica de replicación tardía sugirió que el marcador también derivaba de este cromosoma. En el caso 8 por el hallazgo de ambigüedad de genitales y la presencia de una célula XY en linfocitos se consideró que el marcador derivaba de un cromosoma Y.

Las técnicas citogenéticas clásicas (bandas G,C,Q y replicación tardía) son de gran utilidad diagnóstica, sin embargo en algunos casos no es posible determinar con certeza el origen de pequeños cromosomas sexuales marcadores ya que los resultados no son concluyentes; es en estos casos que el advenimiento de las técnicas de citogenética molecular han sido de gran ayuda ya que en la técnica de FISH se utilizan sondas complementarias específicas a la región centromérica de los cromosomas sexuales lo que permite establecer en todos los casos el origen de los marcadores.

En pacientes con mosaico 45,X/46,X+mar y un fenotipo femenino con o sin manifestaciones clínicas de síndrome de Turner, no se puede establecer si el pequeño cromosoma marcador deriva ya sea de un cromosoma X o de un cromosoma Y, mientras que si el mismo cariotipo se observa en pacientes con genitales masculinos o ambiguos se puede asumir que dicho marcador derivó de un cromosoma Y, como se corroboró en la paciente 8.

En las siete pacientes de este estudio con fenotipo Turner, se demostró por FISH que el pequeño marcador se originó de un cromosoma X; a pesar de ello es importante realizar en forma rutinaria en este tipo de pacientes dicha metodología para evaluar en forma rápida el riesgo de gonadoblastoma, ya que en otros reportes se ha observado que la mayoría de los marcadores de pacientes con estigmas de síndrome de Turner derivan de un cromosoma Y. (10)

En los casos con mosaicos como los aquí estudiados, se ha descrito una mayor frecuencia de retraso mental, convulsiones, estrabismo, infecciones de oído, displasia pigmentaria y una talla más baja que en las pacientes con cariotipo 45,X. Las dismorfias faciales (similares al síndrome de Kabuki) más frecuentes en este grupo de pacientes son hipertelorismo, nariz ancha, narinas antevertidas y fisuras palpebrales largas. Otros hallazgos en estas pacientes son zonas de hipo o hiperpigmentación de la piel que semejan incontinencia pigmenti o hipomelanosis de Ito. (12, 13)

Se postula que este fenotipo más severo se debe a que los pequeños cromosomas sexuales marcadores (menores a los del grupo F), pierden el gen de inactivación XIST localizado en Xq13, y permanecen activos al igual que el cromosoma X normal. Esta hipótesis no se ha comprobado porque se han reportado pacientes con pequeños anillos del cromosoma Y en mosaico que presentan el mismo fenotipo, otros en los cuales por medio de replicación tardía se observa que el cromosoma marcador derivado de un X es inactivo y por último reportes en donde se observa expresión del gen XIST.

Ante estas contradicciones se ha sugerido que el síndrome sea un efecto no específico del mosaicismo de una línea celular letal o casi letal por lo que es necesario continuar realizando estudios del fenotipo de pacientes con anillos del X o del Y así como caracterización molecular de los mismos ya que la existencia de este síndrome tiene implicaciones en el asesoramiento genético.

En nuestra casuística la paciente 4 con retraso psicomotor leve presentaba algunas dismorfias similares al síndrome de Kabuki, su marcador era un pequeño anillo del cromosoma X (más pequeño que un F) que por la técnica de replicación tardía se identificó que era inactivo como los casos reportados por De Grouchy, Grompe y Dyke. (12 y 13)

En relación a las otras dos pacientes con alteraciones en el desarrollo psicomotor, el caso 5 presentaba problemas de aprendizaje y alteraciones pigmentarias de la piel compatibles con Hipomelanosis de Ito sin dismorfias faciales similares al síndrome de Kabuki. Los puntos de ruptura del anillo del X se localizaron en p11.4 y q28, también en este caso el estudio de replicación tardía mostró que el anillo era inactivo.

En la paciente 7 con problemas de aprendizaje y alteraciones del lenguaje no se observaron alteraciones en la pigmentación de la piel ni dismorfias faciales similares a Kabuki; en este caso no se realizó estudio de replicación tardía.

A través de los hallazgos clínicos así como los de la citogenética clásica y molecular se estableció el origen de los cromosomas marcadores en todas nuestras pacientes. Debido al riesgo de desarrollo de gonadoblastoma ante la presencia de un cromosoma Y o un marcador derivado de este, se realizó gonadectomía en un caso mientras que en las otras 7 pacientes el riesgo es muy bajo y no se requirió un manejo quirúrgico.

En las pacientes 1 y 2 de 13 y 14 años respectivamente, aún no inician terapia con hormonales ya que se desean manejar con hormona de crecimiento previamente.

El caso 3 que presentó un anillo del X grande, a la edad de 13 años 5 meses presentó en forma espontánea menarquia y actualmente esta recibiendo manejo por presentar ciclos menstruales irregulares.

CONCLUSION.

El advenimiento de las técnicas citogenéticas moleculares como la Hibridación in situ con Fluorescencia, aunado a los hallazgos clínicos y citogenéticos clásicos permiten actualmente al Genetista Clínico establecer en forma certera el origen de pequeños cromosomas sexuales marcadores, lo que se refleja en un asesoramiento más exacto así como un manejo oportuno.

TABLA 1
CARACTERISTICAS CLINICAS

PACIENTE	1	2	3	4	5	6	7	8
Edad	13a11m	14a	10a4m	6a	5a	12a6m	5a3m	4m
Desarrollo psicomotor	NI	NI	NI	Anl	Anl	NI	Anl	NI
Peso	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	NI	Bajo	Bajo
Talla	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	NI	Baja	Baja
Epicanto	-	-	-	x	-	-	-	x
Paladar alto	x	x	x	-	x	x	-	-
Alt. dental	-	-	-	-	-	-	x	-
Alt. visual	-	-	x	-	-	-	-	-
Alt. auditiva	-	x	x	x	-	x	x	-
Pterigium	-	-	-	-	-	-	-	-
Cuello corto	x	-	-	x	x	x	x	-
Implantación baja cabello	x	-	x	-	-	x	-	-
Teletelia	-	x	x	x	x	x	x	-
Tórax ancho	-	x	-	x	x	-	-	-
Alt cardiaca	-	-	-	-	-	-	-	-
Nevos	x	x	x	-	-	x	x	-
Linfedema	-	-	-	-	-	-	-	-
Alt. uñas	-	-	-	-	-	-	-	-
Cubitus valgo	x	x	x	x	x	x	x	-
Acortamiento 4to. metacarp	-	x	-	-	x	-	x	-
H. de Ito	-	-	-	-	x	-	-	-

NI = Normal
Alt. = Alteración

Anl = Anormal

H. de Ito = Hipomelanosis de Ito

x = Positivo



FIGURA 1.- Paciente con síndrome de Turner en mosaico.

TABLA 2

ESTUDIOS DE GABINETE

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Edad ósea retrasada.	x	x	x	x	x	x	x	x
Osteoporosis	x	-	-	-	x	-	-	-
Alteración renal por U.E. o U.S.	-	-	-	x	-	-	-	x
Utero hipoplásico por U.S. pélvico.	x	x	x	x	x	x	x	?
Probables gónadas por U.S. pélvico.	-	-	-	-	-	-	x	-

U.E. Urografía excretora
x Positivo

- Negativo

U.S. Ultrasonido
? Probable

TABLA 3
ESTUDIO CITOGENETICO

BANDAS G								
Porcentaje de líneas celulares.								
Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8
Linfocitos	%	%	%	%	%	%	%	%
45,X	71	83	73	23	64	40	41	89
46,X+mar	29	16	27	77	36	55	59	10
Otros		1				5		1
Fibroblastos								
45,X	15	83						78
46,X+mar	85	17	NA	NA	NA	NA	NA	22
BANDAS Q, C Y FISH.								
Bandas Q	-	-	-	-	-	-	-	-
Bandas C	MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC	MC
FISH X	x	x	x	x	x	x	x	-
FISH Y	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	x

X Positivo
MC Monocéntrico

- Negativo
NA No analizado

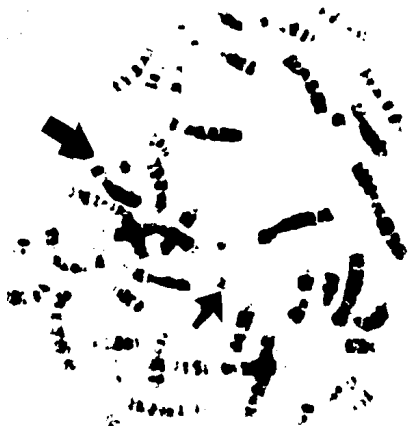


FIGURA 2.- Metafase con bandas G, se observa el cromosoma X normal (flecha grande); y el cromosoma sexual marcador (flecha chica).

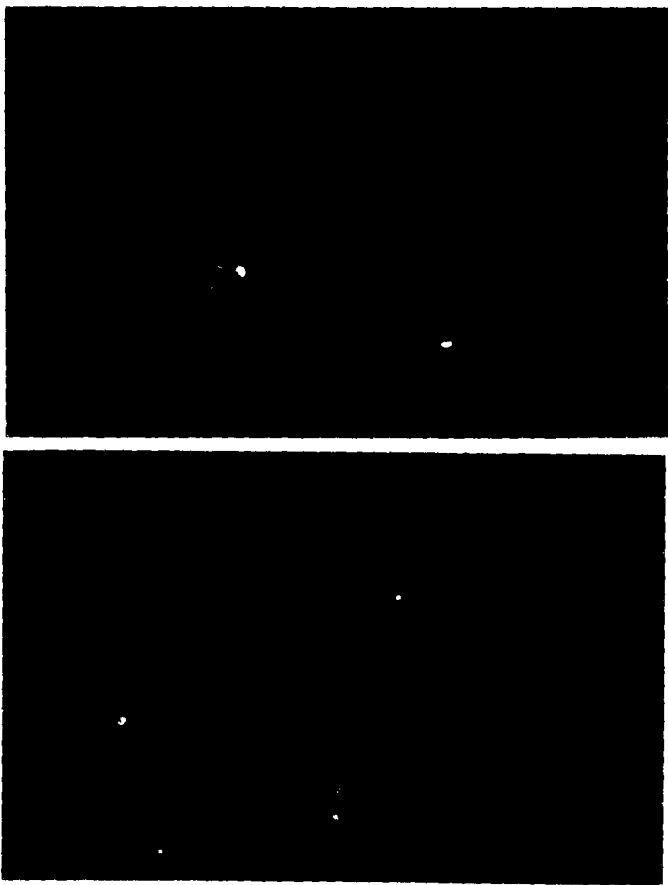


FIGURA 3.- FISH con sonda complementaria al centr6mero del cromosoma X. Fluorescencia positiva tanto en el cromosoma X normal (flecha grande) como en el cromosoma sexual marcador (flecha chica).



FIGURA 4.- FISH con sonda complementaria al centrómero del cromosoma X. En el caso 8, se observa fluorescencia en el cromosoma X normal (flecha grande), mientras que el cromosoma sexual marcador no fluoresce (flecha chica).

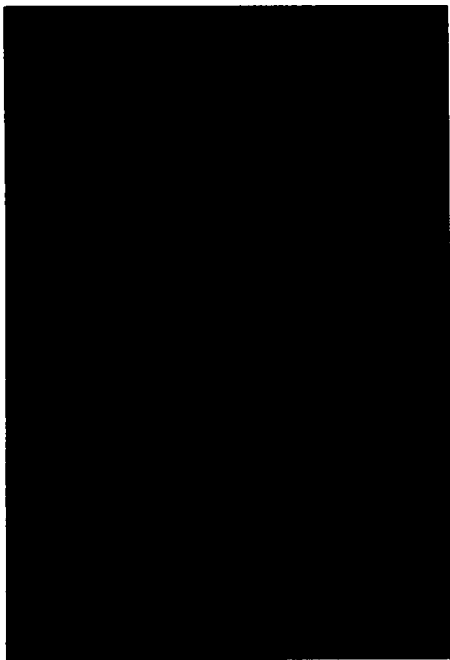


FIGURA 5.- FISH con sonda complementaria al centrómero del cromosoma Y. En el caso 8, presencia de una señal fluorescente sobre el cromosoma sexual marcador (flecha).

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Fergurson-Smith (1965) Karyotype-phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations. *J Med Genet* 2: 142-155.
- 2) Simpson JL, Photopulos G (1976) The relationship of neoplasia to disorders of abnormal sexual differentiation. *Birth Defects (vol XII)* 1:15-50.
- 3) Speleman F (1990) Identification and characterization of normal length nonfluorescent Y chromosomes: cytogenetic analysis, Southern hybridization and non-isotopic in situ hybridization. *Hum Genet* 85: 569-575.
- 4) Lin C C (1990) Determining the origins and the structural aberrations of small marker chromosomes in two cases of 45,X/46,X,+mar by use of chromosome specific DNA probes. *Am J Med Genet* 37:71-78.
- 5) Scully RE (1970) Gonadoblastoma: a review of 74 cases. *Cancer* 25: 1340-1356.
- 6) Caspersson T, Hultén M, Jonasson J, Lindsten J, Tharkelsen A, Zechh I. (1971) Translocation causing non-fluorescent Y chromosomes in human X0/XY mosaics. *Hereditas* 68:317-324.
- 7) Almeida JCC, Llerena JC Jr, Molina Gomes D, Rita Martins R, Jung M, Reis DF, Cunha AG (1985) G-11 staining in Turner's syndrome with mos 45,X/46,X,r(?). *Ann Génét (Paris)* 28:37-41.
- 8) Wyandt HE, Wysham DG, Minden SK, Anderson SR, Hecht F (1976) Mechanisms of Giemsa banding of chromosomes. I. Giemsa 11 banding with azure and eosin. *Exp Cell Res* 102:85-94.
- 9) Crolla JA, Llerena JC (1988) A mosaic 45,X/46,X,r(?) karyotype investigated with X and Y centromere-specific probes using a non-autoradiographic in situ hybridization technique. *Hum Genet* 81: 81-84.

- 10) Nagafuchi S et al. (1992) The majority of the marker chromosomes in Japanese patients with stigmata of Turner syndrome are derived from Y chromosomes. Hum Genet 89:590-592.
- 11) Lindgren V et al. (1992) Cytogenetic and molecular characterization of marker chromosomes in patients with mosaic 45,X karyotypes. Hum Genet 88:393-398.
- 12) Dennis N R et al. (1993) Three patients with ring (X) chromosomes and severe phenotype. J Med Genet 30:482-6.
- 13) Grompe M et al. (1992) 45,X/46,X+ r(X) Can have a distinct phenotype different from Ullrich-Turner Syndrome. Am J Med Genet 42: 39-43.