

11296

1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

"DETECCION DE SECUANCIAS ESPECIFICAS DEL CROMOSOMA Y EN PACIENTES 45,X Y EN MOSAICOS CON UNA SEGUNDA LINEA CELULAR CON UN Y NORMAL O ANORMAL".

SECRETARIA DE SALUD

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

ORGANISMO DESCENTRALIZADO



DIRECCION DE ENSEÑANZA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO ESPECIALISTA EN GENETICA MEDICA

PRESENTA:

MONICA AGUINAGA RIOS



MEXICO, D. F. Unidad de Servicios Escolares MARZO, 2000
CARC. de (Posgrado)

277563



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.

**“DETECCION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DEL CROMOSOMA Y EN
PACIENTES 45,X Y EN MOSAICOS CON UNA SEGUNDA LINEA CELULAR CON
UN Y NORMAL O ANORMAL”**



DRA.SUSANA KOFMAN-ALFARO

**JEFE DEL SERVICIO DE GENETICA. HOSPITAL GENERAL DE MEXICO.
PROFESOR TITULAR DEL CURSO
TUTOR DE TESIS**

M. EN C.MARISOL LOPEZ LOPEZ

**PROFESOR TITULAR C
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLOGICOS
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA- XOCHIMILCO**

**ESTA TESIS FUE REGISTRADA Y REVISADA
POR LA UNIDAD DE EPIDEMIOLOGIA
DEL HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
CON CLAVE DIC/98/310A/01/009**

INDICE

I. RESUMEN

II. INTRODUCCION

1.0 CROMOSOMAS SEXUALES:

1.1 Antecedentes históricos

1.2 Cromosoma Y

1.3 Cromosoma X

2.0 SINDROME DE TURNER

2.1 Antecedentes

2.2 Aspectos citogenéticos

2.3 Cuadro clínico

2.4 Aspectos moleculares

Genes propuestos para explicar el síndrome de Turner

Genes relacionados específicamente con características clínicas del síndrome de Turner

Genes relacionados con el desarrollo de gonadoblastoma

2.5 Estudios realizados en diferentes poblaciones para determinar la frecuencia de secuencias del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner.

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.0 OBJETIVOS

5.0 MATERIAL Y METODOS

5.1 Estudio citogenético

5.2 Estudio molecular

6.0 RESULTADOS

7.0 DISCUSION

8.0 CONCLUSIONES

9.0 BIBLIOGRAFIA

I. RESUMEN

El síndrome de Turner tiene una frecuencia de 1 en 2,500 nacidas vivas y consiste en: talla baja, infantilismo sexual y anomalías somáticas asociadas. Los estudios citogenéticos revelan que 40 a 60% de las pacientes presentan un cariotipo 45,X; 20 a 35% tienen anomalías estructurales del cromosoma X y el resto son mosaicos con una segunda línea celular con un cromosoma X o Y estructuralmente normal o anormal. Diferentes estudios realizados en pacientes Turner utilizando técnicas moleculares han demostrado una proporción de mosaicos con cromosoma Y de 0 a 61%. La detección de mosaicismo con este cromosoma es importante ya que las pacientes que lo presentan tienen un riesgo de 15 a 20% de desarrollar gonadoblastoma.

En este trabajo se realizó un estudio observacional, descriptivo y transversal en 63 pacientes con fenotipo de síndrome de Turner con cariotipo 45,X ó 45,X/46,X + marcador. Las pacientes fueron captadas en el servicio de Genética del Hospital General de México. Los estudios moleculares revelaron que 4 pacientes con cariotipo 45,X y una paciente con cariotipo 45,X/46,X+mar presentaban secuencias del cromosoma Y, una paciente 45,X/46,XY sirvió como control positivo y en otra con cariotipo 45,X/46,XYqh- se confirmó la existencia de esta segunda línea celular. La frecuencia total de pacientes positivas para secuencias del cromosoma Y en el estudio fue de 8.2%, similar a la de otros estudios realizados. En una paciente 45,X positiva para secuencias del cromosoma Y se observó el desarrollo de tumor gonadal.

Las secuencias del cromosoma Y encontradas en nuestra pacientes son variables por lo que no fue posible correlacionar las características clínicas observadas con la presencia o ausencia de genes específicos, ni sugerir la localización del gen responsable del desarrollo del tumor, ya que la paciente que presentó la neoplasia fue positiva para todas las secuencias estudiadas del cromosoma Y.

Este estudio refuerza la importancia de identificar material proveniente del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner para prevenir el desarrollo de gonadoblastoma.

II. INTRODUCCION

El estudio del proceso de la diferenciación sexual ha llevado al reconocimiento de tres etapas consecutivas:

1. El establecimiento del sexo cromosómico durante la fertilización cuando un espermatozoide aporta un cromosoma X o un Y a un óvulo que sólo aportará un cromosoma X (Kofman-Alfaro et al, 1982; Steinberg y Odel, 1989).

En condiciones normales el cromosoma Y en mamíferos es necesario para dirigir el desarrollo gonadal hacia testículo ya que individuos con un complemento cromosómico 45,X son femeninas y aquéllos con cariotipo 47,XXY son varones, lo que implica la existencia de un factor determinante testicular en el cromosoma Y.

En ausencia de cromosoma Y o en presencia de un sólo cromosoma X, la gónada se desarrolla como ovario (Cooke, 1990).

2. El desarrollo de las gónadas indiferenciadas hacia testículo u ovario (sexo gonadal) y

3. La diferenciación subsecuente de los genitales internos y externos (sexo fenotípico). Por lo tanto, el desarrollo del fenotipo sexual es resultado de una serie de complejas interacciones genéticas, celulares y hormonales (Jost, 1970).

Los cromosomas X y Y se distinguen de los autosomas debido a que difieren entre los sexos y tienen sus propios patrones de herencia; estos cromosomas son estructuralmente diferentes y aparean en forma particular durante la meiosis masculina (Mandel et al, 1992).

Las anomalías cromosómicas numéricas más comunes son las de los cromosomas sexuales con una frecuencia general de 1 en 500 nacimientos, dentro de los cuales se encuentra el síndrome de Turner, el cual en la mayoría de los casos es debido a la ausencia de un cromosoma X (Thompson et al, 1991).

1.0 CROMOSOMAS SEXUALES

1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS:

El primer investigador que estudió los cromosomas sexuales fue Guyer en 1910, quien concluyó que el mecanismo del sexo cromosómico era del tipo XO, y que el número total de cromosomas era 22 en varones y 24 en mujeres, lo cual fue aceptado en ese tiempo (Guyer,1910).

Von Winiwarter en 1912, reconoce 47 cromosomas en espermatogonias humanas en metafase y 24 en espermatoцитos primarios, concluyendo que el número de cromosomas en el humano era de 48 en la mujer y de 47 en el varón y que el mecanismo que determinaba el sexo era la presencia de uno o dos cromosomas X (Von Winiwarter,1912).

Entre 1921 y 1923 Painter trabajando con material testicular, observó el cromosoma Y y dedujo correctamente el mecanismo de determinación sexual XY (Painter,1923). En su primera publicación él favorecía el número diploide de 46, sin embargo, en su trabajo posterior se decidió por 48 cromosomas, idea generalmente aceptada (Painter,1921); en 1924 describió la asociación término-terminal de los cromosomas X y Y (Painter,1924).

En 1937, Koller en un estudio de la conducta de los cromosomas sexuales durante la meiosis, comprueba la presencia de cromosomas X y Y en varones (Koller,1937).

En 1949 se descubre la cromatina sexual cuando Barr y Bertram detectan la presencia de una masa cromatínica en el núcleo de células nerviosas de gatos hembras pero no de machos. Posteriormente la identifican sólo en hembras de varias especies de mamíferos (Barr y Bertram,1949).

Después de varios años de aceptación general de 48 cromosomas en el humano, en 1956, Tjio y Levan anunciaron que el número de cromosomas era 46. Su análisis fue realizado en fibroblastos de embriones humanos y consistentemente observaron el número diploide de 46 (Tjio y Levan,1956). Esto fue confirmado por Ford y Hamerton en 1956, quienes estudiaron material testicular de tres varones, encontrando 23 cromosomas en espermatoцитos (Ford,1973).

Los cromosomas sexuales derivan de un par de cromosomas sexuales homomórficos, con reducción gradual del cromosoma Y en un proceso complejo denominado recientemente la "hipótesis de adición-sustracción" (Graves JAM,1995).

1.2 CROMOSOMA Y

El cromosoma Y es uno de los más pequeños del humano, tiene aproximadamente 60 Mb y corresponde al 1% del contenido total de DNA. Está formado por una región heterocromática y una región eucromática. La región heterocromática está localizada en la porción distal del brazo largo y está compuesta por DNA repetitivo (Cooke et al, 1983). Este DNA satélite es responsable de la variabilidad en el tamaño del cromosoma Y. La región eucromática está localizada en el brazo corto y segmento proximal del brazo largo. Contiene bloques de secuencias homólogas al cromosoma X, familias de secuencias repetidas específicas y genes específicos del cromosoma Y (Cuevas-Covarrubias y Kofman-Alfaro, 1990). En la porción distal de Yp y en Yq se encuentran las regiones pseudoautosómicas (PAR) las cuales recombinan durante la meiosis masculina con las PAR del cromosoma X.

Los genes del cromosoma Y se pueden dividir en:

1. Genes que presentan homólogos en el cromosoma X, dentro de los cuales se encuentran: los genes de la región pseudoautosómica (posteriormente mencionados) y genes fuera de esta región como: ZFY (Page et al, 1987), RPS4Y (Fisher et al, 1990), PRKY (Schiebel et al, 1997), AMELY (Nakahori, 1991), DFFRY (*Drosophila fat facets*), DBY (*Dead-box Y*), UTY (*Ubiquitous TPR*), TB4Y (*Thymosin B-4*), EIF1AY (Factor 1A de iniciación de traducción) (Lahn y Page, 1997) y SMCY (Reijo et al, 1995).
2. Genes específicos del cromosoma Y, los cuales están presentes únicamente en varones y no recombinan durante la meiosis. Estos genes son: SRY (Sinclair et al, 1990), TSPY, RBM (*RNA-binding motif protein*) (Arnemann et al, 1987), DAZ (Reijo et al, 1995), CDY (*chromodomain Y*), BPY1 y BPY2 (*Basic protein Y1 and Y2*), XKRY (*XK related Y*), PRY (*PTP-BL related Y*), TTY1 y TTY2 (*Testis Transcript Y1 and Y2*) y otros aún no localizados como: genes de crecimiento en Yp (Ogata et al, 1992), el gen GBY (*Gonadoblastoma locus on Y chromosome*) en la región pericentromérica o en el brazo largo del cromosoma Y (Page et al, 1987), o bien en Yp (Tsuchiya et al, 1995).

1.3 CROMOSOMA X

El cromosoma X contiene aproximadamente 160 millones de pares de bases (Mb) y corresponde a 5% del contenido total del DNA del complemento cromosómico haploide y codifica para 3000 a 4000 genes (Mandel et al,1992). Este cromosoma ha sido el más extensamente estudiado debido a la gran cantidad de enfermedades ligadas al X y al estudio del proceso de inactivación como mecanismo de compensación de dosis génica.

El complemento cromosómico normal femenino contiene 2 cromosomas X, uno de los cuales es inactivado en etapas tempranas del desarrollo para asegurar la compensación de dosis en la expresión génica. En 1949, Barr y Bertram descubrieron el corpúsculo de Barr o cromatina sexual. Posteriormente, estos investigadores encontraron esta partícula heterocromática en muchos tejidos de hembras de varias especies de mamíferos, incluyendo humanos (Barr y Bertram,1949). Ohno y cols. en 1959, demostraron que el corpúsculo de Barr estaba formado por un cromosoma X condensado (Ohno et al,1959). Si un individuo tiene cromosomas X supernumerarios, todos excepto uno forman cuerpos de Barr, el cual consiste en que el cromosoma X adquiere forma de asa ya que los dos telómeros se encuentran unidos a la membrana nuclear (Walker et al,1991).

Mary Lyon en 1961 observó en el ratón que las hembras heterocigotas para genes ligados al cromosoma X que controlan el color de pelo mostraban mosaicos de dos colores. Esta variación corresponde a la expresión del gen mutado y del normal, postulando la siguiente hipótesis:

- a) En las células somáticas de mamíferos hembras, sólo un X está activo. El segundo X se condensa e inactiva, observándose en interfase como la cromatina sexual.
- b) La inactivación ocurre en las primeras etapas embrionarias.
- c) El X inactivo puede ser el materno o el paterno en diferentes células de un mismo individuo, se encuentra en forma aleatoria pero una vez establecida la inactivación de uno de los dos cromosomas X, ésta será conservada como una característica en sus descendientes clonales (Lyon,1961).

Actualmente se conocen algunas excepciones de esta hipótesis tales como:

1. La inactivación del X ocurre en el paso de mórula a blastocisto, se inicia en las células del trofoectodermo, seguido por el endodermo primitivo, posteriormente por el ectodermo embrionario y finalmente por la masa celular interna (Gartler y Riggs,1983). Esta inactivación no es al azar en tejidos extraembrionarios, ya que el X paterno es preferencialmente inactivado (Takagi y Sasaki,1975). Esto podría deberse a que los cromosomas X paterno o materno, o ambos, llevan consigo una impronta que aparentemente adquieren durante la gametogénesis. (Lyon y Rastan,1984). Este patrón de inactivación continúa en el endodermo primitivo y es hasta el final

- 3) Mantenimiento del estado activo o inactivo lo que asegura la transmisión clonal transmitida a través de divisiones celulares sucesivas y
- 4) Reactivación del X inactivo en el oocito (Gartler y Riggs,1983; Lyon,1988).

Las células germinales se comportan de manera diferente en el proceso de inactivación. El cromosoma X inactivo se reactiva durante la gametogénesis femenina, probablemente durante la profase meiótica por lo que los dos cromosomas X activos permanecen activos en el oocito (McCarrey y Dilworth,1992). La presencia de ambos cromosomas X activos es necesaria para la formación del folículo y el subsecuente desarrollo del ovario (Lyon,1991). En cambio en las espermatogonias se transcribe el gen XIST inactivando al único cromosoma X presente y condensándose en paquitenos dentro de la vesícula sexual para evitar recombinación ilegítima (McCarrey y Dilworth,1992; Rastan,1994).

El extremo distal de Xp (2.6Mb) recombina durante la meiosis masculina con el extremo distal de Yp (0.4Mb); esta región es conocida como pseudoautosómica (PAR) por su comportamiento y se localiza en Xp22.3 y Yp11.3, respectivamente (Darlington,1937). En el cromosoma X la región pseudoautosómica escapa a la inactivación (Charlesworth,1991). Esta región contiene 9 genes y la región 5' de un gen denominado XGA (grupo sanguíneo del sistema XG): MIC2, que codifica para un antígeno de superficie implicado en procesos de adhesión celular; XE7, proteína ubicuota cuya función se desconoce; ASMT, codifica para la enzima acetilserotonín metiltransferasa; ASMTL (*ASMT-like*); ANT3, codifica para la enzima adenín nucleótido-translocasa; IL3RA, para la subunidad alfa del receptor de interleucina y CSF2RA para el receptor alfa del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (Rappold,1993); SHOX, gen homeobox de talla baja (Rao et al,1997) y PGPL: proteína de unión a GTP (Graves et al,1998).

Graves (1998) plantea la hipótesis de que la región pseudoautosómica puede representar una reliquia de una PAR ancestral mayor con ganancia o pérdida de genes de PAR a autosomas. Estas fuentes de variación entre las especies son secundarias a translocaciones, degradación del cromosoma Y e inversiones (Graves et al,1998).

El apareamiento de los cromosomas sexuales no ocurre únicamente entre Xp y Yp ya que se ha observado entre Xq y Yq (Chandley et al,1984), constituyendo ésta la segunda región pseudoautosómica (XqPAR) (Freije et al,1992). Dos genes han sido descubiertos en esta región de 320 kb: el gen SYBL1 (*sinaptovredina-like 1*), se expresa únicamente del cromosoma X activo (D'Esposito et al,1997) e IL9R (receptor de interleucina 9) que escapa a la inactivación mientras que su alelo en el cromosoma Y es expresado (D'Esposito et al,1997).

2.0 SINDROME DE TURNER

2.1 ANTECEDENTES:

En 1938 Henry Turner describió 7 pacientes con talla baja, infantilismo sexual, cuello alado, baja implantación de cabello a nivel occipital y *cubitus valgus* (Turner,1938). Sin embargo, Ulrich en 1930 había reportado a una paciente de 8 años con las mismas características además de linfedema, paladar alto, ptosis, implantación baja de pabellones auriculares y uñas pequeñas. Por este motivo el síndrome es referido como Ulrich-Turner (Ulrich,1949). En 1944, Wilkins y Fleischmann identificaron que el infantilismo sexual era debido a la presencia de ovarios rudimentarios disgenéticos.

La disgenesia gonadal se define como el reemplazo de las gónadas por estrías de tejido conectivo fibrovascular que no contiene células germinales (Verp y Simpson,1987).

La relación entre estas descripciones fenotípicas, la evidencia patológica de gónadas disgenéticas y la ausencia del cromosoma X se llevó a cabo con la identificación del corpúsculo de Barr, demostrando que la mayoría de pacientes con síndrome de Turner no presentaban cromatina sexual (Males y Seely,1978). Posterior a la introducción de la citogenética la importancia en la detección de este corpúsculo se redujo debido a que fue posible tener una visualización directa de los cromosomas. Estas nuevas técnicas llevaron al conocimiento que muchas otras anomalías del cromosoma X (mosaicismo,deleciones, anillos y rearrreglos) se pueden asociar con una o más características del síndrome de Turner (Lippe,1991).

Actualmente se considera que la ausencia de uno de los cromosomas X es la anomalía de cromosomas sexuales más común en mujeres, afectando aproximadamente un 3% de las mujeres concebidas.

La incidencia de anomalías citogenéticas que resulta en la pérdida de todo o parte del cromosoma X es de 1:2000 a 1:5000 en recién nacidas vivas (Hook y Warburton, 1983).

Se estima que 99% de los fetos 45,X se abortan en los primeros estadios del desarrollo embrionario; por lo que únicamente el 1% de estas fertilizaciones llega a término con características de síndrome de Turner (Hook y Warburton,1983). El alto porcentaje de pérdidas gestacionales con cariotipo 45,X puntualiza la posibilidad de la presencia de mosaicismo con una línea celular normal que permite la supervivencia del embrión (Held et al,1991).

2.2 ASPECTOS CITOGENETICOS:

En 1959 Ford y colaboradores demostraron que las pacientes con fenotipo Turner presentaban un cariotipo 45,X (Ford et al,1959); sin embargo, estudios subsecuentes indicaron que sólo 40 a 60% de las pacientes con este síndrome son monosómicas para el cromosoma X, el resto de los casos presenta dos cromosomas sexuales, uno de los cuales es estructuralmente anormal (20%- 35%), siendo la anomalía estructural más común el isocromosoma de Xq (Hook y Warburton,1983) o bien un mosaico (20%) 45,X y una segunda línea celular con un cromosoma X ó Y de características normales o anormales. De éstos, 10 a 15% corresponden a mosaicos con una segunda línea celular con cromosoma X y 2 a 5% corresponden a mosaicos con cromosoma Y (Palmer y Reichmann,1976).

Con el advenimiento de técnicas modernas de citogenética y moleculares se ha demostrado una frecuencia más alta de mosaicismo (66.7%) en linfocitos y fibroblastos de pacientes con síndrome de Turner, observándose en muchos casos la presencia de cromosomas marcadores . De acuerdo con estos estudios, únicamente 20.7% de las pacientes son 45,X (Held et al,1992).

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de los principales complementos cromosómicos en pacientes con síndrome de Turner.

Mediante polimorfismos del cromosoma X se ha estudiado el origen del X presente en pacientes 45,X (Hassold et al,1988). Varios reportes han mencionado que en 80% el origen del cromosoma X presente es materno (Loughlin et al,1991). Recientemente, Jacobs estudió 38 pacientes con isocromosoma de Xq observó que el origen del cromosoma X con esta alteración estructural puede ser tanto materno como paterno (Jacobs et al,1997).

No hay evidencia de que la edad parental sea la causa de la pérdida de uno de los cromosomas X (Loughlin et al,1991) y tampoco existen diferencias clínicas basadas en el origen del X presente (Mathur et al,1991). Sin embargo, Skuse sugiere que el origen parental puede tener algún efecto sobre el fenotipo, particularmente en la función socio-cognitiva (Jacobs et al,1997).

Por medio del análisis citogenético se ha demostrado que el porcentaje de mosaicismo con una línea celular conteniendo un cromosoma Y normal o anormal en el síndrome de Turner es de 5.5% (Magenis et al,1980). Además, aproximadamente

la mitad de los cromosomas marcadores, que ocurren con una frecuencia estimada de 3% en síndrome de Turner, provienen del cromosoma Y (Nagafuchi et al, 1992).

Estas pacientes con secuencias del cromosoma Y constituyen un subgrupo clínicamente importante ya que 10 a 20% de los casos tienen predisposición para el desarrollo de gonadoblastoma en las gónadas disgenéticas. Por lo tanto, es clínicamente importante establecer inequívocamente el origen (X ó Y), de los cromosomas marcadores y reconocer la presencia de secuencias del Y en pacientes con síndrome de Turner (Cooper et al, 1991; López et al, 1993).

La detección de mosaicismo está principalmente determinada por cuatro factores: 1. el tipo y número de tejidos analizados, 2. el número de células estudiadas (Hook, 1977), 3. la sensibilidad de las técnicas aplicadas y 4. la probable selección que puede resultar en la desaparición de las líneas celulares (Held et al, 1992).

Un porcentaje de mosaicismos no es detectado por técnicas convencionales citogenéticas ya que este tipo de análisis requeriría analizar un gran número de células. La aplicación de técnicas moleculares como la hibridación fluorescente in situ (FISH), y la reacción en cadena de polimerasa (PCR) aumenta sustancialmente la detección de líneas celulares presentes en baja frecuencia y las probables alteraciones estructurales (Fernández et al, 1996).

2.3 CUADRO CLINICO:

La sospecha de síndrome de Turner debe ser considerada en cualquier recién nacida con linfedema de manos y pies, piel redundante en cuello, talla baja en edad pediátrica y talla baja y amenorrea primaria en adolescentes.

La talla baja y la disgenesia gonadal son las características más frecuentemente observadas en pacientes con síndrome de Turner.

En la tabla 2 se muestran las principales características fenotípicas de estas pacientes.

I. Anomalías Esqueléticas:

La talla baja se presenta en todas las pacientes con cariotipo 45,X y afecta predominantemente el eje longitudinal dando una apariencia de tórax cuadrado con teletelia (Park E,1977). En el crecimiento de estas pacientes se pueden distinguir 4 fases: a) retardo en el crecimiento intrauterino b) período de crecimiento casi normal de los 2 a los 3 años c) desaceleración rápida entre los 3 y 13 años y d) falta de crecimiento en la pubertad (Lyon et al,1985). Miranda (1994) demostró que la talla alcanzada por pacientes mexicanas 45,X sin tratamiento es de 133 a 137 cm.

Varios estudios han encontrado que la secreción de hormona de crecimiento (GH) en pacientes con síndrome de Turner es normal (Lindsten et al,1967), sin embargo se ha observado que el tratamiento con esta hormona mejora la velocidad de crecimiento y la altura final en pacientes con síndrome de Turner (Stahnke et al,1993). La respuesta inicial al tratamiento depende de la dosis y frecuencia de administración de la GH (Teunenbroek van A et al,1996). La dosis más comúnmente utilizada es de 4 a 6 IU/m/día (Nienhuis HE et al,1993) y en la mayoría de los casos se administra en combinación con bajas dosis de estrógenos (Sas Th CJ et al,1999). La edad promedio de inicio es de 8.5 a 10.4 años y la ganancia en la talla final es de 2.8 a 8.5cm (Rochiccioli et al,1995).

El cuello corto es secundario en la mayoría de los casos a hipoplasia de una o más vértebras cervicales. La línea de implantación del pelo es baja y pueden presentar *pterygium colli* (Felix et al,1974). El crecimiento de los huesos largos también se encuentra afectado, sin presentar apariencia histológica ni radiológica de displasia ósea. El *cubitus valgus* es consecuencia de anomalías en el desarrollo de la cabeza troclear. Un gran número de pacientes presenta una disminución en la prominencia de la cabeza del cuarto metacarpiano y también puede haber acortamiento de metatarsos (Baughman et al,1974). Además se han observado

alteraciones en la forma de los huesos del carpo, radio y subluxación del cúbito (Kaitila et al,1976); anomalías en los cóndilos femorales y medio-tibiales lo que causa *geno valgo*. Un número significativo de pacientes presenta escoliosis la cual se ha observado cada vez con mayor frecuencia debido al uso temprano de hormona de crecimiento (Lippe B,1991). Radiológicamente se ha encontrado una apariencia osteoporótica de los huesos largos durante la infancia (Bercu et al,1976).

El desarrollo de la cara también se encuentra afectado por varias malformaciones óseas, las pacientes presentan con mayor frecuencia cara triangular, micrognatia, fisuras palpebrales antimongoloides, pliegues epicánticos, paladar alto y arqueado, pabellones auriculares prominentes y de implantación baja con el meato del conducto auditivo anormal e hiper celularidad de células mastoides lo que predispone al desarrollo de otitis media (Szpunar J,1968). Estas pacientes presentan hipoacusia la cual puede ser conductiva o neurosensorial por alteraciones en las células del órgano de Corti (Anderson et al,1969). La mitad de las pacientes requiere valoración oftalmológica por: estrabismo, ptosis, cataratas, nistagmus, ceguera al color y ambliopía (Palmer y Reichmann,1976).

2. Disgenesia Gonadal:

Henry Turner (1938) sugirió que la amenorrea primaria de las pacientes con síndrome de Turner era secundaria a hipopituitarismo. Estudios posteriores en abortos 45,X demostraron que el desarrollo ovárico era prácticamente normal hasta la semana 18 de gestación, pero posteriormente existía una disminución en el número de folículos por célula (Carr et al,1968). En ausencia de un segundo cromosoma X funcional, los ovocitos degeneran más rápidamente de lo normal, debido a que las células germinales no completan la meiosis, por lo que en la mayoría de las pacientes adolescentes no existe tejido ovárico funcional. (Hall J,1990).

Los niveles de gonadotrofinas pueden ser útiles para el diagnóstico antes de los 5 años de edad y después de los 10 años; si se encuentran elevados, la paciente probablemente no tendrá función ovárica normal en la adolescencia (Park et al,1983).

Entre 10 a 20% de las pacientes presentan pubertad espontánea y 2 a 5% tendrán menstruación, aunque ésta puede ser transitoria. El embarazo en pacientes con síndrome de Turner se presenta en 2% de las pacientes, la mayoría de las cuales son mosaicos. En estas pacientes se ha encontrado que 29% de los embarazos terminan en abortos espontáneos, 7% de los productos mueren en el periodo perinatal y 20% presentan cromosomopatías, siendo las más frecuentes: 45,X y trisomía 21 (Tarani et al,1998), por lo que está indicado realizar diagnóstico prenatal temprano (King y Magenis,1977).

La mayoría de las pacientes requerirán reemplazo hormonal, pero la edad de inicio es controversial. Este tratamiento en pacientes tratadas con GH debe involucrar la consideración de la dosis y la forma de estrógenos así como la ruta y tiempo de administración (Kastrup K, 1988). La administración de hormonas esteroides se ha relacionado con un deterioro en la tolerancia de glucosa, sin embargo, tiene un efecto benéfico en la presión arterial, metabolismo de calcio y su depósito en hueso (Gravholt et al, 1998).

3. Obstrucción linfática:

El linfedema fetal es una anomalía primaria frecuentemente encontrada en pacientes con síndrome de Turner desde etapas tempranas del desarrollo y resulta de obstrucción por malformaciones a nivel de la conexión de los vasos linfáticos (Van der Putte, 1977).

Varias características clínicas observadas en estas pacientes son resultado de este linfedema: a) cuello alado, es el proceso de cicatrización que afecta la piel distendida sobre grandes higromas quísticos en la región nugal; b) línea de implantación baja de pelo; c) pabellones auriculares grandes y rotados hacia atrás; d) edema del dorso de manos y pies generalmente presentes al nacimiento, sin embargo puede observarse al iniciar la terapia hormonal sustitutiva e) hipoplasia ungueal; f) dermatoglifos característicos (Reed et al, 1977).

4. Anomalías cardiovasculares:

Los defectos cardíacos constituyen la causa aislada más común de muerte en estas pacientes (Price et al, 1986). En la tabla 2 se muestran las alteraciones más frecuentes.

La combinación de coartación de aorta, hipertensión y anomalías de valvas aórticas predispone al desarrollo de aneurismas aórticos (Allen et al, 1986). La hipertensión arterial esencial ocurre con mayor frecuencia en el síndrome de Turner (Lippe, 1991).

Clark (1984) sugirió que la distensión de los conductos linfáticos torácicos comprimen el arco aórtico y alteran la hemodinámica cardiovascular, dando como resultado las deformaciones arteriales como coartación de aorta.

5. Anomalías renales:

Ocurren con una frecuencia de 35 a 70% (Litvak et al, 1978) y pueden involucrar el sistema colector pielocaliceal, la posición del órgano y el

abastecimiento vascular. Se sugiere que todas las pacientes se realicen ultrasonido abdominal para descartar estas alteraciones (Lippe, 1991).

6. Otros:

Existen varios reportes de sangrado de tubo digestivo en pacientes con síndrome de Turner (Rosen et al,1967), el cual puede ser secundario a malformaciones vasculares o a enfermedad inflamatoria intestinal.

También se ha observado una mayor frecuencia de anomalías tiroideas en estas pacientes, siendo la más frecuente la tiroiditis de Hashimoto (Sparkers y Motulsky, 1963). 5% de las pacientes presentan diabetes mellitus y entre 25 a 60% intolerancia a la glucosa (Polychronakoa et al,1980).

El IQ promedio en las pacientes con síndrome de Turner es 90 y aunque el desarrollo inicial es generalmente normal, puede ocurrir cierto retraso en funciones motoras como pobre coordinación . Las pacientes pueden tener déficits específicos en la organización visuo-espacial, en la función social cognitiva y con ciertas materias abstractas como matemáticas. Se ha observado una tendencia hacia la baja autoestima y a la depresión durante la pubertad (Smith,1997).

Las pacientes con cariotipo 46,X r(X) generalmente son mosaicos 45,X/46,Xr(X) y el fenotipo varía dependiendo del tamaño de la deleción y de la presencia del centro de inactivación (XIC) en el anillo. Algunas pacientes presentan además del fenotipo Turner: retraso mental,sindactilia de tejidos blandos y anomalías faciales (Van Dyke et al,1992).

Existen reportes de pacientes con anillo del cromosoma X con diferentes porciones de este cromosoma que presentan fenotipo de síndrome de Kabuki, este síndrome caracterizado por retraso mental, deficiencia postnatal en el crecimiento, fisuras palpebrales de apariencia larga, eversion de la fisura palpebral inferior, pabellones auriculares prominentes con pits preauriculares, anomalías esqueléticas y huellas dactilares prominentes.La mayoría de los casos son esporádicos y pueden estar afectados tanto varones como mujeres (Niikawa et al,1988). Algunos de estos varones tienen un cariotipo 45,X/46,X,r(Y) (Dennis et al,1992). En mujeres, este fenotipo pudiera estar dado por la sobreexpresión de secuencias específicas del cromosoma X que normalmente se inactivarían (McGinniss et al,1997).

2.4 ASPECTOS MOLECULARES

GENES PROPUESTOS PARA EXPLICAR EL FENOTIPO TURNER:

La mayoría de los investigadores piensan que el fenotipo del síndrome de Turner es resultado de una haploinsuficiencia de genes "Turner" específicos, más que consecuencia de la monosomía *per se* (Davies,1991).

Ferguson-Smith planteó la posibilidad de que el cromosoma Y contenga genes homólogos a los que condicionan el síndrome de Turner debido a que pacientes con cariotipo 46,X,del(Y)(p) presentaban este fenotipo (Ferguson-Smith et al,1990). De acuerdo a esto, el *locus* o *loci* responsable de este síndrome debe tener un homólogo en el cromosoma Y, escapar al mecanismo de inactivación del X y transcribirse activamente durante el desarrollo (Ferguson-Smith,1991).

Se ha sugerido que el cromosoma X contiene uno o varios genes que controlan los estigmas de Turner. Dos genes han sido propuestos como candidatos:

1. ZFX: El gen ZFX se encuentra en Xp21.3-22.1 y escapa a la inactivación. (Fisher et al,1990). Su homólogo ZFY se localiza en Yp11.3. Se han descrito dos pacientes con alteraciones estructurales del cromosoma Y, sin ZFY, que no presentaban estigmas de Turner, descartándose este gen como candidato. Sin embargo, no hay informes de pacientes con síndrome de Turner en presencia de dos copias ZFX y ZFY (Ogata et al,1993). Este gen contiene dedos de zinc, su función es actuar como un factor de transcripción y la mayoría de los tejidos expresan ambas copias por lo que se espera que su haploinsuficiencia afecte varias funciones (Page et al,1987a).
2. RPS4X: Codifica para una proteína ribosomal y se localiza en Xq13 (Page,1987). Su homólogo RPS4Y se localiza cerca de SRY y ZFY en Yp. En algunas mujeres 46,XY que han presentado linfedema al nacimiento, este gen se encuentra ausente (Blagowidow et al,1989).

Sin embargo, este gen ha sido descartado como anti-Turner debido a que: a) aunque escapa a la inactivación, se encuentra localizado en Xq13 (Fisher et al,1990); b) la falta de estigmas de Turner en una mujer 46,XY con delección de RPS4Y (Muller et al,1992) y c) el hallazgo de dos copias activas de RPS4X en líneas celulares de pacientes con síndrome de Turner con X estructuralmente anormales (Just et al,1992).

Existen informes de pacientes con síndrome de Turner con delección de Xq, esta observación paradójica pudiera explicarse bien sea por inactivación inapropiada de genes "Turner" en el cromosoma X estructuralmente anormal o por la presencia de varios genes equivalentes funcionalmente localizados en ambos brazos del cromosoma X (Grumbach y Conte,1992).

Barbaux (1995) describe dos individuos con deleciones en Yq con estigmas de Turner sugiriendo que genes "Turner" pudieran estar localizados en Yq. El gen podría corresponder al gen de control de crecimiento (GCY) influenciado por otros genes en el cromosoma Y (Alvesalo y de la Chapelle,1981).

En la figura 1 se muestra la representación esquemática de los mecanismos causantes del fenotipo de síndrome de Turner en base al cariotipo 45,X (Ogata y Matsuo,1995)

GENES RELACIONADOS ESPECIFICAMENTE CON CARACTERISTICAS CLINICAS DEL SINDROME DE TURNER:

Se han realizado muchos intentos para correlacionar el tipo de anomalía cromosómica del X y los hallazgos fenotípicos en síndrome de Turner (Carothers et al,1980)

1. Falla ovárica: Un estudio comparativo del desarrollo de ovocitos entre pacientes 45,X y controles 46,XX demostró que en pacientes con monosomía del X: a) la proporción de ovocitos que alcanzan el estado de paquiteno es muy pequeña, b) los ovocitos en dictioteno no son detectables y c) la proporción de la degeneración de células germinales en paquiteno está aumentada; estos datos indican que la pérdida de ovocitos en pacientes con síndrome de Turner tiene lugar en etapas tempranas de la profase meiótica (Speed,1986).

Existen dos teorías que pueden explicar la disgenesia gonadal en estas pacientes, la primera consiste en que la ausencia de genes específicos darían como resultado disgenesia gonadal (Madan,1983;Therman et al,1990; Tharapel et al,1993 y Jones et al,1996); la segunda apoya que el apareamiento cromosómico incompleto en la meiosis es el causante de la anomalía (Burgoyne et al,1983). Burgoyne y Baker propusieron en 1983 que la falla del apareamiento cromosómico en los ovocitos en pacientes con síndrome de Turner puede resultar en una ruptura progresiva y general del DNA, afectando la viabilidad de los ovocitos. Alternativamente, Speed en 1984 propuso que la falla de apareamiento puede llevar a pérdida de ovocitos secundario a la expresión alterada de genes homólogos (Speed,1984).

La existencia de genes específicos es apoyada por varios autores en base a la asociación entre disgenesia gonadal y ruptura cromosómica en Xq13-q26 en pacientes con cariotipo 46,X,t(X;autosoma) Madan (1983) sugirió que la región Xq13-q26 es crítica para el desarrollo ovárico, y que la integridad de esta región es necesaria para un desarrollo ovárico normal. Debido a que las rupturas cromosómicas pueden estar en cualquier parte de la región crítica, con la posible excepción de Xq22 (Madan,1983), varias posibilidades han sido implicadas en la disfunción gonadal: a) efecto de posición en un gen(es) para el desarrollo ovárico, b)disrupción en la integridad de dos o más genes necesarios para este desarrollo y c)cambio en el orden de replicación (Therman et al,1990).

Therman (1990) propone que una región entre Xq13 y Xq23 contiene genes esenciales para la función ovárica normal, sin embargo,Tharapel y colaboradores

(1993) sugieren la existencia de un *locus* para desarrollo ovárico. Está bien establecido que genes en Xp también son necesarios para el desarrollo ovárico y Jones y colaboradores (1996) sugiere que el locus DFFRX en Xp11.4 puede ser un candidato para disgenesia gonadal.

2. Anomalías somáticas: Estudios realizados en pacientes con fenotipo Turner y deleciones de Xp han sugerido que uno o varios genes localizados en la región proximal de Xp11.2 pudieran ser responsables de este fenotipo (Hech et al,1980). Sin embargo, existen varias pacientes con deleciones terminales pequeñas de Xp y estigmas de síndrome de Turner (Meindl et al,1993).

Se ha postulado que genes homólogos responsables de las características somáticas estén presentes en Xp y Yp, el gen linfogénico propuesto ha sido asignado a la región media de Xp y a la región distal de Yp ya que han sido reportados estigmas de Turner en pacientes 46,X,Yp- (Ferguson-Smith,1991). Sin embargo, Ogata y colaboradores (1993) revisaron 9 casos con este cariotipo, en donde las deleciones se encontraron entre los intervalos 1A y 2B de Yp, indicando que los genes para las características clínicas no se localizan en la región pseudoautosómica.

Erickson (1995) reportó un paciente con linfedema congénito y cariotipo 46,X,t(Y;16)(q11.2;q24) y sugirió la localización de un gen linfogénico en la porción distal de eucromatina y la proximal de heterocromatina en Yq.

James et al (1998) describieron 25 pacientes con deleciones terminales de Xp sin cuello alado, sugiriendo que un gen responsable de esta característica pudiera localizarse en la región proximal de Xp.

3)Talla baja: Las pacientes con deleciones del brazo corto del cromosoma X (Xp-) habitualmente presentan talla baja, disgenesia gonadal y estigmas del síndrome de Turner (Conte y Grumbach,1979).

Se han realizado revisiones de pacientes con deleciones de brazos cortos con diferentes puntos de ruptura. Therman y otros autores comprobaron que la pérdida de Xcen-p11 puede causar síndrome de Turner completo (Wyss et al,1982) (Therman y Susman,1990). Las pacientes con deleción de Xp terminal con puntos de ruptura en Xp21 o distales a éste, presentan talla baja y cursan con función gonadal normal (Wyss et al,1982).

En pacientes con talla baja han sido reportados cincuenta rearrreglos cromosómicos en Xp22, sugiriéndose la localización de uno o varios genes en la región pseudoautosómica (Schaeffer et al,1993). En 1997, Rao y colaboradores redujeron el intervalo crítico a un segmento de 170-kb dentro de esta región, el cual

se encontraba deletado en 36 pacientes con talla baja (algunas con síndrome de Turner) y diferentes rearrreglos de Xp22 ó Yp11.3; identificando un nuevo gen homeótico, denominado SHOX (*short stature homeobox-containing gene*). Este gen se encuentra evolutivamente conservado, su homólogo en ratón es OG-12 y tiene similitud con PAX3 (relacionado con el síndrome de Waardenburg). SHOX escapa a la inactivación del cromosoma X (Rao et al,1997).

Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de más genes dentro de esta región que contribuyan a la talla baja en el síndrome de Turner (Ogata y Matsuo,1995), como podrían ser dos receptores para factores de crecimiento: el receptor para el factor estimulador de colonias granulocito- macrófago CSF2R, (Gough et al,1990) y el receptor para interleucina 3, IL3RA (Milatovich et al,1993); la translocasa nucleótido mitocondrial involucrada en el metabolismo energético en general (Slim,1993) y dos proteínas de función desconocida: MIC-2 y XE-7 (Ellison et al,1992) que también pudieran estar implicadas, sin embargo no existen experimentos definitivos que demuestren la importancia de estos genes en el crecimiento (Erickson,1995).

Ogata y Matsuo en 1993 propusieron que el grado de alteración en el crecimiento es causado por imbalance cromosómico.

Geerkens y colaboradores (1994) analizaron varias pacientes con deleciones de Xq y observaron que las pacientes con puntos de ruptura más distales presentaban talla más alta.

Además existen varios genes determinantes de estatura, la mayoría de los cuales están localizados en los autosomas (Brook et al,1977).

GEN(ES) RELACIONADOS CON EL DESARROLLO DE GONADOBLASTOMA

El gonadoblastoma es una neoplasia *in situ* de gónadas disgenéticas compuesta de agregados de células germinales mezcladas con pequeñas células epiteliales parecidas a las células de granulosa y Sertoli inmaduras (Scully,1970).

El tumor casi invariablemente ocurre en pacientes con material del cromosoma Y en su cariotipo y 3 a 5 % de pacientes con síndrome de Turner lo presentan. En la mayoría de pacientes, la única expresión de este Y anormal puede ser su efecto sobre la gónada, en donde algunas células continúan dividiéndose y dan lugar a la formación del tumor. El riesgo para su desarrollo, tanto uni como bilateral es de 15 a 20% (Mulvihill et al,1975) y aunque no metastatiza, en la mitad de los casos progresa a un disgerminoma invasivo o evoluciona hacia otros tipos de tumores malignos, por lo que es necesario la extirpación quirúrgica temprana de las gónadas (Scully, 1970).

Algunas de las pacientes con cariotipo 45,X/46,XY presentan fenotipo de síndrome de Turner y se ha estimado que una tercera parte de estas pacientes desarrollan gonadoblastoma y que 30% desarrolla un tumor maligno(Robboy et al,1982).

Estudios comparativos de la frecuencia de gonadoblastoma en pacientes mosaicos con síndrome de Turner con un cromosoma Y normal o anormal han sugerido que la integridad del Y y en particular la presencia de la banda fluorescente Yqh, es requerida para el desarrollo del tumor (Lukusa et al,1986). De Arce sugiere que se necesitan dos procesos para el desarrollo de gonadoblastoma en estas pacientes: el primer evento es la gónada disgenética y el segundo la actividad de un gen, en o cerca de Yqh (De Arce et al,1992).

Page en 1987 postuló que la predisposición para desarrollar gonadoblastoma depende de un gen localizado en el cromosoma Y y referido como GBY (*locus* de gonadoblastoma en el cromosoma Y) . Varios autores mencionan que este gen se localiza en la región centromérica o en el brazo largo del cromosoma Y (Magenis et al,1984; Disteche et al,1986; Page,1987; Petrovic et al,1992). En cambio,Tsuchiya en un estudio de 10 pacientes sugiere que la localización del gen para gonadoblastoma está en Yp (Tsuchiya et al,1995).

Los genes TSPY y RBM (*RNA-binding motif protein*, anteriormente denominado YRRM) se encuentran en el cromosoma Y y su expresión es específica en testículo (Armemann et al,1987). En dos pacientes estudiados por Tsuchiya et al

(1995), se encontró expresión de estos dos genes en el tejido tumoral. Este efecto puede ser secundario a la presencia de células germinales en el tumor, a que productos anormales de estos genes se expresen en gónadas disgenéticas o a que estos genes funcionen como tumorigénicos.

Aunque GBY puede existir como una secuencia de copia única dentro de una región crítica, no se puede descartar la posibilidad de múltiples *loci* de susceptibilidad para gonadoblastoma (Tsuchiya et al, 1995).

La edad de presentación de esta neoplasia varía habiendo informes desde la infancia (Petrovic, 1992) por lo que es necesario la extirpación preventiva temprana de las gónadas.

2.5 Estudios realizados en diferentes poblaciones para determinar la frecuencia de secuencias del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner:

El interés clínico en la determinación de la existencia de secuencias del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner ha llevado a varios grupos de diferentes países a desarrollar métodos para la detección de estas secuencias y al estudio de estas pacientes para la prevención del desarrollo tumoral (Lindgren et al, 1992; Nagafuchi et al, 1992; Held et al, 1992; Medlej et al, 1992; Binder et al, 1995; Coto et al, 1995).

La metodología molecular utilizada y el número de secuencias específicas del cromosoma Y estudiadas varía considerablemente. Así mismo existe variación en el número de pacientes analizadas, la frecuencia de mosaicos con cromosoma X normales o anormales y el número de casos con cromosomas marcadores.

En la tabla 3 se muestran los diferentes estudios realizados y las frecuencias encontradas.

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome de Turner afecta 1 de cada 2.500 nacidas vivas, las características clínicas más frecuentemente observadas son: talla baja, infantilismo sexual y diversas anomalías somáticas. Es causado por la ausencia completa de uno de los cromosomas sexuales o por alteraciones estructurales en uno de los cromosomas X o Y. De 40 a 60% de estas pacientes presentan un cariotipo 45,X, sin embargo estudios realizados en diversas poblaciones han demostrado una frecuencia muy variable (0 a 61%) de secuencias del cromosoma Y en estas pacientes. Además, 20% de las pacientes con síndrome de Turner son mosaicos, de las cuales 2 a 5% presentan una línea celular 45,X y una segunda línea 46,XY con un Y estructuralmente normal o anormal. La presencia de cromosoma Y o secuencias de éste, tiene gran importancia clínica debido a que estas pacientes tienen 15 a 20% de riesgo de desarrollar gonadoblastoma . Por lo anterior, es importante estudiar pacientes con síndrome de Turner con cariotipo 45,X y 45,X/46,X, + marcador para determinar la presencia de secuencias del cromosoma Y.

4.0 OBJETIVOS

1. Detectar la presencia de material genético derivado del cromosoma Y en el genoma de pacientes con síndrome de Turner y cariotipo 45,X.
2. Establecer el origen (X o Y) de los cromosomas marcadores observados en pacientes con fenotipo Turner.
3. Determinar la frecuencia de la presencia del cromosoma Y en pacientes Turner 45,X y 45,X/46,X + mar en población mexicana.
4. Prevenir el desarrollo de gonadoblastoma en las pacientes Turner con secuencias positivas para el cromosoma Y mediante su referencia al servicio de cirugía general.

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome de Turner afecta 1 de cada 2,500 nacidas vivas, las características clínicas más frecuentemente observadas son: talla baja, infantilismo sexual y diversas anomalías somáticas. Es causado por la ausencia completa de uno de los cromosomas sexuales o por alteraciones estructurales en uno de los cromosomas X o Y. De 40 a 60% de estas pacientes presentan un cariotipo 45,X, sin embargo estudios realizados en diversas poblaciones han demostrado una frecuencia muy variable (0 a 61%) de secuencias del cromosoma Y en estas pacientes. Además, 20% de las pacientes con síndrome de Turner son mosaicos, de las cuales 2 a 5% presentan una línea celular 45,X y una segunda línea 46,XY con un Y estructuralmente normal o anormal. La presencia de cromosoma Y o secuencias de éste, tiene gran importancia clínica debido a que estas pacientes tienen 15 a 20% de riesgo de desarrollar gonadoblastoma . Por lo anterior, es importante estudiar pacientes con síndrome de Turner con cariotipo 45,X y 45,X/46,X, + marcador para determinar la presencia de secuencias del cromosoma Y.

4.0 OBJETIVOS

1. Detectar la presencia de material genético derivado del cromosoma Y en el genoma de pacientes con síndrome de Turner y cariotipo 45,X.
2. Establecer el origen (X o Y) de los cromosomas marcadores observados en pacientes con fenotipo Turner.
3. Determinar la frecuencia de la presencia del cromosoma Y en pacientes Turner 45,X y 45,X/46,X + mar en población mexicana.
4. Prevenir el desarrollo de gonadoblastoma en las pacientes Turner con secuencias positivas para el cromosoma Y mediante su referencia al servicio de cirugía general.

5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES:

Se realizó un estudio observacional, transversal y descriptivo a 63 pacientes con fenotipo de síndrome de Turner con cariotipo 45,X, 45,X/46,X + mar ó 45,X/46,XY. Las pacientes fueron captadas en el servicio de Genética del Hospital General de México.

5.1 ESTUDIO CITOGENÉTICO:

Método para obtener preparaciones cromosómicas.

Cariotipo en linfocitos de sangre periférica.

- Tomar 2 ml de sangre con jeringa estéril, previamente heparinizada.

Siembra de la muestra :

Utilizar 10 ml de medio de cultivo RPMI (1640) para muestras de sangre periférica.

El medio RPMI es suplementado con: 10 mg de estreptomina, 10 mg de penicilina de 10000 U, fitohemaglutinina (10 ul), 0.01 g de L-glutamina y 1 ml de suero fetal bovino .

Preparar 2 frascos por cada paciente colocando en cada frasco 12 gotas de sangre.

- Incubar 72 hrs a 37 °C. 1 hr y 30 min antes de que la muestra cumpla las 72 hrs, se agrega colchicina (50 ul para 5 ml y 100 ul para 10 ml de medio).

- Vaciar el contenido de los frascos en tubos de centrifuga y centrifugar a 1500 r.p.m. / 10 minutos, nivelando con solución salina isotónica estéril. Decantar el sobrenadante.

- Resuspender el botón en solución hipotónica (7 a 10 ml), en agitación constante; incubar por 30 min. a 37 °C. Centrifugar a 1500 r.p.m. / 10 minutos , decantar el sobrenadante.

- Agregar fijador frío (3:1 metanol absoluto - ácido acético glacial) gota a gota, con agitación constante y reposar la muestra 30 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 3500 r.p.m. / 10 minutos, decantar el sobrenadante.
- Realizar varios lavados con fijador, centrifugar la muestra a 3,500 r.p.m. por 10 min y decantar el sobrenadante, hasta que se observe limpio el paquete celular (botón blanco y sobrenadante transparente), no excediendo de 4 lavados.
- Gotear la muestra con pipeta Pasteur en portaobjetos, procurando que las gotas se extiendan completamente en éste. Dejar secar al aire; teñir con colorante Giemsa de 1 a 3 minutos. Observar en microscopio con objetivo de inmersión 100 X para buscar metafases (con un mínimo de tres por cada laminilla para ser cuantitativo). Si al observar al microscopio las metafases se encuentran muy cerradas, se gotean nuevos porta objetos a una altura mayor, para abrirlas más.
- Seleccionar en base a los portaobjetos las mejores muestras para realizar bandas G y C para obtener un análisis más preciso .

Bandas G - Método Seabright.

1. Utilizar preparaciones de por lo menos 24 hr (en el Hospital General se dejan una semana de envejecimiento).
2. Tratar las preparaciones con solución de tripsina al 0.025 % a 37° C en baño María, por uno o dos minutos, controlándose, según la actividad de la tripsina.
3. Lavar en solución salina isotónica (en baño María).
4. Teñir con Giemsa en amortiguador de fosfato a pH de 6.8 durante 2 a 5 min.
5. Lavar con agua desionizada y secar al aire.
6. Controlar por medio del microscopio los pasos 2 y 4.

5.2 ESTUDIO MOLECULAR:

Técnica de extracción de DNA de sangre periférica.

Extraer 5 ml de sangre periférica.

Colocar la sangre en un tubo de ensayo con EDTA .

Procedimiento :

Siguiendo la técnica de Cuevas Covarrubias modificada de Buffone y Darlington (1985) y de Kempter y Grossbadern (1992).

Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y agregar un volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10mM-Triton al 1%-Sacarosa 300 mM), el Tris con pH 7.6. Invertir el tubo varias veces.

Centrifugar a 3000 r.p.m./ 6 minutos; decantar con cuidado.

Agregar al botón 1 ml de amortiguador TTS . Agitar resuspendiendo el botón y pasar a un microtubo de 1.5 ml. Agitar hasta homogeneizar.

Centrifugar a 12,000 r.p.m. / 2 min en microcentrifuga. Decantar, añadir 1 ml de amortiguador TTS, resuspender.

Centrifugar a 12,000 r.p.m. / 2 min en microcentrifuga (repetir de dos a tres veces el paso anterior).

Al botón limpio agregar 570 μ l de NaCl 5mM. Agitar 2 minutos y colocar 30 μ l de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10 %. Agitar 5 minutos.

Observar si hay consistencia viscosa y agregar 200 μ l de NaCl saturado. Agitar 10 minutos.

Centrifugar a 11500 r.p.m. / 15 minutos a 4 °C.

Decantar el sobrenadante a un tubo de 13x100 mm estéril.

Añadir 2 ml de etanol absoluto a -20 °C para precipitar el DNA.

Tomar el DNA con una varilla de vidrio, enjuagar el DNA con etanol al 70 %, dejar evaporar el etanol en condiciones estériles y posteriormente resuspender

el DNA en un microtubo con 350 μ l de agua estéril, colocar en baño maría a 60 ° C durante 2 hrs.

Análisis espectrofotométrico (para cuantificación de DNA).

En cuanto al análisis espectrofotométrico, éste consiste en determinar la absorbancia de una dilución 1:100 de la muestra a dos longitudes de onda (260 nm y 280nm). A partir de la lectura a 260 nm. (correspondiente a los ácidos nucleicos), se calcula la concentración de la muestra:

$$\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$$

$$1 \text{ D.O. }_{260} = 50 \mu\text{g de DNA/ml} = 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \text{ (Sambrook et al, 1989).}$$

La cantidad total de DNA (en μ g) se calcula:

$$\mu\text{g totales de DNA} = \text{conc. } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{volumen total } (\mu\text{l})$$

Además la relación 260/280 permite conocer si la muestra está contaminada con proteínas, considerando que la lectura a 280 nm, corresponde a la fracción proteica. Una relación menor a 1.7 indica la presencia de proteínas (Ausubel,1987).

Electroforesis en gel de agarosa:

La electroforesis del DNA es la migración de éste, en base a su carga y peso al aplicarse un campo eléctrico. Debido a su carga negativa, el DNA migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite visualizar la calidad de la muestra, así como la presencia o ausencia de RNA contaminante y para el análisis de productos de PCR por visualización de la banda deseada (Sambrook et al, 1989).

Procedimiento:

1.- - Para calidad de DNA –gel al 0.8 %.

- Para productos de PCR – gel al 1.5 % con 0.75 g de agarosa, más 5ml de TAE 10X (Tris, Ácido acético glacial y EDTA (ácido etilenediaminetetraacético) y 45 ml de agua bidestilada . En un matraz Erlenmeyer disolver la agarosa en 45 ml de agua bidestilada calentando la mezcla en un horno de microondas, restituir el agua perdida por evaporación, agregar los 5ml de TAE y dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 50 °C para colocar 1 gota de bromuro de etidio (0.625 mg/ml) y vaciar en el porta gel.

- 2.-Dejar solidificar en el portagel colocando el peine.
- 3.- Preparar suficiente amortiguador de electroforesis (TAE 1X) para llenar la cámara.
- 4.- Retirar el peine cuidadosamente para evitar romper los pozos.
- 5.- Colocar el portagel en la cámara de electroforesis y añadir el amortiguador de electroforesis (TAE 1X) hasta cubrir el gel aproximadamente un milímetro por encima.
- 6.- Mezclar cada muestra de DNA (1-2 µg) con 3 µl de amortiguador de carga .
- 7.- Colocar la muestra en el pozo.
- 8.- Conectar los electrodos a la cámara y encender la fuente de poder a 70 volts.
- 9.- Dejar correr la muestra durante 1hr y 30 min. (aproximadamente 2/3 del largo del gel de agarosa).
- 10.- Observar en el transiluminador de luz ultra violeta.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

El término "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR), se aplica al proceso bioquímico *in vitro* mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por la DNA polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 25-35) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico sometido al proceso.

En general los componentes requeridos para una PCR son: DNA ; iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación, se unen al extremo 3' de cada una de las cadenas de DNA ; mezcla de desoxinucleótidos (dNTP'S) ; Solución amortiguadora de reacción y DNA polimerasa.

Cada uno de los ciclos de reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son :

1.- DESNATURALIZACIÓN (92-98 °C). La doble hélice de DNA blanco se separa o desnaturaliza, rompiéndose los puentes de hidrógeno existentes entre las bases de las dos hebras.

2.- ALINEAMIENTO. La temperatura disminuye (50-65°C) en presencia de los cebadores. Entonces, estos se unen específicamente en los extremos de la región a amplificar, cada uno en la hebra que le corresponde.

3.- EXTENSIÓN. La temperatura se eleva a 72° C; la DNA polimerasa alarga las nuevas hebras de DNA a partir de los cebadores, uniendo nucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) (Barrera H. et al, 1993).

Estas operaciones constituyen un ciclo de amplificación y resultan dos nuevas copias del fragmento de DNA. En el ciclo de amplificación siguiente, que pasa por las mismas tres etapas (desnaturalización y separación de hebras, unión de los cebadores y elongación), estas nuevas hebras servirán, a su vez, de moldes para la DNA polimerasa.

Componentes y condiciones generales de la reacción de PCR.

Las condiciones de la reacción de PCR que se presentan a continuación son las utilizadas en el Laboratorio de Genética de Hospital General de Mexico.

La técnica de PCR generalmente se realiza en un volumen total de 50 μ l contenidos en un microtubo de 700 o de 200 μ l, se mezclan los componentes especificados en la siguiente tabla y se cubre con una gota de aceite mineral.

	DNA	Agua	Amorti- guador	DNTPs	Oligo 1	Oligo 2	Taq
Paciente	1 μ l	39.2 μ l	5 μ l	4 μ l	0.3 μ l	0.3 μ l	0.2 μ l
CM	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
CF	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Blanco	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Mezcla de reacción	156.8 μ l	20 μ l	16 μ l	1.2 μ l	1.2 μ l	0.8 μ l

Nota : CM (Control Masculino), CF (Control Femenino), Blanco (No contiene DNA).

A cada tubo colocar 49 μ l de la mezcla de reacción más 1 μ l de DNA (0.5 ug)

La técnica de PCR se realiza al incubar las muestras a tres temperaturas diferentes correspondiendo cada una de ellas a las etapas del ciclo: desnaturalización , unión al cebador y extensión.

REGIONES ESPECÍFICAS ESTUDIADAS DEL CROMOSOMA "Y".

1. Y cen .

Para la región centromérica del cromosoma Y se utiliza el par de oligonucleótidos Y1 y Y2 que flanquea un fragmento de 170 pb de secuencias

alfoides repetidas de 5.5 kb de la región centromérica α satélite del cromosoma Y humano (Witt y Erickson, 1989).

GEN SRY .

Para la identificación de este gen se utiliza el par de oligonucleótidos **XES-2** y **XES-7** que flanquea una región de 601 pb (Affara et al, 1993).

GEN ZFY

Para el gen ZFY se utilizó el par de oligonucleótidos **ZFY-H** y **ZFY-G** que limita una región de 400 pb, localizado a 160 kb del límite pseudoautosómico de Yp (Ebeusperger et al, 1989) .

Yqh. REGION HETEROCROMATICA DEL CROMOSOMA Y.

El par de oligonucleótidos **Y1.1** y **Y1.2** flanquea una región de 154 pb de una secuencia repetida de 3.4kb del brazo largo del cromosoma Y (Nakahori et al, 1986).

6.0 RESULTADOS

Se estudiaron un total de 76 pacientes con fenotipo de síndrome de Turner, el motivo de la consulta fue linfedema en manos y pies en las recién nacidas, talla baja en las niñas y amenorrea primaria en las adolescentes.

Se le realizó estudio citogenético a todas las pacientes que presentaban fenotipo de síndrome de Turner, analizándose un total de 100 metafases por paciente. Se excluyeron las pacientes mosaicos con una segunda línea celular con un cromosoma X normal o anormal y aquellas con anomalías estructurales del cromosoma X quedando un total de 63 pacientes para el estudio.

En la tabla 4 se muestran los resultados del análisis citogenético de las 76 pacientes originales.

TABLA 4

CARIOTIPO EN 76 PACIENTES CON SINDROME DE TURNER

No Casos	Cariotipo
1	45,X/46,XY
1	45,X/46,XYqh-
6	45,X/46,XX*
7	45,X/46,X + anomalía estructural del X*
8	45,X/46,X + mar
53	45,X

*Pacientes excluidas del estudio

Resultados de Citogenética:

De las 63 pacientes incluidas en el estudio, 8 (T 1, T 9, T 13, T 35, T63, T68, T69 y T72) presentaban un mosaico con dos líneas celulares, una monosómica para el cromosoma X (45, X), y la segunda con un cromosoma marcador (46, X + mar). El cromosoma anormal era un anillo pequeño en los pacientes T 1, T 9 y T68 y de tamaño intermedio en las 5 restantes (Figuras 2 y 3). La paciente T 3 presentaba un mosaico 45, X / 46, XY y se utilizó como

positivo. La paciente T73 presentaba un cariotipo 45,X/ 46,X Yqh-. Las 53 pacientes restantes presentaban un cariotipo 45,X.

Resultados Moleculares:

El estudio molecular se llevó a cabo en 63 pacientes: de los 8 cromosomas marcadores sólo la paciente T1 presentaba secuencias del cromosoma Y y fue positiva únicamente para secuencias centroméricas y para la región heterocromática del brazo largo del cromosoma Y. Las pacientes T3 (45,X/46,XY) y T73 (45,X/46,Xyqh-) fueron positivas para todas las secuencias estudiadas.

Además, cuatro pacientes con cariotipo 45,X fueron positivas para diferentes secuencias del cromosoma Y.

En la tabla 5 se muestra el cariotipo, edad y talla de las pacientes 45,X y 45,X/46,X+mar.

En la tabla 6 se muestran los resultados moleculares de las pacientes con cromosoma marcador y de las pacientes T3 (45,X/46,XY) y T73 (45,X/46,Xyqh-). Las pacientes T9,T13, T35,T63,T68, T69 y T72 fueron negativas para las secuencias estudiadas, por lo que el marcador podría corresponder al cromosoma X.

En la tabla 7 se muestran los hallazgos moleculares de las pacientes con cariotipo 45,X con secuencias positivas del cromosoma Y.

TABLA 5

Cariotipo, edad y talla de pacientes con secuencias del cromosoma Y.

PACIENTE	CARIOTIPO	EDAD(años)	TALLA (m)
T 1	45, X / 46, X + mar	20	1.42
T 3	45, X / 46, XY	20	1.31
T 22	45, X	13	1.38
T 31	45, X	14	1.26
T 32	45, X	15	1.30
T50	45,X	14	1.31
T 73	45, X/ 46,XYqh-	19	1.42

TABLA 6
 RESULTADO DE PACIENTES CON CARIOTIPO 45,X/46,X + mar.

PACIENTE	CARIOTIPO	Y cen	ZFY	SRY	Yqh
T1	45,X/46,X + mar	+	-	-	+
T3	45,X/46,XY	+	+	+	+
T9*	45,X/46,X + mar	-	-	-	-
T13*	45,X/46,X + mar	-	-	-	-
T35*	45,X/46,X + mar	-	-	-	-
T63*	45,X/46,X + mar	-	-	-	-
T68*	45,X/46,X + mar	-	-	-	-
T69*	45,X/46,X + mar	-	-	-	-
T72*	45,X/46,X + mar	-	-	-	-
T73	45,X/46,X, Yqh-	+	+	+	+

* Pacientes con marcador probablemente derivado del cromosoma X.

TABLA 7
 RESULTADO DE PACIENTES CON CARIOTIPO 45,X CON SECUENCIAS
 POSITIVAS DEL CROMOSOMA Y

PACIENTE	CARIOTIPO	Ycen	ZFY	SRY	Yqh
T22	45,X	+	-	-	-
T31	45,X	+	+	+	+
T32	45,X	+	+	+	-
T50	45,X	+	+	+	+

Las 49 pacientes restantes no presentaron marcadores citogenéticos y además fueron negativas para secuencias del cromosoma Y.

Las figuras **4,6,8 y 10** muestran los resultados de los controles masculino y femenino y de las pacientes T1,T3,T9,T13,T22,T31,T32,T35 y T50 y las figuras **5,7,9 y 11** de las pacientes T63,T68,T69,T72 y T73 y los controles masculino y femenino.

En las figuras **4 y 5** se muestran los resultados correspondientes a la identificación de secuencias centroméricas del cromosoma Y mediante PCR. Estos resultados indican que 7 pacientes fueron positivas para estas secuencias. El resto de pacientes fueron negativas para esta región.

En las **figuras 6 y 7** se muestran los análisis por PCR para la banda específica del gen ZFY. Esta banda de 400 pb se observa en las pacientes T3, T31, T32, T50, T73 y en el control masculino. En los casos T3 y T73 se confirma la presencia de esta región del cromosoma Y.

La ausencia de ZFY en la paciente T1 indica que el punto de ruptura en la formación del anillo está por debajo de la región YP11.3.

La región SRY analizada mediante PCR, **figuras 8 y 9**, muestra los resultados de esta amplificación en las 14 pacientes Turner antes señaladas y en los controles. Sólo se observó la presencia de una banda 609 pb correspondiente a SRY en las pacientes T3, T31, T32, T50 y T73.

En el primer caso, T3 con cariotipo 45, X/ 46,XY, indica la presencia de SRY en el cromosoma Y, mientras que en T31, T32, T50 y T73 demuestran la existencia de esta región Yp en el genoma. La ausencia de SRY en T1 es congruente con la ruptura de Yp por debajo de ZFY.

Las **figuras 10 y 11** muestran el análisis para secuencias en Yqh. La banda de 154 pb se observa en las pacientes T1,T3,T31, T50 y T73.

En las pacientes T9, T13, T35, T63, T68, T69 y T72 la ausencia de secuencias centroméricas del Y permiten proponer que los marcadores citogenéticos correspondan al cromosoma X.

De acuerdo a estos resultados se analizaron 400 metafases en las pacientes T22, T31, T32 y T50 encontrando un pequeño cromosoma marcador en 2 de 400 células únicamente en T32.

Se confirma que la paciente T73 tiene un cariotipo 45,X/ 46,X,Yqh-.

7.0 DISCUSION

Las características del síndrome de Turner son talla baja, disgenesia gonadal y anomalías somáticas específicas (Grumbach y Conte,1992).

Varios estudios han mostrado que entre 40 y 60% de pacientes con este fenotipo son monosómicas para un cromosoma X , el resto tienen un cromosoma X ó Y estructuralmente anormal o son mosaicos con una segunda línea celular con un cromosoma sexual normal o anormal (Park et al,1983; Gicquel et al,1992). Las pacientes con cariotipo 45,X representan aproximadamente 1 a 2% de las recién nacidas (de la Chapelle,1983), sin embargo 98 a 99% de los embriones 45,X son espontáneamente abortados durante el embarazo temprano (Hook y Warburton,1983).

Con las nuevas técnicas de citogenética y biología molecular, Held et al (1992) demostraron una alta frecuencia de mosaicismo en linfocitos y fibroblastos de pacientes con síndrome de Turner, debido al hallazgo principalmente de cromosomas marcadores. El análisis citogenético detecta mosaicismo con cromosoma Y en aproximadamente 5.5% de las pacientes con síndrome de Turner (Ostrer y Clayton,1989). Además, se ha demostrado que la mitad de los cromosomas marcadores provienen del cromosoma Y (Nagafuchi et al,1992).

Con el objeto de conocer la frecuencia de mosaicismo del cromosoma Y en pacientes mexicanas con síndrome de Turner se estudiaron 76 pacientes, de las cuales se excluyeron 13 debido a que eran mosaicos con una segunda línea celular con un cromosoma X normal o anormal o tenían anomalías estructurales del X, quedando un total de 63 pacientes.

Los datos citogenéticos iniciales mostraron que de las 63 pacientes estudiadas con síndrome de Turner: 53 eran 45,X (84%); 8 (12.7%) tenían un cariotipo:45,X/46,X + mar, 1 (1.6%) presentó un cariotipo 45,X/46,XYqh- y 1 (1.6%) era 45,X/46,XY. Esta frecuencia es similar a la reportada por Held et al (1992) y Medlej et al (1992), sin embargo la frecuencia reportada por otros autores es muy variable (Binder,1995;Coto,1995; Fernández,1996).

Los estudios moleculares realizados a las 63 pacientes demostraron que 4 casos 45,X presentaban material del cromosoma Y, observándose diferentes secuencias de este cromosoma . En las pacientes T31 y T50 todas las secuencias estudiadas fueron identificadas, sugiriendo la presencia de un cromosoma Y no detectado por citogenética. La paciente T22 únicamente tenía secuencias centroméricas del Y, probablemente debido a la presencia de un cromosoma Y muy pequeño, y T32 tenía secuencias centroméricas, SRY y ZFY, pero Yqh estaba ausente.

De las pacientes con cromosoma marcador únicamente la paciente T1 fue positiva para secuencias centroméricas y para la región heterocromática del cromosoma Y, lo que sugiere que el marcador provenía del Y con punto de ruptura por debajo de Yp11.3 . El resto de los cromosomas marcadores son

probablemente derivados del X, aunque sería necesario realizar el estudio molecular con marcadores para el cromosoma X para comprobarlo.

En la paciente T73 se demostró el cariotipo 45,X/46,XYqh- ya que presentaba todas las secuencias del cromosoma Y estudiadas. La paciente T3 (45,X/46,XY) sirvió de control positivo.

El análisis citogenético subsecuente en las pacientes 45,X positivas con 400 metafases, únicamente demostró un cromosoma marcador en 2 células en la paciente T32.

Estos datos indican que del estudio de los 8 cromosomas marcadores 12.5% correspondían al cromosoma Y y de las 53 pacientes 45,X: 7.5% fueron positivas para secuencias de este cromosoma. La frecuencia total de este estudio, excluyendo a las pacientes T3(45,X/46,XY) y a T73 (45,X/46,XYqh-) es de 8.2% de pacientes positivas para secuencias del cromosoma Y.

La frecuencia de cromosomas marcadores derivados del cromosoma Y difiere en varios estudios (tabla 3):

En el estudio realizado por Held (1992) aunque el análisis citogenético se realizó en 91 pacientes, el estudio molecular por medio de transferencia tipo Southern y PCR para secuencias centroméricas del Y fue únicamente realizado en 8 pacientes con cromosoma marcador, encontrándose una frecuencia de 9.1% para secuencias centroméricas del Y.

Existen estudios como los de Nagafuchi (1992) y Kuznetzova (1995) que únicamente incluyen pacientes con cromosoma marcador encontrándose una frecuencia de 56% y 62.5%, respectivamente. Estas variaciones probablemente sean debidas al diferente número de pacientes estudiadas con cromosoma marcador y a las técnicas utilizadas.

El resto de los estudios reporta pacientes con diferentes cariotipos:

Medlej (1992) amplificó únicamente SRY en 40 pacientes, encontrando 1 caso positivo en una paciente 45,X. Kokova (1993) reporta la detección de SRY por PCR seguido por Southern en 18 pacientes con discrepancia en los resultados según la metodología utilizada. Sorprendentemente, una de las pacientes SRY positiva era 45,X/46,XX y otra 45,X/47,XXX.

Binder (1995) en 53 pacientes, Coto (1995) en 18 pacientes y Fernández (1996) en 25 pacientes amplifican secuencias similares del cromosoma Y y encuentran que las frecuencias para secuencias de este cromosoma en pacientes 45,X son: 3.3%, 26.6% y 9.1%, respectivamente; pero si todas las pacientes son consideradas las frecuencias son: 5.7%, 61% y 4%, respectivamente.

Al contrario, Larsen (1995) y Jacobs (1997) no encuentran material derivado del cromosoma Y en 40 y 211 casos, respectivamente.

Estudios recientes, Quilter (1998) y Patsalis (1998), estudian 50 pacientes cada uno encontrando una frecuencia de 4% y 24%, respectivamente.

Es difícil comparar nuestra frecuencia con la de estudios previos debido a la variabilidad en: 1.- el número de pacientes estudiadas y de secuencias del cromosoma Y analizadas, 2.- la frecuencia de mosaicismo con un cromosoma X normal o anormal, 3.- el número diferente de casos con cromosoma marcador y 4.- el número de metafases analizadas por citogenética.

Estos resultados demuestran la gran sensibilidad de la metodología molecular. Además, siempre que las secuencias del Y estaban presentes, la región centromérica de este cromosoma era positiva, sugiriendo la presencia de una segunda línea celular con un cromosoma Y normal o anormal.

Aunque Ogata y Matsuo (1995) han propuesto genes candidatos anti-Turner, este estudio no permite obtener conclusiones acerca de la presencia o ausencia de genes específicos ni correlacionarlos con características fenotípicas en estas pacientes.

Dos genes candidatos anti-Turner han sido reportados además de SHOX, el gen RPS4X el cual se localiza en Xq y fue encontrado en dos copias activas en líneas celulares de pacientes con síndrome de Turner (Just et al,1992) y no fue incluido en nuestro estudio y el par ZFX/ZFY el cual es un fuerte candidato debido a su localización y a que estudios en ratones con mutaciones en este gen demuestran talla baja, viabilidad disminuida y bajo número de células germinales (Luoh et al,1997). En nuestro estudio 3 pacientes 45,X fueron positivas para ZFY, por lo que debido al pequeño número de la muestra no se pueden realizar conclusiones acerca de la implicación de este gen como candidato para síndrome de Turner.

La talla en relación con la edad de nuestras pacientes es muy variable lo que podría deberse a la proporción de cada línea celular encontrada (45,X y 46,X + marcador ó 46,XY). Sería necesario estudiar genes específicos para estatura como el gen SHOX (Rao et al,1997) para poder correlacionar nuestros datos.

Las pacientes con síndrome de Turner con una segunda línea celular con cromosoma Y tienen 15 a 20% de riesgo de desarrollar gonadoblastoma (Verp and Simpson,1987), no habiéndose localizado aún el gen GBY que predispone al desarrollo de este tumor. El gen GBY puede estar localizado cerca de la región centromérica del Y o dentro de Yp (Tsuchiya,1995).

Por lo anterior, se sugirió la extirpación preventiva de las estrias fibrosas en todas las pacientes positivas para evitar el riesgo de malignización, observándose sólo en la paciente T50 la presencia de gonadoblastoma. Debido a que esta pacientes presentaba todas las secuencias estudiadas del cromosoma Y no fue posible correlacionar la probable localización de GBY.

Estos resultados refuerzan la importancia de identificar material proveniente del cromosoma Y, el cual pudiera determinar cierto fenotipo de las pacientes con síndrome de Turner y enfatizan la importancia de la extirpación quirúrgica de las gónadas disgenéticas en pacientes positivas hasta que el *locus* GBY sea precisamente localizado.

La terapia con hormona de crecimiento en las pacientes con síndrome de Turner es de gran importancia para poder alcanzar una talla más alta y la administración de estrógenos puede prevenir complicaciones como osteoporosis. Este tratamiento debe iniciarse tempranamente para disminuir los efectos psicológicos adversos en las pacientes.

8.0 CONCLUSIONES

1. El estudio molecular mediante PCR permitió la identificación de secuencias del cromosoma Y en nuestras pacientes.
2. De todas las pacientes estudiadas, el 11.1% presentaron secuencias del cromosoma Y.
3. Cuatro pacientes con cariotipo 45,X (7.5%) presentaron secuencias del cromosoma Y.
4. La frecuencia de cromosomas marcadores derivados del cromosoma Y fue de 12.5%.
5. La detección de secuencias del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner es importante para la prevención del desarrollo de tumores gonadales.
6. Las pacientes con síndrome de Turner deben ser valoradas multidisciplinariamente para su tratamiento y prevención de complicaciones.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ acepto de forma voluntaria que me sean practicados los estudios necesarios de ADN para tratar de diagnosticar mi enfermedad, prevenir posibles complicaciones o identificar si existe la posibilidad de que otra persona pudiera estar afectada en mi familia. Se me ha informado adecuadamente de las características del estudio el cual requerirá de la toma de 5 ml de sangre mediante punción venosa. Esta punción podría ocasionarme molestias mínimas solamente como la formación de un pequeño hematoma. Se me ha asegurado también que el ADN que se obtenga no será usado para otro fin que no sea el de investigar la causa de mi enfermedad.

Es también de mi conocimiento que de rehusarme al estudio, esto no modificaría la calidad de atención que recibo por parte de la institución

ATENTAMENTE

Nombre: _____ Firma _____

Dirección _____

Médico Responsable _____ Firma _____

México, D.F a ____ de _____ de 19__.

TABLA 1

PORCENTAJES DE LOS PRINCIPALES CARIOTIPOS EN SINDROME DE TURNER

CARIOTIPO	Palmer y Reichman 1976	Armendares y Salamanca 1977	Hall et al 1982	Park et al 1983	Held et al 1992	Miranda 1994
45,X	58.2	68.9	55	61.2	20.7	53.1
46,Xi(Xq)	7.3	10.8	5.5	6	5.7	3.5
45,X/46,XX	8.2	6.7	13.4	11.2	17.2	23.5
45,X/46,Xi(Xq)	11.8	10.8	4.7	7.8	12.6	4.7
45,X/46,Xr(X)	5.5	1.3	3.9	1.7	3.5	1.2
45,X/46,XY	5.4	2.7	3.1	2.6	2.3	2.3
45,X/46,Xdel(Xp)	0.9	4.05	0.8	2.6	2.3	2.3
45,X/46,Xdel(Xq)	0	0	1.6	1.7	3.5	1.2
45,X/46,XX/47,XXX	1.8	4	0.8	0.9	6.9	4.6
45,X/46,X+mar	0	0	0.8	0	18.4	0

TABLA 2
ANOMALIAS CLINICAS Y FISIOLÓGICAS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER (Lippe,1991):

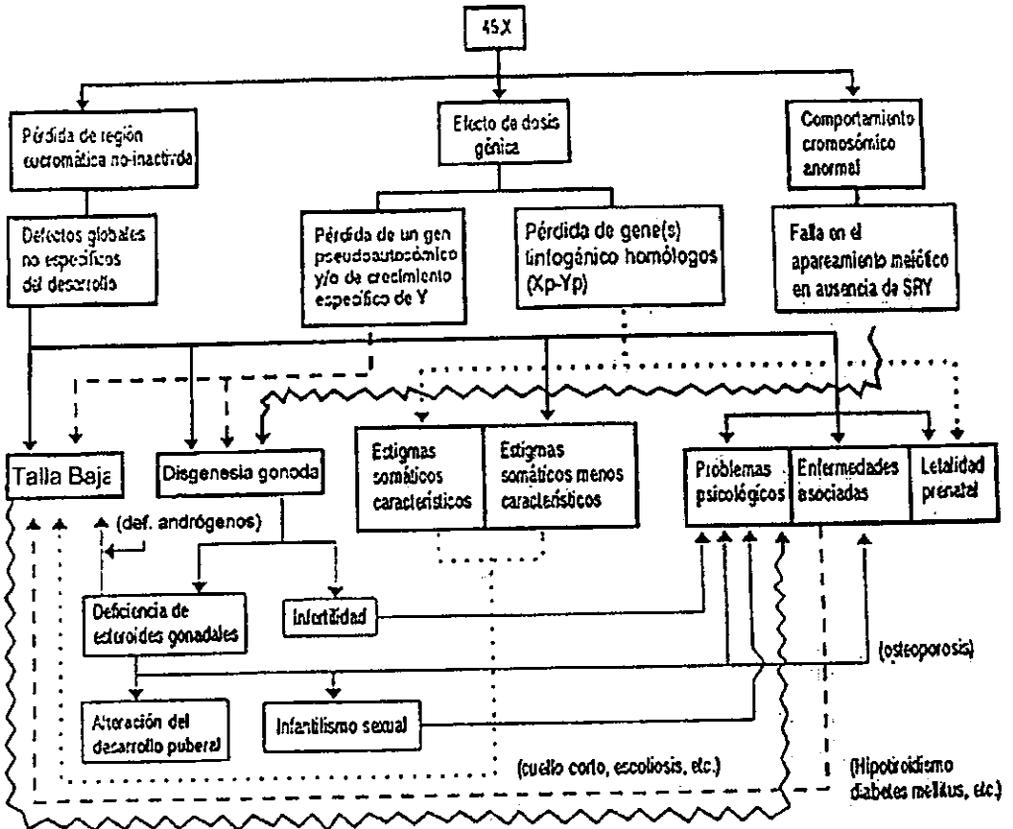
Defecto Primario	Características secundarias
Anomalías Esqueléticas	Talla baja (133 a 137cm en pacientes mexicanas 45,X) Facies característica con micrognatia Paladar alto Otitis media Cuello corto <i>Cubitus valgus</i> Deformidad de Madelung Metacarpos cortos Índice anormal de segmentos superior/inferior Escoliosis Geno valgo
Anomalías de células germinales	Disgenesia gonadal Infertilidad Gonadoblastoma
Obstrucción linfática	Pabellones auriculares rotados Línea de implantación de cabello baja Cuello alado Edema de manos y pies Displasia severa de uñas
Otros Embriogénicos:	Anomalías cardiovasculares: Coartación de aorta Valvas aórticas bicúspides Comunicación interventricular e interauricular. Dextrocardia Hipoplasia ventricular izquierda

Hipertensión
Anomalías renales y renovasculares :
 Riñón en herradura
 Doble sistema colector
 Agenesia renal unilateral
 Malrotación renal
 Hidronefrosis
Múltiples nevos pigmentados

Fisiológicos,
Metabólicos

Tiroiditis de Hashimoto
Hipotiroidismo
Alopecia
Vitiligo
Alteraciones gastrointestinales
Intolerancia a carbohidratos
Estrabismo
Ptosis

Fig. 1 Representación esquemática de la hipótesis de síndrome de Turner



(Tomada de Ogata y Matsuo, 1995)

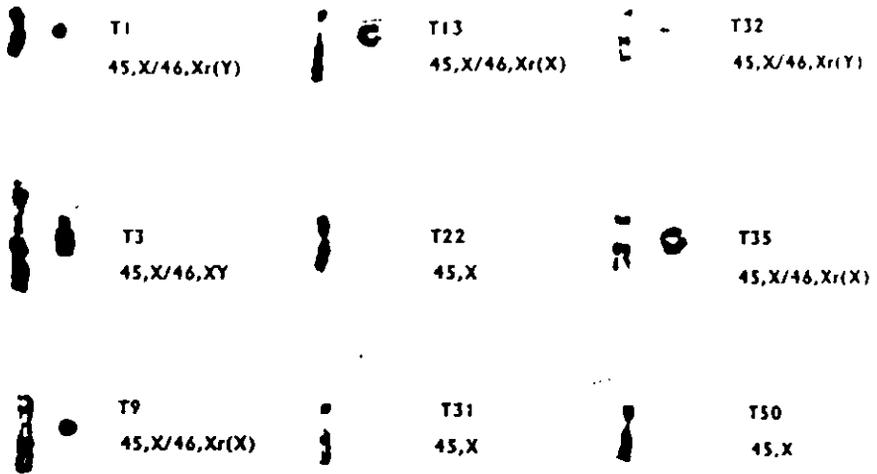


Figura 2 Cariotipos parciales Finales de las pacientes T1, T3, T9, T13, T22, T31, T32, T35 y T50

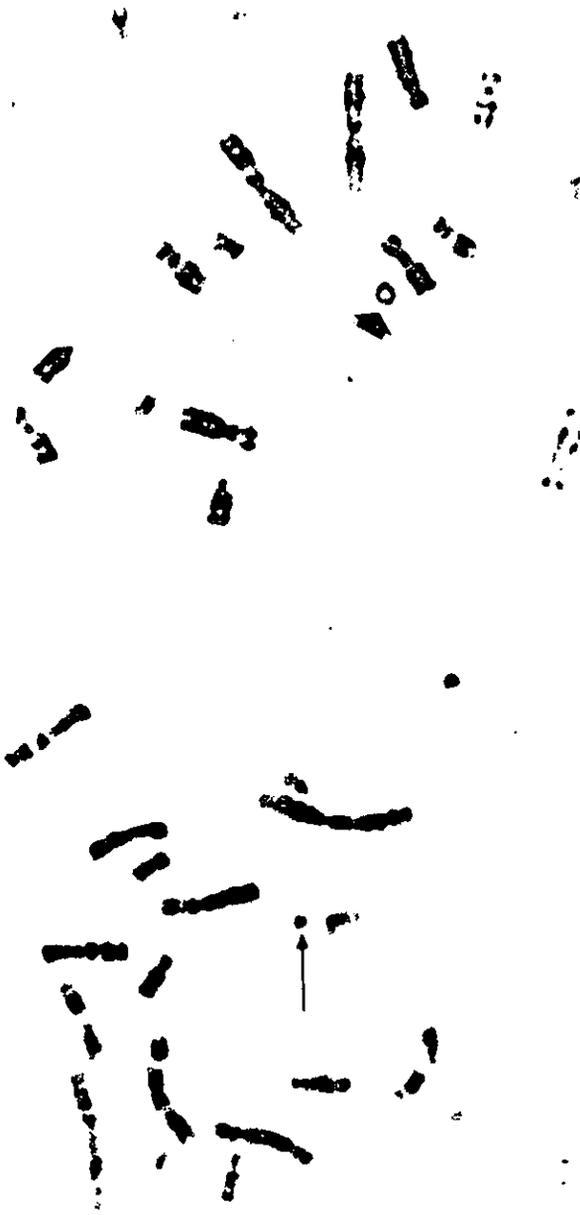


FIGURA 3. CARIOTIPOS PARCIALES FINALES DE LAS PACIENTES T63 Y T68 (45,X/46,X + mar)

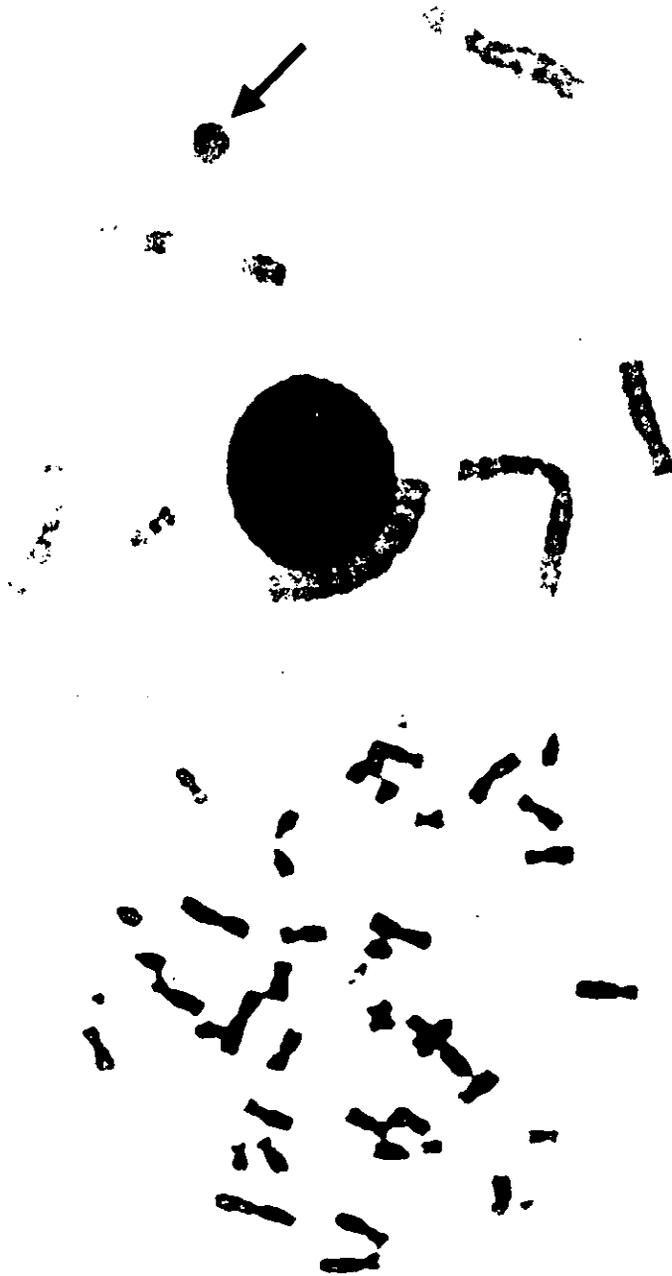


FIGURA 3. CARIOTIPOS PARCIALES FINALES DE LAS PACIENTES T69 Y T72 (45,X/46,X + mar)

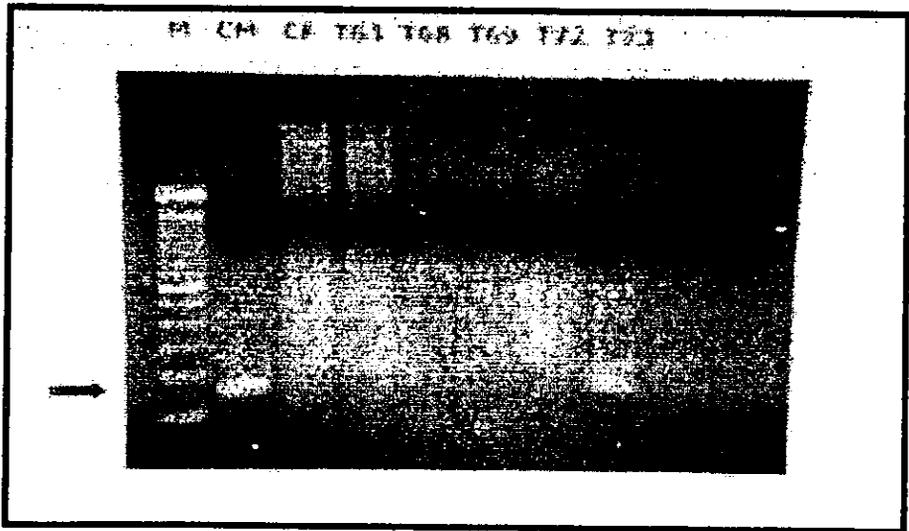
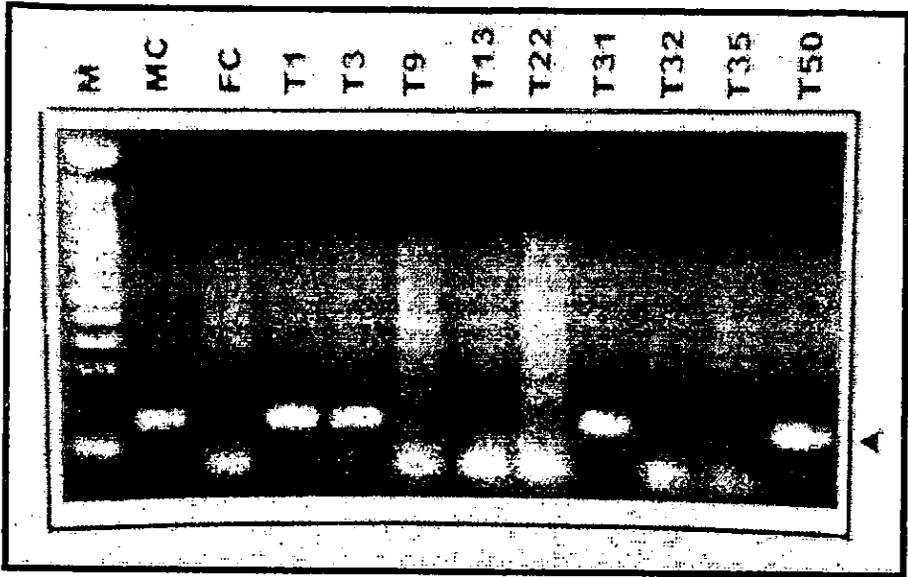


FIGURA 10 Y 11. Análisis por electroforesis de productos de amplificación por PCR para secuencias en Yqh. M: marcador de peso molecular; MC: control masculino; FC: control femenino. Positivo para las pacientes T1, T3, T31, T50 y T73.

9.0 BIBLIOGRAFIA

- Affara NA, Ferguson-Smith MA. DNA sequences homology between the human sex chromosomes. In: Molecular genetics of sex determination. *Hum Mol Genet* 2:6:785-90,1993.
- Alvesalo K, de la Chapelle. Tooth sizes in two males with deletions of the long arm of the Y chromosome. *Ann Hum Genet* 45:49-54,1981
- Allen DB, Hendricks SA, Levy JM. Aortic dilation in Turner syndrome. *J Pediatr* 109:302,1986.
- Anderson H, Filipsson R, Fluor E. Hearing impairment in Turner syndrome. *Acta Otolaryngol (Suppl)* 247:1,1969.
- Arnemann J, Eppelen JT, Cooke HJ, Sauermann U, Engel W, Schmidtke J. A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids Res* 15:8713-8724,1987.
- Ausubel AM, Frederick. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and sons, New York, 1987.
- Barboux S, Vilain E, Raoul O, Gilgenkrantz S, Jeandidier E, Chadenas D, Souleyreau N, Fellous M, McElreavey K. Proximal deletions of the long arm of the Y chromosome suggest a critical region associated with a specific subset of characteristic Turner stigmata. *Hum Mol Genet* 4:9:1565-1568, 1995.
- Barr ML, Bertram EG. A morphological distinction between neurons of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163: 676-677,1949.
- Barrera H, Ortiz R, Rojas A, Reséndez D. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo*. Enero/Febrero,50-59,1993.
- Bercu BB, Kramer SS, Bode HH. A useful radiologic sign for the diagnosis of Turner's syndrome. *Pediatrics* 48:737,1976.
- Binder G, Koch A, Wajs E, Ranke M. Nested Polymerase Chain Reaction Study of 53 cases with Turner's syndrome: Is Cytogenetically undetected Y mosaicism common?. *J Clin Endocrinol Metab* 80;12:3532-3536, 1995.
- Blagowidow N,Page DC, Huff D, Mennutti MT. *Am J Med Genet* 34:159-162,1989.
- Brockdorff N. The role of Xist in X-inactivation. *Curr Opin in Genet and Dev* 8:328-333,1998.
- Brook CGD, Gasser T, Werder EA, Prader A, Vanderschueren-Lodewykx MA. Height correlations between parents and mature offspring in normal subjects and in subjects with Turner's and Klinefelter's and other syndromes. *Ann Hum Biol* 4:17-22,1977.
- Brown JC, Ballabio A, Rupert LJ, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*. 349:38-44,1991.
- Brown CJ, Willard HF: Molecular and genetic studies of human X chromosome inactivation. *Adv Dev Biol* 2:37,1993.
- Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 31:164-165,1985.
- Burgoyne PS, Evans EP, Holland K. *J. Reprod Fertil*.68:381-385,1983.
- Carothers AD, Frackiewicz A, DeMey R, et al. A collaborative study of the aetiology of Turner syndrome. *Hum Genet* 43:355-367,1980.
- Carr DH, Haggard RA, Hart AG. Germ cells in the ovaries of XO female infants. *Am J Clin Pathol* 49:521-526,1968.
- Cattanach BM, Papworth D. Controlling elements in the mouse V. Linkage tests with X-linked genes. *Genet Res* 38,57-70,1981.
- Chandley AC, Goetz P, Hargreave TB, Joseph AM, Speed RM. On the nature and extent of XY pairing in meiotic prophase in man. *Cytogenet Cell Genet* 38:241-247,1984.
- Charlesworth B. The evolution of sex chromosomes. *Science* 251:1030-1033,1991.
- Clark EB. Neck web and congenital heart defects: a pathogenic association in 45,X-O Turner syndrome? *Teratology* 29:355-61,1984.
- Connor JM, Loughlin SAR. Molecular Genetics of Turner's syndrome. *Acta Paediatr Scand (Suppl)* 356:77-80, 1989.

- Conte FA, Grumbach MM. Photogenesis, classification, diagnosis and treatment of abnormalities of sex. En *Textbook of Endocrinology*. De de Groot L et al. Vol 3 Cap 109 pp.1810. WB Saunders Co London, 1989.
- Cooke HJ, Fantes J, Greene D. Structure and evolution of human Y chromosome DNA. *Differentiation* 23: S48-S55, 1983.
- Cooke H. The continuing search for the mammalian sex determining gene. *Trends in Genetics* 6: 273-275, 1990.
- Cooper C, Crolla JA, Laister C, Johnston DI, Cooke P. An investigation of ring and dicentric chromosomes found in three Turner syndrome patients using DNA analysis and in situ hybridisation with X and Y chromosome specific probes. *J Med Genet* 28:6-9, 1991.
- Coto E, Toral J, Menéndez M, Hernando Y, Plasencia A, Benavides A, López-Larrea C. PCR- Based study of the presence of Y- chromosome sequences in patients with Ulrich- Turner Syndrome. *Am J Med Genet* 57: 393-396, 1995.
- Cuevas- Covarrubias SA, Kofman-Alfaro SH. El cromosoma Y humano. *Rev Invest Clin* 42:290-297,1990
- Darlington CD. *Recents advances in cytology*. 2a.ed. 1937.
- Davies K. The essence of inactivity. *Nature* 349:15-16,1991.
- De Arce MA, Gosden C, Humphries L. Further evidence consistent with Yqh as an indicator of risk of gonadoblastoma in Y-bearing mosaic Turner syndrome. *Clin Genet* 41:28-32, 1992.
- De la Chapelle A, Stenstrand K. Dicentric human X isochromosomes. *Heredity* 76:259-68,1974.
- Dennis NR, Collins AL, Crolla JA, Cockwell AE, Fisher AM, Jacobs PA. Three patients with ring (X) chromosomes and a severe phenotype. *J Med Genet* 30:482-486, 1993.
- D'Esposito M, Matarazzo MR, Ciccodicola A, Strazzullo M, Mazzarella R, Quaderi N, Fujiwara H, Ko M, Rowe L, Ricco A, Archidiacono N, Rocchi M, Schlessinger D, D'Urso M. Differential expression pattern of XqPAR-linked genes SYBL1 and IL9R correlates with the structure and evolution of the region. *Hum Molec Genet* 6:11:1917,1923,1997.
- Disteche CM, Casanova M, Saal H, Friedman C, Sybert V, Graham J, Thuline H, Page DC, Fellous M. Small deletions of the short arm of the Y chromosome in 46,XY females. *Pro Natl Acad Sci USA* 83:7841-7844,1986.
- Ebeusperget et al. A rapid method for detection of Y chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 82:289-290,1989.
- Ellison JW, Ramos C, Yen PH, Shapiro LJ. Structure and expression of the human pseudoautosomal gene XE7. *Hum Molec Genet* 1:691-96, 1992.
- Erickson RP, Hudgins L, Stone JF, Schmidt S, Wilke C, Glover TW. A "balanced" Y;16 translocation associated with Turner-like neonatal lymphedema suggests the location of a potential anti-Turner gene on the Y chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 71:463-467, 1995.
- Felix A,Capek V, Pashayan M: The neck in the XO and XX/XO mosaic Turner's syndrome. *Clin Genet* 5:77,1974.
- Ferguson-Smith MA, Cooke A, Affara NA, Boyd E, Tolmie JL. Genotype-phenotype correlations in XX males and their bearing on current theories of sex determination. *Hum Genet* 84:198-202,1990
- Ferguson-Smith MA. Genotype-phenotype correlations in individuals with disorders of sex determination and development including Turner syndrome. *Semin Dev Biol*:2:277-84 1991.
- Fernández R, Méndez J, Pásaro E. Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. *Hum Genet* 98:29-35, 1996.
- Fisher EMC, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Bentley L, Willard HF, Bieber FR, Page DC. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* 63: 1205-1218, 1990.
- Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1:711-713, 1959.
- Ford EHR. *Human Chromosomes*. Ed. Academic Press.381 pags, London 1973.
- Freije D, Helms C, Watson MS, Donis-Keller H. Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomeres. *Science* 258:1784-1787,1992.
- Gartler SM, Riggs AD. Mammalian X chromosome inactivation. *Ann Rev genet.* 17:155-190, 1983.
- Geerckens C,Just W,Vogel W. Deletions of Xq and growth deficit- a review. *Am J Med Genet* 50:105-13,1994.

- Kofman-Alfaro S, Aizpuru VE. Inactivación del cromosoma X. en *Genética Clínica*. Ed: Manual Moderno. México, 1987.
- Koller M. A study about sex chromosomes conduct in meiosis. In. *Sex Chromosomes*. Ed Academic Press, London, 1967.
- Kuznetzova T, Baranov A, Schwed N, Ivaschenko T, Malet P, Giollant M, Savitsky GA, Baranov V. Cytogenetic and molecular findings in patients with Turner stigmata syndrome. *J Med Genet* 32:962-967, 1995.
- Lahn B, Page D. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:24 Oct, 1997.
- Larsen T, Gravholt CH, Tillebeck A, Larsen H, Jensen MB, Nielsen J, Friedrich U. Parental origin of the X chromosome, X chromosome mosaicism and screening of the "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. *Clin Genet* 48:6-11, 1995.
- Lindgren V, Chen C, Bryke C, Lichter P, Page D, Yang-Feng T. Cytogenetic and molecular characterisation of marker chromosomes in patients with mosaic 45,X karyotypes. *Hum Genet* 88:393-398, 1992.
- Lindsten J, Cerasi E, Luft R. The occurrence of abnormal insulin and growth hormone (HGH) responses to sustained hyperglycaemia in a disease with sex chromosome aberrations. *Acta Endocrinol* 56:107, 1967.
- Lippe B. Turner syndrome. *Endocrinol and Met Clinics of North America* 20;1:121-152, Marzo 1991.
- Litvak AS, Rousseau TG, Wrede LD. The association of significant renal anomalies with Turner's syndrome. *J Urol* 120:671, 1991.
- Litvak AS, Rousseau TC, Wrede LD, et al. The association of significant renal anomalies with Turner's syndrome. *J Urol* 120:671, 1978.
- López-López M, Torres Maldonado LC, Méndez JP, Cervantes A, Canto P, Pérez-Palacios G, Kofman-Alfaro S. Detección molecular de secuencias de ADN derivadas del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner. *Rev Invest Clin* 45:233-239, 1993.
- Louh S-W, Bain PA, polakiewicz RD, Goodheart ML, Gardner H, Jaenisch R, Page DC. Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development* 124:2275-2284, 1997.
- Loughlin SAR, Redha A, McIver J, et al. Analysis of the origin of the Turner's syndrome using polymorphic DNA probes. *J Med Genet* 28 (3):156-158, 1991.
- Lukusa T, Fryns JP, van der Berghe H. Gonadoblastoma and Y chromosome fluorescence. *Clin Genet* 29:311-316, 1986.
- Lyon MF. Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.) *Nature* 190:372-373, 1961.
- Lyon MF, Rastan S. Parental source of chromosome imprinting and its relevance for X chromosome inactivation. *Differentiation* 26:63-67, 1984.
- Lyon AJ, Preece MA, Grant DB. Growth curve for girls with Turner syndrome. *Arch Dis Child* 60:932, 1985.
- Lyon MF. The William Allian Memorial Award Address: X chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. *Am J Hum Genet* 42: 8-16, 1988.
- Lyon MF. The quest for the X-inactivation centre. *Trends in Genet* 7:69-70, 1991.
- Madan K. Balanced structural changes involving the human X: effect on sexual phenotype. *Hum Genet* 63:216-221, 1983.
- Magenis RE, Breg WR, Clark KA, et al. Distribution of sex chromosome complements in 651 patients with Turner syndrome. *Am J Hum Genet* 32:79A, 1980.
- Magenis RE, Tochen ML, Holahan KP, Carey T, Allen L, Brown MG. Turner syndrome resulting from partial deletion of Y chromosome short arm. localization of male determinants. *J Pediatr* 105:916-919, 1984.
- Males JL, Seely JR. Turner's syndrome: index case after 44 years (A Tribute to Dr. Henry H. Turner). *J Clin Endocrinol Metab* 46:163, 1978.
- Mandel JL, Monaco AP, Nelson DL, Schlessinger D, Willard HF: Genome analysis and the human X chromosome. *Science* 258:103, 1992
- Marahrens Y, Ioring J and Jaenisch R. Role of the Xist Gene in X chromosome choosing. *Cell* 92:657-664, 1998.
- Mathur A, Stekol L, Schatz D, et al. The parental origin of the single X chromosome in Turner syndrome: Lack of correlation with parental age of clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 48:682-686, 1991.
- Mc Carrey JR, Dilworth DD. Expression of Xist in mouse germ cells correlates with X chromosome inactivation. *Nature Genet* 2:200-203, 1992.

- McGinniss M, Brown D, Burke L, Mascarello J, Jones M. Ring chromosome X in a child with manifestations of kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 70:37-42,1997.
- Medlej R, Lobaccaro JM, Berta P, Belon C, Ieuep B, Toublanc JE, Weill J, Chevalier C, Dumas R, Sultan C. screening for Y-Derived Sex Determining Gene SRY in 40 Patients with Turner Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 75;5:1289-1292, 1992.
- Meindl A, Hosenfeld D, Brückl W, Schuffenhauer S, Jendery J, Bacskulin A, Oppermann HC, Swensson O, Bouloux P, Meitinger T. Analysis of a terminal Xp22.3 deletion in a patient with six monogenic disorders: implications for the mapping of X linked ocular albinism. *J Med Genet* 30:838-842,1993.
- Miranda A. Estudio clinico citogenético de pacientes con alteraciones numéricas y estructurales del cromosoma X. Tesis de Posgrado,1994.
- Müller U, Kirkels VGHJ, Schleres JMJ. Absence of Turner stigmata in a 46,Xyp- female. *Hum Genet* 90:239-242, 1992.
- Mulvihill JJ, Wade WM, Miller RW. Gonadoblastoma in dysgenetic gonads with a Y chromosome. *Lancet* 863,1975.
- Muscattelli F, Lena D, Mattei MG, Fontes M. A male with two contiguous inactivation centers on a single X chromosome: Study of X inactivation and XIST expression. *Hum Molec Genet* 1:115,1992.
- Nagafuchi S, Tamura T, Nakahori Y, Takano K, Nishi Y, Iwatani N, Kitao M, Hori Y, Konda S, Hasegawa T, et al. The majority of the marker chromosomes in Japanese patients with stigmata of Turner syndrome are derived from Y chromosomes. *Hum Genet* 89:590-592,1992.
- Nakahori Y, Hamano K, Iwaya M. Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous Primer. *Am J Med Genet* 39:472-473,1991.
- Nienhuis HE, Rongen-Westerlaken C, Wit JM et al. Results of long-term therapy with growth hormone in two dose regimens in Turner syndrome. *Horm Res* 39 (Suppl 2) 31-6,1993.
- Niikawa N, Kuroki Y, Kajii T, Matsuura N, Ishikiriyama S, Tonoki H, Ishikawa N, Yamada Y, Fujita M, Umemoto H et al. Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: A study of 62 patients. *Am J Med Genet* 31:565-589,1988.
- Ogata T, Goodfellow P, Petit C, Aya M, Matsuo N. Short stature in a girl with a terminal Xp deletion distal to DXYS15: localisation of a growth gene(s) in the pseudoautosomal region. *J Med Genet* 24:419-423,1992.
- Ogata T, Tyler-Smith C, Purvis-Smith S, Turner G. Chromosomal localisation of a gene(s) for Turner stigmata on Yp. *J Med Genet* 30:918-922,1993.
- Ogata T, Matsuo N. Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. *Hum Genet* 95:607-629,1995.
- Ohno S, Kaplan WD, Kinoshita R. Formation of the sex chromatin by a single X chromosome in the liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp Cell Res* 18:415-418,1959.
- Ostrer H and Clayton CM. Y chromosome mosaicism in 45,X Turner syndrome. *Am J Med Genet* 34:294-296,1989.
- Page DC. Hypothesis: A Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development Suppl* 101:151-155, 1987.
- Page DC, Mosher E, Simpson E, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown L. The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51:1091-1104, 1987a.
- Painter G. Mechanisms of sexual determination. In: *Sex chromosomes*. Mittwoch U. Ed Academic Press, London,1967.
- Palmer CG, Reichmann A. Chromosomal and clinical findings in 110 females with Turner syndrome. *Hum Genet* 35:35-49, 1976.
- Park E. Body shape in Turner's syndrome. *Hum Biol* 49:215,1977.
- Park E, Bailey JD, Cowell CA. Growth and maturation of patients with Turner's syndrome. *Pediatr Res* 17:1-7, 1983.
- Patsalis PC, Sismani C, Hadjimarco MI, Kitsiou-Tzeli S, Tzeou A, Hadjiathanasiou CG, Velissariou V, Lymberatou E, Moschonas NK, Skordis N. Detection and incidence of cryptic Y chromosome sequences in Turner syndrome patients. *Clin Genet* :53:249-257,1998

Petrovic V, Nasioulas S, Chow CW, Voullaire L, Schmidt M, Dahl H. Minute Y chromosome derived marker in a child with gonadoblastoma: cytogenetic and DNA studies. *J Med Genet* 29:542-546, 1992.

Polychronakoa C, Letarte J, Collu R. Carbohydrate intolerance in children and adolescents with Turner syndrome. *J Pediatr* 96:1009-14, 1980.

Price WH, Calyton JF, Collyer S. Mortality ratios, life expectancy, and causes of death in patients with Turner's syndrome. *J Epidemiol Community Health* 40:97, 1986.

Quilter CR, Taylor K, Conway GS, Nathwani N, Delhanty JDA. Cytogenetic and molecular investigations of Y chromosome sequences and their role in Turner syndrome. *Ann Hum Genet* 62:99-106, 1998.

Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesle B, Martz A, Muorya K y cols. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genetics* 16, mayo:54-63, 1997.

Rappold GA. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* 92:315-324, 1993.

Rastan S. X chromosome inactivation and the XIST gene. *Curr Opin Genet Dev* 4:292-297, 1994.

Reed T, Reichmann A, Palmer CG. Dermatoglyphic differences between 45,X and other chromosomal abnormalities of Turner syndrome. *Hum Genet* 36:13, 1977.

Reijo R, Lee t-Y, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet* 10,383- 393, 1995.

Robboy SJ, Miller T, Donahoe PK, Jahre C, Welch WR, Haseltine FP, Miller WA, Atkins L, Crawford JD. Dysgenesis of testicular and streak gonads in the syndrome of mixed gonadal dysgenesis: perspective derived from a clinicopathologic analysis of twenty-one cases. *Hum Pathol* 13:700-716, 1982.

Rochiccioli P, Battin J, Bertrand AM. Final height in Turner syndrome patients treated with growth hormone. *Horm Res* 44:172-76, 1995.

Ropers HH, Migl B, Zimmer J, Fraccaro M, Maraschio PP, Westerveld A. Activity of steroid sulfatase in fibroblasts with numerical and structural X chromosomal aberrations. *Hum Genet* 57:354-56, 1981.

Rosen KM, Sirota DK, Marinoff SC. Gastrointestinal bleeding in Turner's syndrome. *Ann Intern Med* 67:145, 1967.

Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T. "Molecular Cloning: A laboratory manual", 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Schaefer L et al. A high resolution deletion map of human chromosome Xp22. *Nature Genet* 4,272-279, 1993.

Schiebel K, Winkelmann M, Mertz A, Xu X, Page DC, Weil D, et al. Abnormal XY interchange between a novel isolated protein kinase gene, PRKX, and its homologue, PRKY, accounts for one third of all (Y+)XX males and (Y-)XY females. *Hum Molec Genet* 6:1985-1989, 1997.

Schneider. Gädicke A, Beer-Fomero P, Brown LG, Nussbaum R, Page DC. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative sex determinant and escapes X inactivation. *Cell* 57:1247-1258, 1989.

Scully RE. Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer* 25:1340-1355, 1970

Shapiro LJ, Mohandas T, et al. Noninactivation of an X chromosome locus in man. *Science*. 204:1019-1021, 1979.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244, 1990.

Slim R, Levilliers J, Ludecke HJ, Claussen U, Nguyen VC, Gough NM, Petit C. A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escapes inactivation. *Genomics* 16:26-33, 1993.

Smith's Recognizable patterns of human malformation. Jones 5th Edition. Saunders 81-83, 1997.

Sparkers RS, Motulsky AB. Hashimoto's disease in Turner's syndrome with isochromosome X. *Lancet* 1:947, 1963.

Speed RM. Meiotic configurations in female trisomy 21 fetuses. *Hum Genet* 66:176-180, 1984.

Speed RM. Oocyte development in XO fetuses of man and mouse: the possible role of heterologous X-chromosome pairing in germ cell survival. *Chromosoma* 94:115-124, 1986.

- Stahnke N, Stubbe P, Attanasio A, Reinhardt D, Partsch CJ, Sippell WG. GH therapy alone or together with oxandrolone in 212 patients with Turner syndrome (TS): the German experience. In: Hibi Y, Takano K, eds. Basic and clinical approach to Turner syndrome. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 315-22, 1993.
- Steinberg E, Odel DW. Genetics, anatomy, fetal endocrinology. En: Textbook of Endocrinology. Ed. de Groot et al. Vol 3, Cap 108, pp 1801. WB Saunders Co London 1989.
- Szpunar J. Middle ear disease in Turner's syndrome. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 87:34, 1968.
- Takagi N, Sasaki M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. Nature 256:640-642, 1975.
- Tarani L, Lampariello S, Raguso G, Colloridi F, Pucarelli Y, Pasquino AM, Bruni LA. Pregnancy in patients with Turner's syndrome: six new cases and review of literature. Gynecol Endocrinol; 12(2):83-7, 1998.
- Teunenbroek van A, Muinck Keizer-Schrama de SMPF, Stijnen T et al. Yearly stepwise increments of the growth hormone dose results in a better growth response after four years in girls with Turner syndrome. J Clin Endocrinol Metab 81:4013-21, 1996.
- Tharapel AT, Anderson KP, Simpson JL. Deletion (X)(q26.1rarrq28) in a proband and her mother - molecular characterization and phenotypic-karyotypic deductions. Am J Hum Genet 52:463-71, 1993.
- Therman E, Laxova R, Susman B. The critical region on the human Xq. Hum Genet 85:455-61, 1990.
- Therman and Susman. Human chromosomes structure, behavior and effects. Springer-Verlag New York Inc. USA, 1993.
- Thompson MW, McInnes RR, Willard HF: Genetics in medicine 5th edition. Philadelphia: Saunders, 1991.
- Tjio JH, Levan A. The chromosome number in man. Hereditas 42:1-6, 1956.
- Tsuchiya K, Reijo R, Page D, Distèche C. Gonadoblastoma: Molecular definition of the susceptibility region of the Y chromosome. Am J Hum Genet 57:1400-1407, 1995.
- Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and *cubitus valgus*. Endocrinology 23:566-574, 1938.
- Ulrich P. Turner's syndrome and status Bonnevie-Ulrich. Am J Hum Genet 1:179-202, 1949
- Van der Putte SCJ. Lymphatic malformation in human fetuses: A study of fetuses with Turner's syndrome or status Bonnevie-Ulrich. Vorchows Archives Human Pathology, Anatomy, Histology 376:233, 1977.
- Van Dyke DL, Wiktor A, Palmer CG. Ullrich-Turner syndrome with a small ring X chromosome and presence of mental retardation. Am J Med Genet 43:996-1005, 1992.
- Verp MS, Simpson JL. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. Cancer Genet Cytogenet 25:191-218, 1987.
- Von Winiwarter. The sex determination depends in the presence of one or two X chromosomes. In: Sex Chromosomes. Mittwoch U, London, 1967.
- Walker CL, Cargile CB, Floy KM, Delannoy M, Migeon BR. The Barr body is a looped X chromosome formed by telomere association. Proc Natl Acad Sci USA 88:6191, 1991.
- Wilkins and Fleischman. Sexual infantilism caused by rudimentary ovaries in Turner syndrome. Hum Pathol, 1944
- Witt M, Erickson RP. A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by polymerase chain reaction. Hum Genet 82:271-274, 1989.
- Wyss D, DeLozier CD, Danielle J et al. Structural anomalies of the X chromosome: Personal observation and review of non-mosaic cases. Clin Genet 21:145-159, 1982.
- Zinn AR, Page DC, Fisher EMC. Turner syndrome, the case of the missing sex chromosome. Trends Genet 9:90-93, 1993.