



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR Y MOLECULAR

*ESTUDIO CITOGENÉTICO Y MOLECULAR DEL  
MOSAICISMO CROMOSÓMICO EN EL  
SÍNDROME DE TURNER*

MEMORIA PARA OPTAR AL  
GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA

DR<sup>a</sup>. ROSA MARÍA FERNÁNDEZ GARCÍA





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR Y MOLECULAR

*ESTUDIO CITOGENÉTICO Y MOLECULAR DEL  
MOSAICISMO CROMOSÓMICO EN EL  
SÍNDROME DE TURNER*

MEMORIA PARA OPTAR AL  
GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA

Dña. ROSA MARÍA FERNÁNDEZ GARCÍA



## UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Eduardo Pásaro Méndez, Doctor en Biología y profesor titular de Universidad del área de Psicobiología de la Universidade da Coruña

INFORMA:

Que la memoria titulada "**Estudio Citogenético y Molecular del Mosaicismo Cromosómico en el Síndrome de Turner**", fue realizada por la Licenciada en Biología, Dña. Rosa María Fernández García, en los Laboratorios de Psicobiología de la Universidade da Coruña, y constituye un trabajo personal y original. Que como director del mismo autorizo su presentación al Tribunal calificador como trabajo de Tesis Doctoral.

A Coruña, 18 de Septiembre de 1995

Vº Bº

Fdo: Josefina Méndez Felpeto  
Tutora de la Tesis Doctoral

Fdo: Dr. Eduardo Pásaro Méndez  
Director de la Tesis Doctoral



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

JOSEFINA MÉNDEZ FELPETO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE  
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA UNIVERSIDADE DA  
CORUÑA

AUTORIZA la presentación a la Comisión de Doctorado de la Tesis Doctoral  
*"Estudio Citogenético y Molecular del Mosaicismo Cromosómico en el  
Síndrome de Turner"*, realizada en los Laboratorios de Psicobiología de la  
Universidade da Coruña, por Dña. Rosa María Fernández García y dirigida por  
el Dr. Eduardo Pásaro Méndez.

A Coruña, 25 de Septiembre de 1995

Fdo. Josefina Méndez Felpeto



*A Santi y Macamen*



Mi más sincero agradecimiento al personal del Servicio de Genética del Hospital "Juan Canalejo" de A Coruña, del Servicio de Endocrinología Pediátrica del Hospital "Xeral de Galicia" de Santiago, del Laboratorio de Genética Humana del Hospital Universitario de Eppendorf (Hamburgo) y del Laboratorio de Genética de la Universidade da Coruña.

Al Dr. Eduardo Pásaro Méndez por su dirección y constante dedicación a lo largo de estos años.

También quisiera agradecer el apoyo, los consejos y el tiempo dedicado a todos aquellos que de alguna manera han hecho posible que este trabajo de investigación fuese realizado. Entre ellos quiero mencionar de una manera particular a Ana Insua, Teresa Rumbo, Ana Pereira, a mi hermano Juan y muy especialmente a mis padres.

---

Este trabajo ha sido posible gracias al soporte económico proporcionado por la Universidade da Coruña y de la Xunta de Galicia (beca predoctoral, conv. 92-93 y proyectos de investigación, XUGA104004A91 y XUGA10403B95).



# ÍNDICE

	<i>Pág.</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. <i>Aneuploidía: Aspectos generales</i>	10
1.2. <i>Principales alteraciones cromosómicas sexuales en humanos</i>	15
1.3. <i>Interés de las técnicas genéticas y moleculares empleadas en el diagnóstico del Síndrome de Turner</i>	30
1.3.1. <i>Estudio citogenético: bandeo cromosómico</i>	30
1.3.2. <i>Hibridación «in situ»</i>	31
1.3.3. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	32
<b>2. OBJETIVOS</b>	34
<b>3. SUJETOS Y MÉTODO</b>	
3.1. <i>Estudio citogenético</i>	36
3.1.1. <i>Obtención de las preparaciones cromosómicas</i>	36
3.1.1.a. <i>Cultivo estándar de linfocitos</i>	36
3.1.1.b. <i>Cultivo sincronizado de linfocitos</i>	38
3.1.2. <i>Tinción de cromosomas: Técnica de tinción de bandas G</i>	38
3.2. <i>Hibridación «in situ» Fluorescente (FISH)</i>	39
3.2.1. <i>Sondas empleadas</i>	39
3.2.2. <i>Procedimiento de FISH para la hibridación con una sonda: (DXZ1, DXZ4, XIST, DYZ1, DYZ3 o DIZ5)</i>	44
3.2.3. <i>Procedimiento de FISH para la hibridación conjunta de sondas de diferentes condiciones de hibridación</i>	46
3.3. <i>Estudio molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	47
3.3.1. <i>Extracción de ADN de alto peso molecular a partir de sangre periférica</i>	47
3.3.2. <i>Amplificación de la muestra de ADN por PCR</i>	47



	<i>Pag.</i>
<b>4. RESULTADOS</b>	
<i>TABLAS DE RESULTADOS</i>	52
4.1. <i>Resultados obtenidos mediante FISH</i>	61
4.1.1. <i>Estudio general de todos los casos</i>	61
4.1.2. <i>Estudio de mujeres control mediante la sonda DIZ5</i>	64
4.2. <i>Resultados obtenidos mediante PCR</i>	64
<b>5. DISCUSIÓN</b>	65
5.1. <i>Sobre los casos no mosaico</i>	66
5.2. <i>Sobre los casos mosaico</i>	72
5.3. <i>Observación de reestructuraciones a nivel centromérico</i>	116
5.4. <i>Identificación de pequeños fragmentos de origen desconocido</i>	116
<b>6. CONCLUSIONES</b>	119
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	122
<b>ANEXOS</b>	145



# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANEUPLOIDÍA: ASPECTOS GENERALES

La dotación cromosómica del ser humano, como la de otras especies, está cuidadosamente protegida contra las modificaciones. Así, la pérdida o la incorporación de un cromosoma al genoma de un organismo suele implicar severas consecuencias (Sandler y Hecht, 1973).

Por definición, un individuo *aneuploide* es aquel que presenta un número menor o mayor de cromosomas que un múltiplo exacto de su juego *haploide* ( $n$ ) (Chandley, 1987). Cuando existe un cromosoma más que el número *diploide* ( $2n$ ), el individuo se denomina *trisómico* ( $2n+1$ ); si hay dos cromosomas diferentes de más se denomina *doble trisómico*, y si hay un cromosoma menos, el individuo es *monosómico* ( $2n-1$ ). Si existe *mosaicismo*, el individuo puede presentar tanto líneas celulares diploides como aneuploides, generalmente derivadas las unas de las otras en un estadio temprano del desarrollo del cigoto. La primera aneuploidía descubierta en humanos fue la trisomía 21 (Lejeune, Gautier y Turpin, 1959) que constituyó el primer gran paso en el estudio de las aneuploidías en humanos.

En un rango muy amplio de especies animales, la aneuploidía es un fenómeno relativamente raro. El hombre es el único, entre todas las especies estudiadas hasta el momento, que presenta una carga tan alta de aneuploidía entre sus concepciones (Chandley, 1987). De hecho, es la responsable de más de la mitad de los abortos espontáneos que tienen lugar durante la gestación (Therman y Susman, 1993).

La aneuploidía autosómica suele estar ligada a retraso intelectual y físico, profundo o severo, y a muerte temprana<sup>1</sup>. Por el contrario, un número anómalo de cromosomas sexuales se tolera a menudo razonablemente bien, aunque la fertilidad suele anularse o reducirse (Cunniff, Jones y Benirschke, 1991).

---

<sup>1</sup> La excepción viene dada por el síndrome de Down. En la literatura podemos encontrar casos de síndrome de Down con deficiencias de grado ligero. Por otro lado, gracias a los avances de la Medicina, estos individuos no padecen una mayor mortandad infantil que la población general (Lambert y Rondal, 1989).



El mecanismo más común por el cuál tiene lugar la aneuploidía se denomina *no disyunción* (Mange y Mange, 1994). Esta consiste en la migración a un mismo polo, de las dos cromátides de un cromosoma en la mitosis o en la meiosis II, o de los dos cromosomas de un bivalente en la meiosis I. La no disyunción puede tener lugar tanto en la oogénesis como en la espermatogénesis, en la primera o en la segunda división meiótica; o bien en la mitosis durante el desarrollo embrionario. La monosomía y la trisomía son consecuencias complementarias de la no disyunción (Hasmann, 1983; Armstrong, Kirkham y Hulten, 1994).

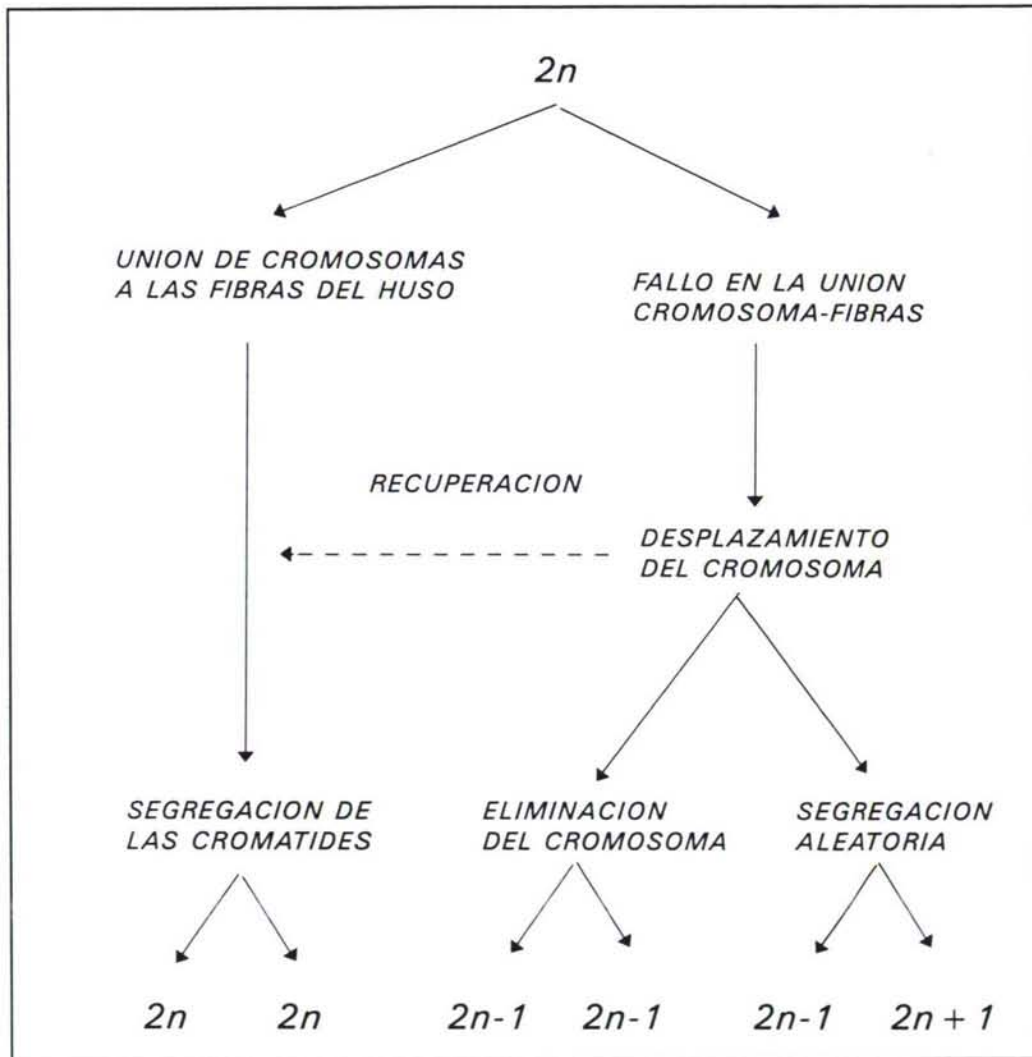
La no disyunción meiótica es el mecanismo prioritario de formación de aneuploidías, aunque algunos casos pueden ser debidos a no disyunción mitótica (Hook, 1983; Backer y Allen, 1987; Therman y Susman, 1993). Es más frecuente en la primera división meiótica que en la segunda (May y col., 1990; Hassold y col., 1991; Sherman y col., 1991; Angell, 1995) por la alteración en la formación quiasmas entre bivalentes, cruzamientos y segregaciones. La segunda división meiótica es similar a una división mitótica y es susceptible de las mismas alteraciones de segregación que en células somáticas (Polani, 1981; Juberg y Mowrey, 1983; Hansmann, 1983; Alberts y col., 1983; Backer y Allen, 1987; Therman y Susman, 1993).

La monosomía puede ser también el resultado de la *pérdida anafásica de un cromosoma* o de un *desplazamiento cromosómico* (Ford y Roberts, 1983) (Ilustr. 1)

Según este modelo, cuando un cromosoma no se une adecuadamente a las fibras del huso puede ocurrir:

- Que el cromosoma sea recuperado, continuando con una segregación normal de las cromátides.
- Que el cromosoma que se ha desplazado sea eliminado. El cromosoma no se incorpora a ninguna de las células hijas y probablemente será destruido o micronucleado en el citoplasma celular. Este proceso dará lugar a dos células hijas monosómicas.
- Que el cromosoma que se ha desplazado sea incorporado al azar a una de las dos células hijas. Este cromosoma sufrirá una duplicación en la siguiente división celular dando lugar a un cromosoma extra. Este proceso es similar a la no disyunción y da lugar a una célula monosómica y otra trisómica.





Ilustr. 1.- Modelo de desplazamiento cromosómico de Ford y Roberts (1983).



En humanos, la frecuencia de la trisomía entre los nacimientos vivos es del 0,3% (Hassold, Hunt y Sherman, 1993; Seashore, 1993), mientras que entre los nacidos muertos es del 5% y entre los abortos espontáneos del 25% (Hassold y Jacobs, 1984; Navsaria y col., 1993). Habría que tener en cuenta también las pérdidas embrionarias que tienen lugar antes de la implantación (período preimplantatorio) y en una postimplantación temprana, pero ya que tienen lugar con anterioridad al reconocimiento clínico del embarazo, el estudio citogenético de estos embriones no puede ser llevado a cabo (Byrne y Ward, 1994). Existen claras evidencias que señalan hacia una pérdida de todas las monosomías autosómicas durante el tiempo de implantación en ratones (Gropp, 1982) y el hecho de no conocer monosomías en humanos (excepto la monosomía para el cromosoma X) podría ser explicado de igual manera.

Las causas de la aneuploidía permanecen poco claras. Aunque existe una abundante literatura sobre la etiología de la aneuploidía en humanos, y su relación con la edad materna (Bond y Chandley, 1983; Hook, 1985b; Warburton, 1985), actualmente no nos encontramos mucho más cerca de entender estos mecanismos que hace 35 años, cuando fueron identificadas cromosómicamente la mayoría de las aneuploidías humanas. En *Drosophila* se han identificado factores genéticos que inducen a la no disyunción (Baker y col., 1976), que en humanos todavía no se han encontrado. También resulta difícil definir los posibles factores ambientales que puedan ser causa de aneuploidía a pesar de los numerosos intentos por encontrar una relación entre exposiciones físicas y químicas y una inducción a la aneuploidía (Kline y Stein, 1985).

La aneuploidía en humanos presenta numerosas consecuencias que incluyen: pérdidas fetales, infertilidad, malformaciones congénitas, retraso mental, cáncer, etc.; va acompañada de una alta mortandad y morbilidad, es la razón principal de abortos espontáneos y la responsable de un 10-15% de la deficiencia mental (Close y col., 1968; Ansele, 1983; Burgoyne, Holland y Stephens, 1991). En este sentido la naturaleza siempre busca el equilibrio; el desequilibrio lleva consigo un precio: predispone a la letalidad, y si el individuo sobrevive, generalmente presenta ciertos rasgos deletéreos.

### *Aneuploidía en recién nacidos*

Si hacemos una recopilación de los datos obtenidos en los últimos años, podemos observar que el porcentaje de aneuploidía en recién nacidos es del 0,48 (Tabla 1). Aunque no se conoce el valor exacto de la aneuploidía neonatal, se cree que es superior a uno por cada 300 nacimientos (Hecht y Hecht, 1987). Podemos observar sólo las formas viables, pero se desconocen los datos referidos al momento de la concepción; así este porcentaje está infravalorado, pues las alteraciones cromosómicas que se pueden observar en recién nacidos representan exclusivamente la "punta del iceberg" del problema.



La frecuencia con la que puede detectarse un desequilibrio cromosómico depende de la población investigada. Se calcula que, como mínimo, una de cada 10 concepciones humanas identificadas presenta una anomalía cromosómica. En los embriones y fetos humanos abortados de forma espontánea, la incidencia de desequilibrio cromosómico es tanto mayor cuanto más temprana es la fase del embarazo en la que se toma la muestra (Burgoyne, Holland y Stephens, 1991).

**Tabla 1: Aneuploidía en recién nacidos**

(de los datos aportados por Hecht y Hecht, 1987 y Nielsen y Wohlert, 1991)

Estudio	País	Año de Publicación	Referencia	Tamaño muestra	Aneuploidía	
					n	%
1	Canadá	1969	Sergovich y col.,	2.081	7	0,34
2	New Haven	1970	Lubs y Ruddle	4.365	16	0,37
3	Edimburgo	1974	Jacobs y col.,	11.680	43	0,37
4	Moscú	1974	Bochkov y col.,	2.500	5	0,20
5	Canadá	1975	Hamerton y col.,	13.939	32	0,23
6	Dinamarca	1975	Nielsen y Sillensen	11.148	42	0,38
7	Israel	1975	Cohen y col.,	500	0	0,00
8	Canadá	1976	Lin y col.,	930	3	0,32
9	Boston	1977	Walzer y Gerald	13.751	39	0,28
10	Edimburgo	1980	Buckton y col.,	3.993	17	0,37
11	Dinamarca	1991	Nielsen y Wohlert <sup>2</sup>	34.910	276	0,79
<b>Total</b>				<b>99.797</b>	<b>480</b>	<b>0,48</b>

En los más de 99.000 niños nacidos vivos que se han estudiado de forma aleatoria en distintos países entre los años 1969 y 1991, aproximadamente uno de cada 200 presenta una anomalía cromosómica, ya sea numérica o estructural; al menos uno de cada 700 recién nacidos es trisómico para uno de los autosomas 21, 18 ó 13; alrededor de uno de cada 350 recién nacidos varones tiene la dotación 47,XXY o 47,XYY. Uno entre varios miles de recién nacidos presenta la monosomía X, y uno entre 500 presenta alguna nueva disposición estructural, que en la mayor parte de los casos está genéticamente equilibrada (Nielsen y Wohlert, 1991).

<sup>2</sup> El estudio corresponde a 13 años de investigación.



## 1.2. PRINCIPALES ALTERACIONES CROMOSÓMICAS SEXUALES EN HUMANOS

Las principales alteraciones gonosómicas en humanos son XXY y XYY en varones, XXX y XO en mujeres (Tabla 2). Existen otras alteraciones relacionadas con el número y estructura de los cromosomas sexuales pero son menos frecuentes.

### *XXY: Síndrome de Klinefelter*

Descrito clínicamente por primera vez por Klinefelter y col., en 1942, está caracterizado desde el punto de vista cromosómico por la existencia, en individuos del sexo masculino, de un cromosoma X suplementario. Estos individuos poseen 47 cromosomas, y sus gonosomas son XXY. El cariotipo puede ser homogéneo o mosaico (46,XY/47,XXY).

Son varones con hipogonadismo. Sus testículos son de pequeño tamaño, producen muy poco espermia (oligospermia) o ninguno (azoospermia). En la pubertad se manifiesta la ausencia de aparición de los caracteres sexuales secundarios. La velloidad permanece pobre, limitándose a un discreto vello poco desarrollado. La producción de testosterona está reducida (hipotestosterismo).

Desde el punto de vista morfológico, presentan un aspecto eunucoide típico: talla elevada, muy delgados, con miembros largos, y generalmente son impotentes. No obstante, algunos de ellos tienen un aspecto morfológico normal. La inteligencia puede ser normal, aunque existe una cierta predisposición a la deficiencia mental. Su conducta puede estar alterada (Hecht y Hecht, 1987; Bergsma, 1979; Jones, 1990)

### *XYY: Varones doble Y*

La presencia de dos cromosomas Y generalmente no lleva asociado ninguna alteración importante. A mediados de 1960 se incrementó el interés por esta alteración cromosómica por el gran número de estudios que lo relacionaban con un comportamiento delictivo (Jacobs, Brittain y McClermont, 1965; Casey y col., 1966). Actualmente se rechaza esta hipótesis. Se conocen casos de individuos portadores de un cromosoma Y suplementario que han sido descubiertos fortuitamente, y que llevan una vida completamente normal.

Suelen ser varones de alta estatura (superior a la media). Su descendencia suele ser normal debido a una selección de las células germinales con una constitución cromosómica normal (23,X y 23,Y) (Thompson, Melnyk y Hecht, 1967).



**Tabla 2. Incidencia de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en recién nacidos (de Hecht y Hecht, 1987)**

Sexo del recién nacido	Alteración cromosómica	Proporción Aneuploidía	Frecuencia
<b>Gonosomías</b>			
Varones	47,XXY	0,11	1/931 varones
	47,XYY	0,10	1/975 varones
Mujeres	47,XXX	0,10	1/975 mujeres
	45,X	0,02	1/5.743 mujeres
Ambos	Todas	0,18	1/559 nacimientos
<b>Trisomías autosómicas</b>			
	21	0,12	1/831 nacimientos
	18	0,01	1/9.269 "
	13	0,005	1/21.629 "
<b>Total</b>		<b>0,135</b>	<b>1/737</b> "

### *XXX: Mujeres Triple X*

La presencia de tres cromosomas X generalmente no da lugar a unos síntomas determinados, por lo que difícilmente puede denominarse síndrome. Suele estar asociado con un conjunto de pequeñas anomalías que pueden aparecer también en recién nacidos normales, y por ello, no sirven como indicadores para detectar la alteración cromosómica. Se han descrito retrasos en la pubertad, menopausias precoces, alteraciones en la menstruación; pero no es constante. Se trata de mujeres generalmente fértiles (Hecht y Hecht, 1987; Bergsma, 1979; Jones, 1990).

Puede estar relacionado, aunque en proporciones muy bajas, con una deficiencia mental ligera, cuya importancia es proporcional al número de cromosomas X. Su descendencia suele ser normal (al igual que en el caso 47,XYY) debido a una selección natural de las células germinales con una constitución cromosómica normal (Stewart y Sanderson, 1960; Johnston y col., 1961).



### *Síndrome de Turner*

El síndrome de infantilismo sexual, pliegues en el cuello (*Pterygium colli*) y deformidad del codo (*cubitus valgus*) en mujeres, fue descrito por primera vez por Turner en 1938. Posteriormente, con el establecimiento de las nuevas técnicas de visualización y recuento cromosómico, Ford y col., (1959) realizaron el primer análisis cromosómico en mujeres con el síndrome de Turner (ST) encontrando que poseían un solo cromosoma X (45,X) en lugar de dos (46,XX). Se descubrió así que el origen de este síndrome no sólo era endocrino, sino citogenético, y que se trataba de un fallo en la segregación de los cromosomas sexuales, bien durante la meiosis o bien durante alguna(s) de las divisiones mitóticas en los primeros estadios del desarrollo embrionario, resultando como consecuencia de ello, mujeres con una ausencia total o parcial de un cromosoma X, en todas las líneas celulares o en parte de ellas (mosaicismo).

El ST no es debido exclusivamente a la condición 45,X, se pueden encontrar también otras aberraciones en el cromosoma X como son las anomalías de tipo estructural: cromosoma en anillo r(X), isocromosomas (iXq)<sup>3</sup>, o deleciones parciales de uno de los brazos de dicho cromosoma (Xp-, Xq-). Puede ser también el resultado de un mosaicismo, es decir, de la presencia de dos o más líneas celulares con un complemento cromosómico diferente (45,X/46,XX; 45,X/47,XXX, etc).

Las mujeres con ST se caracterizan fundamentalmente por baja estatura, *Pterygium colli* o cuello alado, *cubitus valgus* o deformidad del codo, disgenesia gonadal con alteraciones en los caracteres sexuales primarios y secundarios, esterilidad, implantación baja del cabello, linfedema en manos y pies en el momento del nacimiento y talla baja (Bergsma, 1979; Jones, 1990; Lippe, 1987; 1991; Becker, Jospe y Holdsmith, 1994; Bernasconi y col., 1994; Fitzsmmons, Fantel y Shepard, 1994). Algunos de estos rasgos son atribuidos a deficiencias en el sistema linfático durante la vida fetal, como el hinchazón en manos y pies en recién nacidos y el *Pterygium colli* (Lippe, 1987; 1991; Greenlee y col., 1993) (Ilustr. 2).

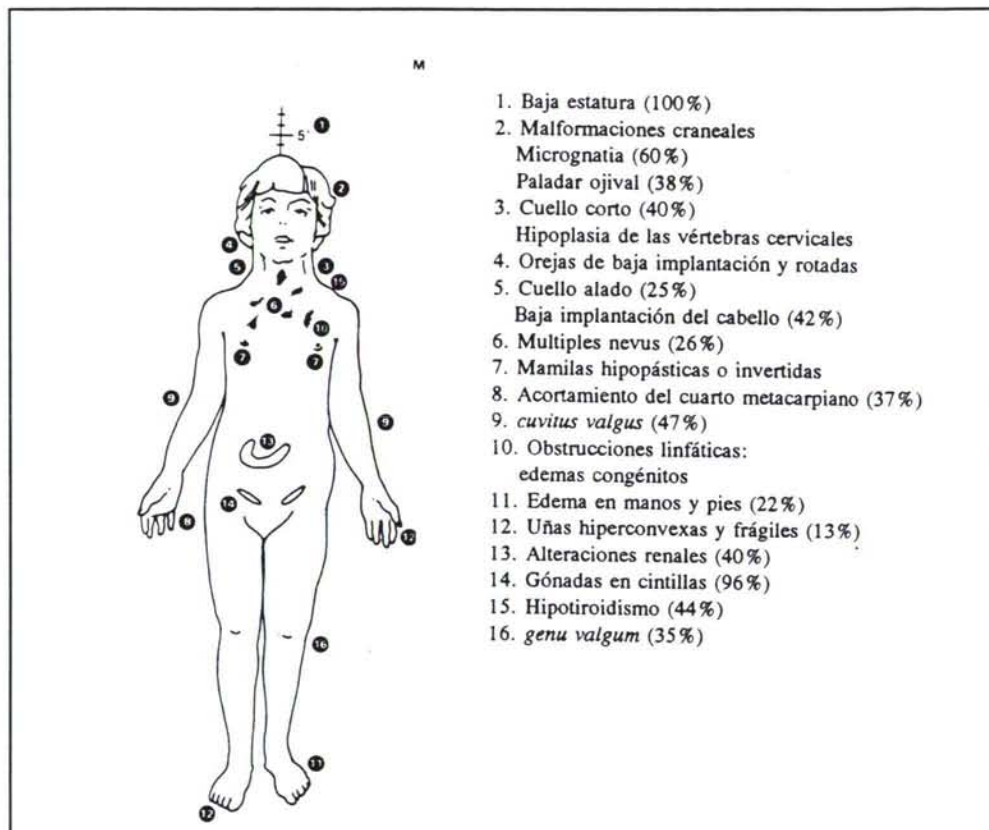
El rasgo más traumático para las mujeres con ST es la infertilidad (Sylvén y col., 1993). El desarrollo ovárico en las pacientes con ST es anómalo, pues, en los tres primeros meses de gestación las gónadas, todavía indiferenciadas, contienen un número normal de células germinales (Singh y Carr, 1966; Carr, Hagggar y Hart, 1968; Lippe, 1987; 1991), sin embargo en los dos últimos trimestres, se atrofian y se produce una muerte oocitaria prematura, de forma que al nacer, el desarrollo folicular es muy pobre

---

<sup>3</sup> No existe ningún caso bien documentado que demuestre la existencia del isocromosoma para el brazo corto del cromosoma X (iXp) (Therman y Sarto, 1983; Therman y Susman, 1993).



y no quedan -o sobreviven muy pocos- oocitos, y los ovarios se quedan reducidos a tejido fibrilar (Lippe, 1987; 1991).



Ilustr. 2.- Rasgos fenotípicos más comunes en el ST (Stratakis y Rennert, 1994).

Para poder entender el proceso que tiene lugar en las mujeres con ST es necesario tener en cuenta unas ideas generales del proceso de gametogénesis (término amplio que se refiere a los procesos mediante los cuales el plasma germinal se transforma en células sexuales altamente especializadas).

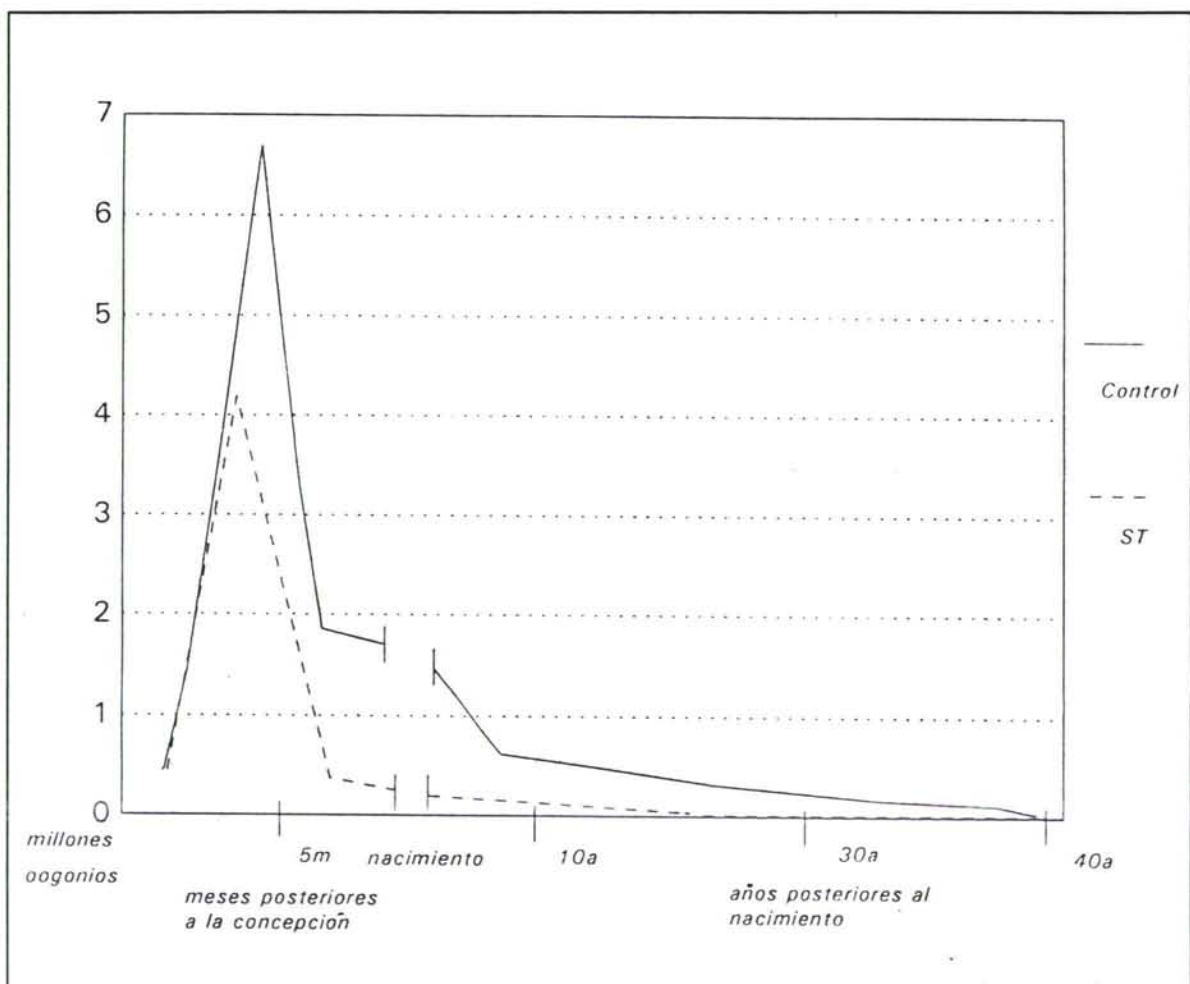
Según Carlson (1990) en la gametogénesis femenina se pueden diferenciar cuatro fases: a) origen de las células germinales y su migración a las gónadas, b) multiplicación de las células germinales en las gónadas a través del proceso de mitosis, c) meiosis, y d) etapas finales de maduración y diferenciación de los gametos en óvulos capaces de ser fecundados.

Las células destinadas a originar los gametos (células germinales primordiales) son reconocibles durante etapas asombrosamente tempranas del desarrollo, aún cuando las gónadas están pobremente desarrolladas o ni siquiera han comenzado a desarrollarse. En



mamíferos estas células adquieren la capacidad de desplazarse mediante movimientos ameboides y emigran ascendentemente hasta llegar a las gónadas. El número de células germinales aumenta, por mitosis, durante su migración a las gónadas, no obstante, el aumento de mayor importancia ocurre en estas últimas.

En un inicio las gónadas embrionarias están pobladas por un número relativamente pequeño de células germinales primordiales migratorias. Sin embargo, una vez que se han asentado en las gónadas, estas células entran en una fase proliferativa en la que su número aumenta en gran medida por mitosis. Las células germinales femeninas mitóticamente activas reciben el nombre de "oogonios".



**Ilustr. 3.-** Gametogénesis en el síndrome de Turner y en una mujer 46,XX, tomando como base los datos aportados por Carlson (1990).

Entre el 2° y 5° mes tiene lugar una intensa actividad mitótica incrementándose el número de oogonios de unos cuantos miles a unos siete millones (Ilustr. 3). A continuación se reduce drásticamente el número de oocitos, debido sobre todo a la "atresia" (degeneración natural) de manera que en el séptimo mes, la mayor parte de ellos habrá



ingresado en la profase de su primera división meiótica, finalizando así la fase proliferativa de la gametogénesis femenina.

Los estudios de inactivación del cromosoma X en mujeres XX indican que los dos cromosomas permanecen activos entre los 2-16 primeros días (Park, 1957; Solari, 1994). Transcurrido este tiempo uno de los dos cromosomas X se inactiva, es decir, se diferencia de tal manera que no responde a las señales que regulan la transcripción de genes en su homólogo (Monk y Harper, 1979; Tan, Williams y Tan, 1993; Migeon, 1994). Este mecanismo de inactivación del cromosoma X compensa las diferentes dosis de los genes ligados al cromosoma X en hombres (XY) y mujeres (XX). Así, independientemente del número de cromosomas X presentes, sólo uno de ellos es activo durante la mayor parte del desarrollo. La reactivación ocurre únicamente en las células germinales con anterioridad al inicio de la meiosis en el ovario fetal (Gartler, Andina y Gant, 1975; Kratzer y Chapman, 1981; McMahon, Fosten y Monk, 1981; Monk y McLaren, 1981). Teniendo en cuenta que para el completo desarrollo de los ovarios y de los folículos primordiales es necesario la presencia de dos cromosomas X activos durante la meiosis (Zinn, Page y Fisher, 1993; Novak y col., 1995), en el caso de las mujeres con ST 45,X la ausencia del segundo cromosoma X da lugar a una atresia general, lo que explica la muerte oocitaria prematura que tiene lugar en las mujeres con ST (Krauss y col., 1987; Novak y col., 1995).

La diferenciación en ovarios de las gónadas indiferenciadas ocurre tras la aparición de las células germinales primordiales. Una vez comenzada la meiosis los ovarios abandonan su configuración indiferenciada a medida que comienzan a formarse los folículos primordiales (oocitos primarios, en donde la meiosis empieza a tener lugar). Teniendo en cuenta la necesidad de los dos cromosomas X activos en el proceso de la meiosis, en las mujeres con un sólo cromosoma X los ovarios no se diferencian completamente transformándose en cintillas. Sin embargo los genitales internos y externos no se ven afectados, ello es debido a que se diferencian, en gran medida, con anterioridad al proceso de diferenciación de los ovarios (Carlson, 1990).

Sin embargo, el proceso del fracaso ovárico en el ST no es necesariamente absoluto ni está limitado al feto y al neonato (Lippe, 1991). En el 5-10% de las pacientes, el grado de función ovárica residual es suficiente para iniciar el desarrollo de las glándulas mamarias en la pubertad, y un pequeño número de estas pacientes tienen una o dos menstruaciones espontáneas. Finalmente unas pocas (probablemente menos del 1% de todas las afectadas) tienen una función ovárica ovuladora durante los años fértiles, habiéndose observado algunos embarazos (Evans, Hamerton y Robinson, 1990; Lippe, 1991; Guerin, 1993; Kher y col., 1994). Estos casos suelen ser mujeres con mosaicismo, en donde una de sus líneas celulares posee una constitución cromosómica



normal (46,XX) que facilita el desarrollo de una función ovárica y el desarrollo mamario espontáneo (Evans, Hamerton y Robinson, 1990; Lippe, 1991; Novak y col., 1995).

En cuanto a su capacidad intelectual generalmente es normal (Temple y Carney, 1993), aunque presentan un patrón de habilidades cognitivas caracterizado por una especial dificultad para entender el concepto de espacio-forma y el concepto numérico (Money, 1963; Alexander, Ehrhardt y Money, 1966; Waber, 1979; Money, 1993). Presentan una dificultad especial en las pruebas de percepción espacial y sentido direccional (arriba-abajo, derecha-izquierda, etc). Por este motivo han sido calificadas de "ciegas para la forma y el espacio" (Money, 1963; 1968; 1973; 1993).

Presentan dificultad en el cálculo aritmético, (Rovet, Szekely y Hockenberry, 1994), problemas de comportamiento social y de atención: suelen ser inmaduras, hiperactivas, nerviosas, con problemas de relación social, escolar y de concentración (Rovet e Ireland, 1994). Suelen ser impulsivas (Williams, 1994) y presentar pobre autoestima, depresión e inseguridad (Delooz y col., 1993). Existen casos de relación del ST con anorexia nerviosa (Muhs y Lieberz, 1993). En general el fenotipo psicológico suele ser complejo, pero varía ampliamente de unas mujeres Turner a otras (Ross y col., 1993; Swillen y col., 1993; Murphy y col., 1994).

No presentan graves alteraciones en comparación con otros síndromes cromosómicos como pueden ser el síndrome de Klinefelter (47,XXY), tetrasomías o pentasomías del cromosoma X, o trisomías autosómicas; ni existe una mayor mortandad infantil que en la población general. A pesar de ello, y paradójicamente, las pérdidas *in utero* son enormes, sobre todo cuando se refiere a mujeres 45,X; así el 99% de los cigotos 45,X dan lugar a un aborto espontáneo (Jacobs y col., 1990). Se desconoce la razón de esta elevada selección.

Según Robinson (1990) y de la Chapele (1983), el 1-2% de todas las concepciones humanas son 45,X; a las 6 semanas de gestación, alrededor del 90% de estas concepciones dan lugar a un aborto espontáneo. Del 10% que sobreviven al menos 3/4 partes darán lugar a un aborto a las 16 semanas, generalmente con grandes higromas císticos, enfermedades cardíacas congénitas y crecimiento intrauterino deficiente. El 1-2% aproximadamente que sobreviven al segundo trimestre de gestación generalmente llegan a término, aunque presentan también signos de edemas como cuello alado y talla baja. (Jacobs y col., 1990; Therman y Susman, 1993).

La proporción entre mujeres 45,X y mosaicos es mucho más alta en fetos que en nacimientos vivos con ST (Hook y Warburton, 1983; Hassold, Benham y Leppert, 1988). Estos datos indican que la mayoría, sino todas las mujeres 45,X vivas, son fruto de una no disyunción mitótica en los primeros estadios del cigoto temprano (Hook y Warburton,

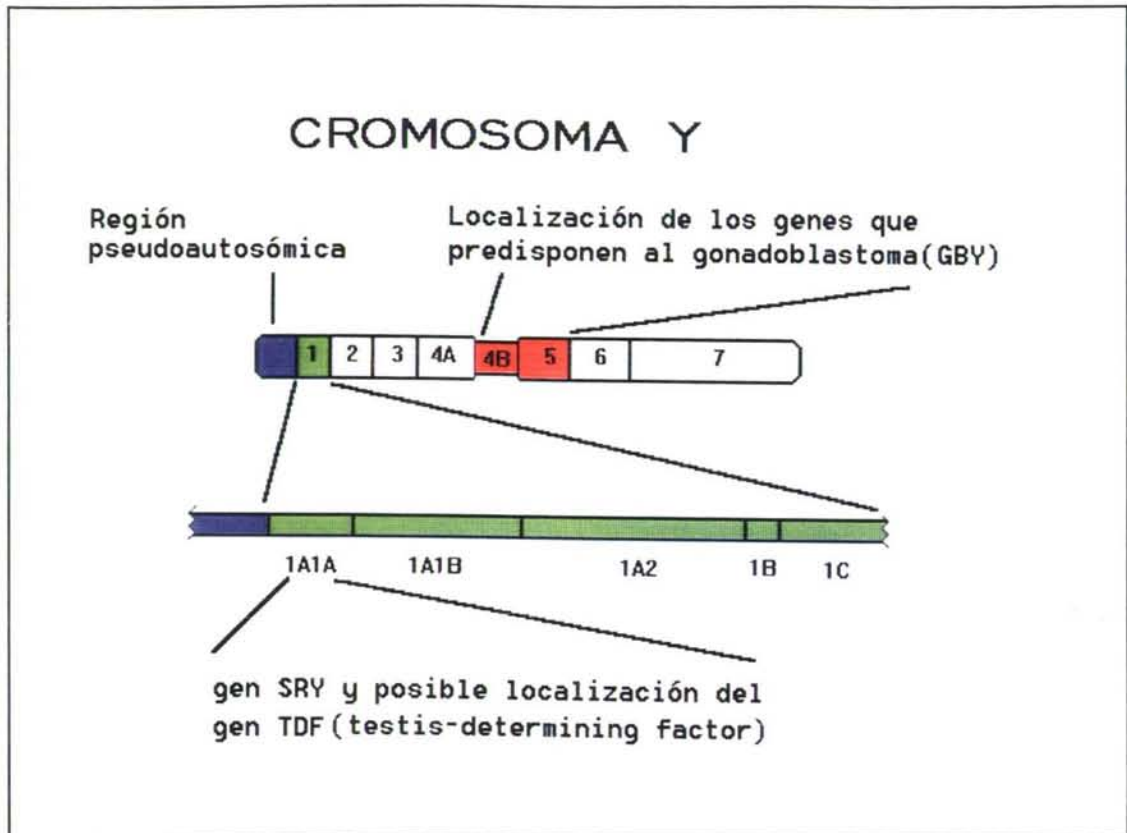
1983; Hassold y col., 1985; Connor y Loughlin, 1989). Se cree que el mosaicismo contribuye a la supervivencia durante el embarazo mediante un efecto fetoprotectivo por la presencia de más de una dosis de algún *locus* o *loci* de un segundo cromosoma sexual (X o Y) en algún órgano o tejido embrional o extraembrional (Hook y Warburton, 1983; Rubin, Williams y Wang, 1993). Las hipótesis actuales señalan que todas las mujeres con ST que sobreviven son realmente mosaicos (mosaicos crípticos), llegando a afirmar Held y col. (1991) que el cariotipo 45,X realmente no existe.

Mediante la aplicación de las nuevas técnicas citogenéticas-moleculares, se puede observar un incremento en el porcentaje de mujeres Turner mosaico. El incremento se atribuye, fundamentalmente, a la presencia de una segunda línea celular conteniendo, según Held y col. (1992) un pequeño fragmento cromosómico que tiende a formar anillos. El origen de estos fragmentos puede ser el cromosoma X o el Y. Los autores no se ponen de acuerdo en este aspecto, así para Gemmill y col. (1987), Lin y col. (1990), Johnson y col. (1991), Nagafuchi y col. (1992), Held y col. (1992) el cromosoma Y suele ser el origen de estos pequeños fragmentos que son el resultado de complejas reorganizaciones estructurales. Para otros autores, estos fragmentos derivan, en su gran mayoría, del cromosoma X, (Schmid y col., 1974; Coco y Bergada, 1977; de Almeida y col., 1985), lo que ha sido corroborado mediante FISH por Crolla y Llerena, 1988; Callen y col., 1991 y Lindgren y col., 1992.

Aunque existen discrepancias en cuanto al origen de estos fragmentos, todos los autores están de acuerdo en la importancia de determinar su origen, pues la existencia de restos del cromosoma Y (concretamente la región centromérica) en mujeres con disgenesia gonadal, incrementa en un 30% el riesgo de desarrollo de gonadoblastoma (Wolman, David y Koo, 1985; Page, 1988; Verp y Simpson, 1987; Petrovic y col., 1992; Kocova y col., 1993; Page, 1994; Kocova y Trucco, 1994; Kocova y col., 1994).

Se cree que uno o más genes del cromosoma Y predisponen a las mujeres con disgenesia gonadal al desarrollo de gonadoblastoma (Nagel y col., 1984; Lobaccaro y col., 1994). Aunque todavía la identidad de este gen o genes no ha sido aclarada, sí existe información sobre su localización en el cromosoma Y. Las evidencias implican la porción media de este cromosoma (intervalo 4B y 5) región que incluye el centrómero (Page, 1994) (Ilustr. 4).





**Ilustr. 4.-** Esquema del cromosoma Y donde se indica la localización de los genes GBY, SRY, ZFY y RPS4Y. Adaptado de Browder y col., (1991) y Affara y col., (1994).

*¿Porqué existe el Síndrome de Turner si uno de los cromosomas X se inactiva durante las etapas iniciales de la embriogénesis?.*

El síndrome de Turner (ST) es la única forma de aneuploidía en humanos en donde la ausencia total de un cromosoma no es incompatible con la vida (Zinn, Page y Fisher, 1993), de hecho, se trata de una excepción en su condición monosómica. Ello es debido a que en las mujeres 46,XX tiene lugar la inactivación de uno de los dos cromosomas X en los primeros estadios del desarrollo del cigoto.

En ratones se produce un fenómeno semejante. Se sabe que el inicio de la inactivación de uno de los cromosomas X tiene lugar en el momento de la implantación, durante la etapa de blastocito; primero en el trofocotodermo y posteriormente en las líneas celulares que van a originar el embrión propiamente dicho (Monk y Harper, 1979; Tan, Williams y Tam, 1993) (Ilustr. 5).

En este contexto, el ST constituye una paradoja ¿Por qué la ausencia del segundo cromosoma X provoca alteraciones fenotípicas si en las mujeres 46,XX éste permanece inactivo?

En el caso de la disgenesia ovárica, como ya hemos comentado, la reactivación del segundo cromosoma X durante la oogénesis sugiere que los oocitos podrían requerir una dosis diploide de algunos genes ligados al cromosoma X (Zinn, Page y Fisher, 1993). Así la gametogénesis podría pararse en la etapa de meiosis, con la formación de folículos primordiales, provocando una atresia masiva de oocitos primarios e impidiendo la diferenciación de las gónadas en ovarios.

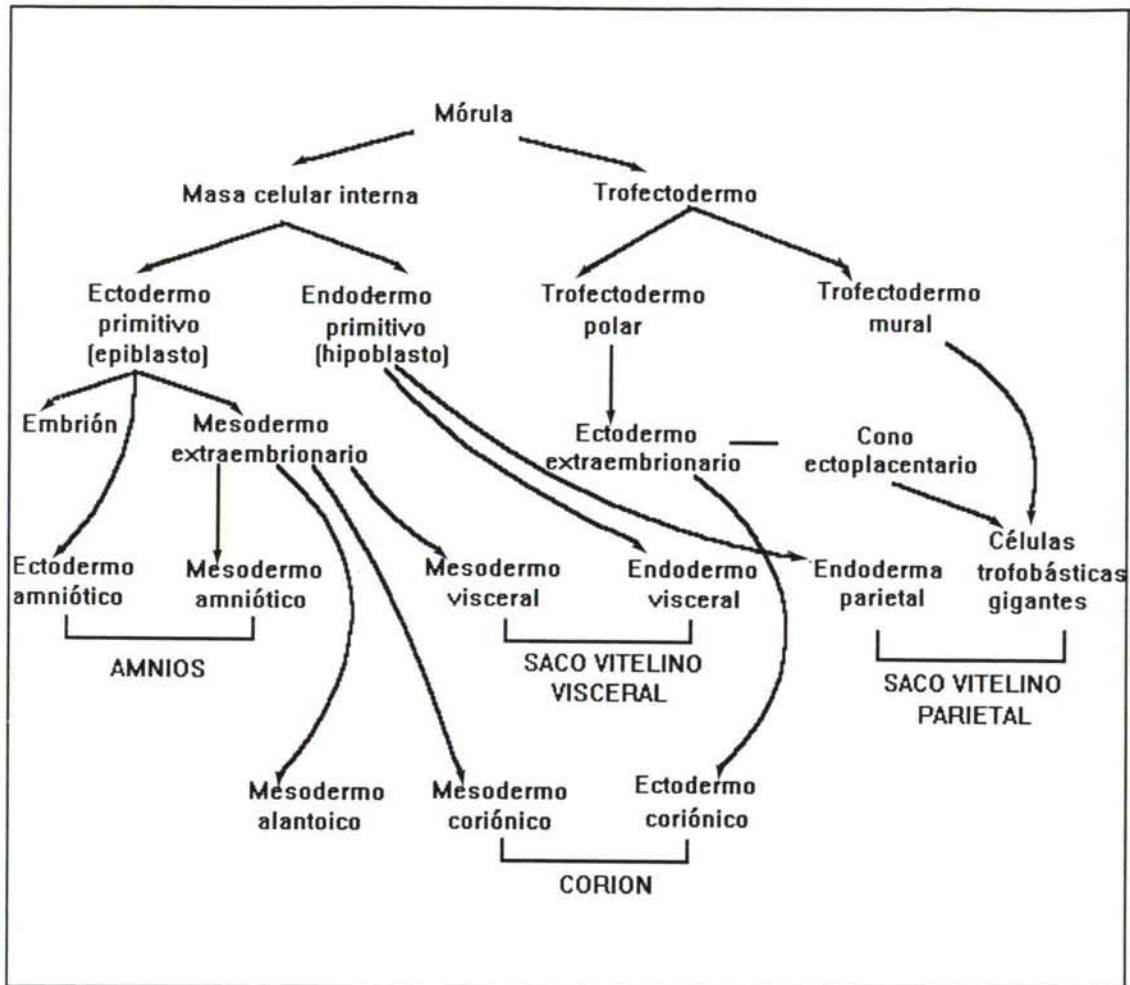
Pero la reactivación del segundo cromosoma X tiene lugar sólo en los oocitos, por lo que hay que considerar otras explicaciones para las alteraciones somáticas en el ST:

1º. Ya que los dos cromosomas X permanecen activos durante las primeras divisiones del cigoto (Migeon, 1994), podrían existir genes ligados al cromosoma X que se requieran en una dosis diploide para el desarrollo somático normal durante las primeras etapas de la embriogénesis. Sin embargo las alteraciones fenotípicas del ST más tempranas como el escaso desarrollo linfático no son evidentes hasta semanas más tarde (Zinn, Page y Fisher, 1993).

2º. Se sabe que la inactivación del cromosoma X no es total, como en un principio se creía (Brown y col., 1991a,b). Existen una serie de genes que escapan a dicha inactivación, y se supone que alguno(s) de estos genes son los responsables del ST. De hecho, si la inactivación del X fuese total, no debería existir este síndrome.

La inactivación del cromosoma X fue hipotetizada por primera vez por Lyon en 1961, y desde esa fecha se han ido acumulando datos apoyando la teoría de que la transcripción de la mayoría de los genes ligados al cromosoma X se inactivaba en los períodos tempranos del desarrollo; sin embargo se conoce muy poco sobre el inicio de la inactivación durante la embriogénesis y del mecanismo de la inactivación a lo largo del cromosoma (Heard y Avner, 1994). La iniciación del proceso de inactivación del cromosoma X parece depender de una región o *locus*, en posición *cis*, conocida como *centro de inactivación del cromosoma X* o *XIC* (Brown y col., 1991a,b; Lafreniere y col., 1993). Su existencia fue hipotetizada por primera vez por Therman y Patau en 1974, en base a sus observaciones sobre cromosomas X con alteraciones estructurales en el ST. Estos autores postularon que la presencia de la región proximal del brazo largo del cromosoma X era esencial para la inactivación y así, cualquier fragmento cromosómico derivado del X que no poseyese esta región no podría inactivarse, dando lugar a una muerte temprana del embrión. Russell (1963) y Cattanach (1975) habían observado el mismo fenómeno al estudiar reordenaciones del cromosoma X en ratones.





**Ilustr. 5.-** Esquema que ilustra los linajes celulares en el embrión temprano de ratón (Carlson, 1990).

Los cromosomas X con alteraciones estructurales sin el centro de inactivación podrían dar lugar a disomía o trisomía de determinados genes del cromosoma X, y esta condición es, presumiblemente inviable o puede inducir retraso mental (Therman, Sarto y Patau, 1974; Mattei, Mattei y Vidal, 1981; Therman y Susman, 1990; Zenger y col., 1993). Los estudios realizados hasta finales del año 1994 indican la relación entre fragmentos o anillos cromosómicos derivados del X sin el XIC y la deficiencia mental en más de cincuenta casos (Cole y col., 1994; Collins y col., 1994; Robson y col., 1994; Wolff y col., 1994). A partir de los estudios citogenéticos basados en los isocromosomas para el cromosoma X y otras alteraciones como deleciones intersticiales y terminales, traslocaciones entre el cromosoma X y autosomas, pseudoisodidcéntricos y anillos, se ha podido determinar que la parte proximal del brazo largo del X (Xq11.2-q13) siempre se retiene (Brown y col., 1991b). A partir de estos estudios, se hipotetizó la localización del *centro de inactivación del cromosoma X* en esta región, que fue denominada *región crítica*.

Brown y col (1991a) estudiaron los genes que se expresan a partir del cromosoma X inactivo (Xi), en particular aquellos que se localizan cerca del intervalo correspondiente

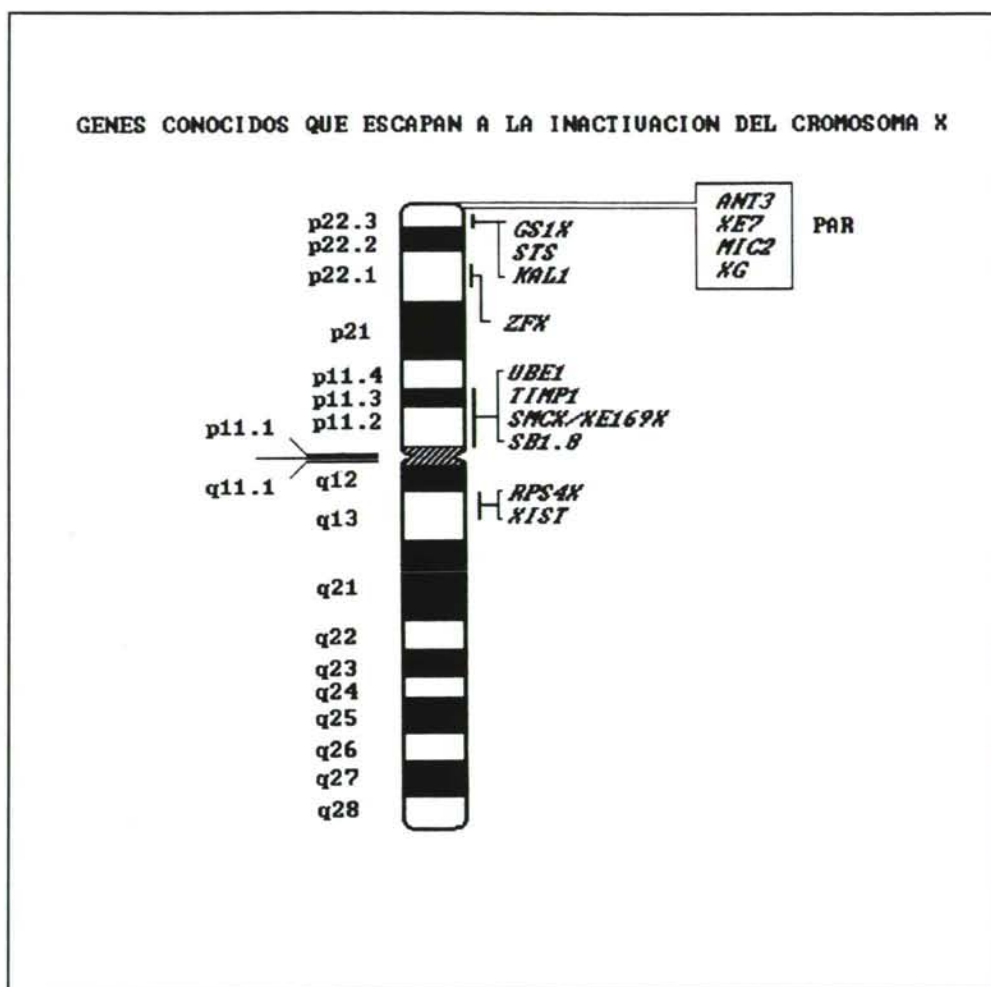
al centro de inactivación. Brockdorff y col., (1992) clonaron y secuenciaron un gen, *XIST*, que se expresa exclusivamente a partir del Xi pero no del cromosoma X activo ( $X_a$ ) (Brockdorff y col., 1991), localizado en Xq13, y que representa el gen candidato de la inactivación del cromosoma X, o está estrechamente relacionado con ésta. Los estudios actuales sobre isocromosomas derivados del X que han perdido el XIC y que permanecen inactivos, indican que el gen *XIST* juega un papel fundamental en el inicio de la inactivación pero no en su mantenimiento (Kay y col., 1993; Brown y Willard, 1994; Buzin, Mann y Singer, 1994; Rack y col., 1994). Este gen ha sido clonado y secuenciado (Brown y col., 1992; Hendrich, Brown y Willard, 1993) originando un cDNA de 17 kb sin fase abierta de lectura. El transcrito ha sido localizado en el corpúsculo de Barr mediante la técnica de Hibridación *in situ*-ARN y los autores (Hendrich, Brown y Willard, 1993) sugieren que el gen podría funcionar como un ARN funcional dentro del núcleo.

La región Xq13 del cromosoma X humano es también el sitio de condensación del corpúsculo de Barr (Cox y Miller, 1974; Kendall y Stuart, 1979). La región es homóloga a la existente en el cromosoma X del ratón, también requerida para el proceso de inactivación del cromosoma (Rastan, 1983; Rastan y Robertson, 1985). La relación tan estrecha entre estos fenómenos establece la gran importancia de esta región en el fenómeno de la inactivación del cromosoma X.

Como el gen *XIST* sólo se expresa en las líneas celulares con uno o más cromosomas X inactivos, se cree que podría estar relacionado con alteraciones cromosómicas como los síndromes de Turner y Klinefelter (Brown, 1991a). Pero esto mismo se podría decir de todos aquellos genes que escapan a la inactivación del X (Brown y Willard, 1989; 1990; Agulnik y col., 1994).

La lista de genes que escapan a la inactivación del cromosoma X ha crecido en los últimos años, incluyendo ahora el gen *ZFX* (Schneider-Gadicke y col., 1989) que se localiza en Xp21.3-22.1, *AIS9T* en Xp11 (Brown y Willard, 1990), *RPS4X* en el brazo largo (Fisher y col., 1990) y más recientemente *ANT3* en la región pseudoautosómica Xp22.3 (Schiebel y col., 1993; Slim y col., 1993), *SMCX* en Xp11.1-Xp11.2, (Agulnik y col., 1994), *XE169* entre Xp21.1 y la región centromérica (Wu y col., 1994a,b; Disteche, 1995) (Ilustr. 6). Por tanto, existen genes que escapan a la inactivación y que se encuentran intercalados entre genes que se inactivan. Pero el mecanismo por el cual ésto ocurre sigue siendo desconocido.





**Ilustr. 6.-** Genes que escapan a la inactivación del cromosoma X según Disteche (1995).

Tanto la letalidad embrionaria como el fenotipo Turneriano se consideran el resultado de la monosomía de un gen o genes comunes a los cromosomas X e Y (Ashworth y col., 1991; Zinn, Page y Fisher, 1993). Por otro lado, se espera que estos genes se expresen en ambos cromosomas X, el activo y el inactivo, para asegurar una dosis correcta del producto génico. Actualmente se cree que son varios los genes implicados en las alteraciones del ST (Epstein, 1988; Therman, Laxova y Susman, 1990 y Therman y Susman, 1990), los candidatos son el *RPS4X* y el *ZFX*. Ambos se expresan a partir del cromosoma X inactivo y poseen su homólogo en el cromosoma Y (Ilustr. 7).

El gen *RPS4X* codifica para la proteína ribosómica S4 (Ashworth y col., 1991; Watanabe y col., 1993) y posee su homólogo en el cromosoma Y (*RPS4Y*). Fisher y col. (1990) identificaron el gen candidato mediante el estudio de las secuencias transcritas del cromosoma Y en mujeres 46,XY con ST en un intervalo de 90 Kb. El gen *RPS4X* se

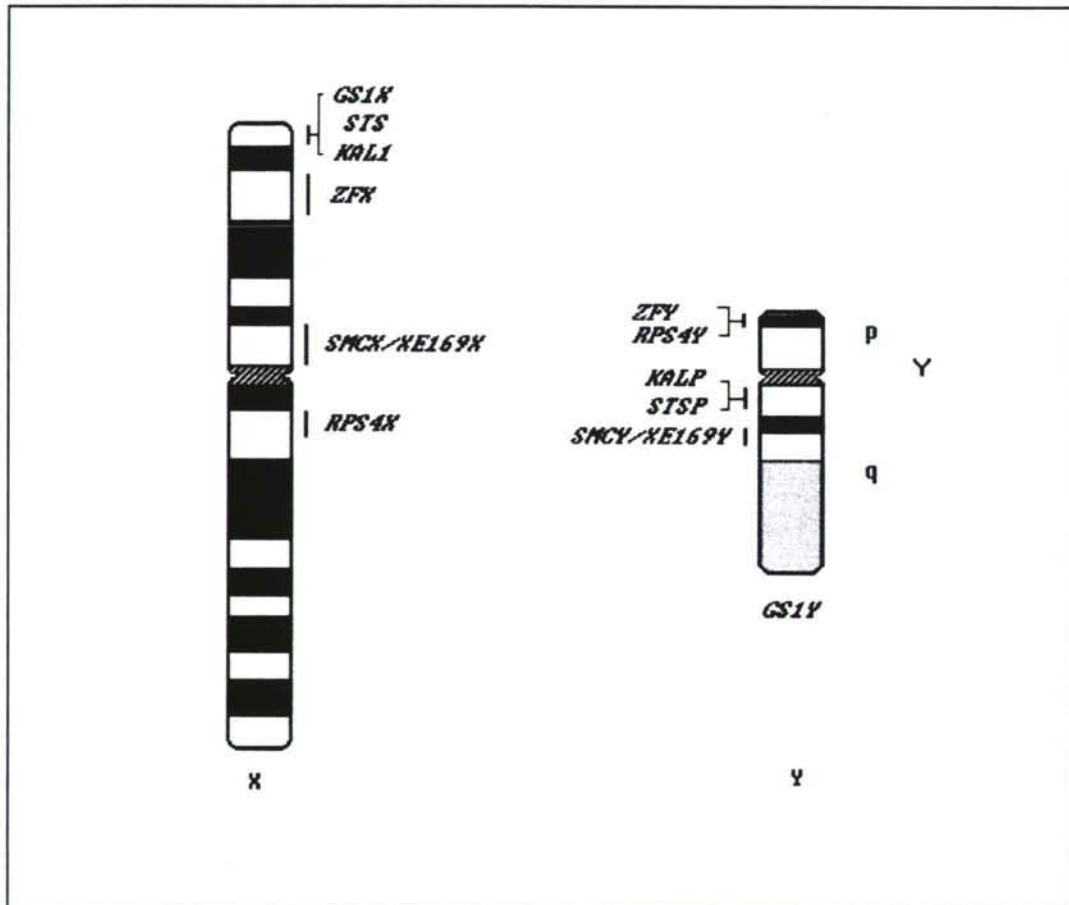
encuentra situado muy próximo al XIC en Xq13. RPS4X es el único gen del brazo largo que se sepa que se exprese a partir de ambos cromosomas X, del activo y del inactivo, y que tenga un homólogo en el cromosoma Y.

El mayor inconveniente que se encuentra en adjudicar un papel al *locus* RPS4 en el ST es su localización en Xq. Las evidencias apoyan una localización en el brazo corto, ya que las deleciones en Xp generalmente producen combinaciones fenotípicas severas. Una posible explicación es que los genes responsables pueden no estar delecionados pero sí inactivos por efectos posicionales en los cromosomas X con alteraciones estructurales (Therman y Susman, 1990).

La función de los genes ZFX y ZFY se desconoce (Ashworth y col., 1991) aunque sí se sabe que codifican proteínas con rasgos característicos de factores de transcripción (Koopman, Ashworth y Lovell, 1991; Erickson, Zwingman y Ao, 1993; Shimmin, Chang y Li, 1994). Ambos genes, ZFX y ZFY, se expresan tanto en células femeninas como masculinas y la extrema similitud de las proteínas que codifican permite sugerir que pueden tener una función intercambiable (Schneider-Gadicke y col., 1989). Ya que el gen ZFX escapa a la inactivación del cromosoma X, hombres y mujeres poseen dosis equivalentes de dichas proteínas (Ashworth y col., 1991)

Sin embargo, al contrario que en humanos, los ratones XO son viables (sin letalidad prenatal), anatómicamente normales y fértiles (Cattanach, 1962; Epstein, 1986; Endo y Watanabe, 1989; Omoe y Endo, 1993; Banzai y col., 1995). Ashworth y col. (1991) demostraron que estos dos genes en el ratón, el *Zfx* y el *Rps4X*, están bajo los efectos de la inactivación del cromosoma X (no se expresan en el cromosoma X inactivo). Estos datos apoyan la hipótesis de que la haploinsuficiencia de estos genes en humanos pueden jugar un papel importante en el ST (Ashworth y col., 1991).





**Ilustr. 7.** Genes que escapan a la inactivación del cromosoma X y que tienen su homólogo en el cromosoma Y (Disteche, 1995).

### 1.3. INTERÉS DE LAS TÉCNICAS GENÉTICAS Y MOLECULARES EMPLEADAS EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE TURNER

El diagnóstico del ST se hace generalmente mediante un estudio citogenético que comprende, básicamente, un cultivo de sangre periférica y el recuento cromosómico, tras un tratamiento con Tripsina y tinción con Giemsa (bandas G). El estudio citogenético clásico se lleva a cabo, generalmente, cuando el recién nacido muestra alguna de las alteraciones fenotípicas clásicas de dicho síndrome. Aunque se trata de una técnica relativamente fácil, por lo que ha llegado a ser una técnica rutinaria en los laboratorios de Genética Humana en los Hospitales, revela, en la mayoría de los casos, un cariotipo 45,X. Mediante esta técnica, un mosaicismo en porcentaje bajo suele ser muy difícil de detectar, o casi imposible, debido al elevado número de células que tendrían que ser contadas. Presentan, además, otros impedimentos como la imposibilidad de determinar el origen de pequeños fragmentos.

Hoy en día, el empleo de las técnicas de citogenética clásica sigue siendo imprescindible, pero insuficiente. Básicamente la detección de un mosaicismo depende de cuatro factores: del número de células analizadas (Hook, 1977), del tipo de tejido estudiado, de la sensibilidad de las técnicas aplicadas, y si existe o no, una selección *in vivo* o *in vitro*, en contra de la línea celular con la aberración cromosómica (Procter y col., 1984; Held y col., 1992). Por otro lado el estudio de mosaicismo se ve facilitado cuando se estudian dos tejidos (Held y col., 1992).

Por esta razón empieza a hacerse necesario la utilización de técnicas más sensibles, como la Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que nos permitan detectar mosaicismos de porcentajes bajos, y el origen de pequeños fragmentos cromosómicos.

#### 1.3.1. ESTUDIO CITOGENÉTICO: BANDEO CROMOSÓMICO

En el primer período interfásico, el material genético se encuentra disperso por el núcleo, formando la cromatina; cuando comienza la división mitótica y a medida que ésta progresa desde la profase a la metafase la cromatina se va condensando hasta constituir los cromosomas. Esta condensación se detiene antes de la finalización de la metafase, momento en el que los cromosomas alcanzan el mayor grado de empaquetamiento y condensación. Durante todo este proceso, la manipulación del material genético contenido en el núcleo mediante el uso de una serie de técnicas citogenéticas, permite conseguir que los cromosomas muestren diferentes patrones de bandas de tinción como consecuencia de la no homogeneidad de los mismos y de la existencia de áreas cromosómicas con distintos grados de condensación: Bandas G (Dutrillaux y Lejeune, 1971) bandas C (Sumner, 1972), bandas R (Dutrillaux y Lejeune, 1971; Dutrillaux, 1975; Verma y Lubs, 1975; Pai y



Thomas, 1980). De todas maneras, el número de bandas existentes en cada uno de estos patrones no permanece constante sino que, dependiendo del grado de empaquetamiento del cromosoma a lo largo de la mitosis, sufre una variación relativamente alta.

Los continuos avances en el estudio citogenético han proporcionado un mayor número de bandas a lo largo de los cromosomas humanos, en los primeros estadios de condensación cromosómica (Prieur, Dutrillaux y Lejeune, 1973; Yunis, 1976; Viegas-Pequiro y Dutrillaux, 1975; Francke y Oliver, 1978).

Durante los últimos años se ha incrementado el perfeccionamiento de los análisis cromosómicos mediante la introducción de métodos de marcaje muy detallados de los patrones de bandas a lo largo de cromosomas profásicos, obtenidos por sincronización parcial de cultivos celulares (Yunis, 1976; Viegas-Pequignot y Dutrillaux, 1978), que ha permitido incrementar el número de bandas G del cariotipo humano Welborn y Welborn, 1993a,b).

Otras técnicas emplean compuestos químicos como la 5-Bromodesoxiuridina (Zakharov y Egolina, 1972; Pai y Thomas 1980;) o el Hoechst-33258 (Latt, 1973; Goyanes y Méndez, 1981) que permiten subdividir las regiones cromosómicas antes citadas en sub-bandas claramente identificables aportando un conocimiento más profundo de la organización del material cromosómico y por consiguiente del cariotipo.

### 1.3.2. HIBRIDACIÓN «IN SITU»

La técnica de Hibridación *in situ* se fundamenta en la unión específica de una sonda de ADN marcada, con la secuencia complementaria presente en el tejido o preparación cromosómica que queremos estudiar, seguido de la visualización y localización de esta sonda. En nuestro caso nos interesa también cuantificar el número de señales por metafase, y su localización en el cromosoma.

La Hibridación *in situ* Fluorescente es un método directo y preciso, por ello se ha convertido en una técnica fundamental en el campo del diagnóstico molecular y de la investigación. Presenta una serie de ventajas sobre los métodos radiactivos como la alta sensibilidad y especificidad, resultados rápidos, estabilidad de la sonda, y un análisis directo a través del microscopio de fluorescencia.

Para descartar la existencia de mosaicismos en sangre, o en cualquier otro tejido, es imprescindible la utilización de técnicas genético-moleculares como FISH, dado que un bajo porcentaje de mosaicismos no puede ser detectado mediante las técnicas citogenéticas convencionales, debido al elevado número de células que tendrían que ser analizadas. En

este sentido, el empleo de sondas específicas, mediante FISH, facilita el estudio de un mayor número de células, ya que los núcleos también son informativos.

En el estudio de alteraciones cromosómicas, el empleo de sondas  $\alpha$ -satélites se ha convertido en una poderosa herramienta en la detección de alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, y es fundamental en el estudio del origen de pequeños fragmentos cromosómicos (Cremer y col., 1988; Poddighe y col., 1991; Rajangam y col., 1993).

Los  $\alpha$ -satélites comprenden una familia de secuencias repetidas en tándem, específicas de primates, presentes en las regiones pericentroméricas de cada uno de los cromosomas humanos. Su especificidad ha sido de gran utilidad en el reconocimiento de, aproximadamente, la mitad de todos los cromosomas humanos (Warburton y col., 1991). A pesar de la similaridad de las secuencias, esta es la única familia de ADN repetitivo con especificidad cromosómica (Wolfe y col., 1985).

Teniendo en cuenta que los fragmentos cromosómicos, cuando son de naturaleza estable, necesitan obligatoriamente un centrómero intacto, las sondas  $\alpha$ -centroméricas son de gran utilidad cuando es preciso determinar el origen de pequeños fragmentos cromosómicos. Los fragmentos acéntricos no sobreviven, tienden a perderse, ya que han perdido la capacidad de movimiento durante la anafase (Swanson, Merz y Young, 1981). La porción cromosómica que posee el centrómero funciona de manera que su dinámica en la división celular no se ve relativamente alterada aunque su potencial genético sí lo esté.

### ***1.3.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)***

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una poderosa técnica que permite la amplificación directa de pequeños fragmentos del genoma (Mullis y col., 1986; Mullis y Faloona, 1987). El método permite amplificar una secuencia entre dos puntos definidos, pero requiere conocer previamente la secuencia que hay a ambos lados de la región a amplificar. Primeramente se desnaturaliza una preparación de ADN (normalmente una muestra del genoma completo) y se hibrida con dos cebadores cortos (cada uno de aproximadamente 20 bases) que son complementarios de las cadenas opuestas a cada extremo de la región que se quiere amplificar. Para sintetizar la cadena complementaria a partir del extremo 3'-OH de cada cebador se emplea la enzima Taq polimerasa. El ciclo se repite desnaturalizando la preparación y empezando de nuevo. El número de copias de la secuencia elegida se amplifica, en teoría, exponencialmente. En la práctica se duplica en cada ciclo hasta que se acumula una cantidad de molde-cebador que excede la capacidad de la enzima; a partir de entonces la reacción comienza a saturarse.



En algunas mujeres el porcentaje de mosaicismo es tan bajo que sólo puede ser detectado por PCR. Por ello se puede utilizar esta técnica para detectar pequeños fragmentos cromosómicos. Debido a la importancia del origen de estos fragmentos es necesario determinar de manera clara si existen o no, restos del cromosoma Y en las mujeres con ST.

## 2. OBJETIVOS

Dado lo expuesto en el apartado anterior, nos propusimos en el presente trabajo de investigación el estudio citogenético-molecular de pacientes con síndrome de Turner, basado en los siguientes aspectos:

- a) Estudio exhaustivo del cariotipo de un grupo representativo de pacientes. La verificación del cariotipo inicial se realizó mediante las técnicas clásicas de bandeo cromosómico (bandas G), con posterior confirmación mediante Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH).
- b) Determinación del grado de mosaicismo oculto, en sangre periférica, siguiendo la Tabla de exclusión de mosaicismo de Hook (1977).
- c) Determinación del origen cromosómico de pequeños fragmentos presentes en las células estudiadas, mediante FISH y PCR.
- d) Detección del gen XIST en los cromosomas X con alteraciones estructurales.
- e) Establecimiento de la posible correlación entre el cariotipo y el fenotipo de las mujeres estudiadas.



## **SUJETOS Y MÉTODO**

### 3. SUJETOS Y MÉTODO

La selección de mujeres con síndrome de Turner (ST) se realizó a través del Servicio de Genética del Hospital Materno Infantil "Teresa Herrera" de A Coruña y del Servicio de Endocrinología Pediátrica del Hospital "Xeral de Galicia" de Santiago, en colaboración con la asociación "Crecer". Las muestras de sangre periférica fueron extraídas en tubos con heparina para el estudio citológico (Verma y Babu, 1994), y en tubos con anticoagulante EDTA (disodium ethylenediaminetetra acetate) para el análisis molecular (Aldridge y col., 1984).

#### 3.1. ESTUDIO CITOGÉNÉTICO

Una vez en el laboratorio, las muestras de sangre heparinizada se guardaron a 4°C. Nunca fueron utilizadas muestras con mas de 7 días en nevera debido al mal crecimiento celular (c.p. Dr. Held). Las muestras con EDTA fueron redistribuidas en alícuotas de 700 µl y almacenadas a -80°C hasta su utilización (c.p. Dr. Carracedo).

##### 3.1.1. OBTENCIÓN DE LAS PREPARACIONES CROMOSÓMICAS

###### 3.1.1.a. Cultivo estándar de linfocitos

El análisis cromosómico se llevó a cabo mediante la técnica estándar de cultivo de linfocitos T a partir de sangre periférica (Moorhead y col., 1960; den Nijs y col., 1985) con ciertas modificaciones (c.p. Dr. Held). Posteriormente se procedió a la tinción de los cromosomas por la técnica de bandas G (Seabright, 1971) para la verificación del cariotipo inicial.

El cultivo de linfocitos se realizó de la siguiente manera: incubación de 8-10 gotas de sangre heparinizada por cada 4 ml de medio de cultivo (TC chromosome microtest medium, DIFCO) a 37,5°C durante tres-cuatro días (72-96 horas) en estufa de cultivo dedicada a tal efecto.



### *Bloqueo de la mitosis en metafase*

Al cabo de este tiempo, se añadió 1 ml colchicina (Arresting DIFCO) a una concentración de  $5 \times 10^{-6}$  M y se mantuvo en baño a  $37,5^{\circ}\text{C}$  durante 45-60 minutos.

La colchicina es un alcaloide que interfiere la formación del huso mitótico y bloquea la división celular. Esto provoca la acumulación de células en el estado de metafase, así como el acortamiento y la condensación de los cromosomas. Un tiempo de tratamiento con la colchicina demasiado largo produce una alta condensación de los cromosomas, por el contrario, un tiempo demasiado corto y/o concentración débil puede provocar la ausencia de metafases.

### *Choque hipotónico*

Tras una centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos se retiró el sobrenadante, excepto 1/4 cc, y se procedió al choque hipotónico resuspendiendo el botón celular en 7 ml de KCl 0,075 M a  $37,5^{\circ}\text{C}$  en agitación. Posteriormente se mantuvo la muestra en un baño a  $37,5^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.

El tratamiento con una solución hipotónica tiene por finalidad provocar la turgencia de las células y una buena dispersión de los cromosomas; la naturaleza y la concentración de la disolución, así como la duración del tratamiento son importantes. Para proceder al choque hipotónico se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones (Verma y Babu, 1994):

- El KCl se calentó previamente a  $37,5^{\circ}\text{C}$ .
- Se añadió muy lentamente, dejando pasar unos segundos después de la primera gota.
- El tiempo de actuación del KCl nunca fue superior a 12 minutos.

Tras una centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular para su posterior fijación.

### *Fijación Celular*

La fijación está destinada a conservar las células sin alterar ni deformar su contenido. La solución fijadora debe ser preparada en el momento y a la temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ . Las células se fijaron con 5 ml de una solución de 3 volúmenes de metanol y un volumen de ácido acético, en constante agitación, realizándose tres baños sucesivos de 20 minutos cada uno a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Al igual que la solución hipotónica, el fijador se añadió muy lentamente.

La extensión de la muestra se realizó en portaobjetos muy limpios, húmedos y fríos, a una distancia aproximadamente de 40 cm, tras un reposo de 15 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  (c.p. Dr. Held).

### 3.1.1.b. Cultivo sincronizado de linfocitos

Cuando fue necesario obtener cromosomas prometafásicos que nos permitieran definir con más claridad los cromosomas (fundamentalmente cromosomas con alteraciones estructurales) se llevó a cabo el cultivo linfocitario sincronizado mediante Amethopterina (Yunis, 1976) y se continuó la replicación en presencia de Bromodesoxiuridina (BrdU), sin la adicción exógena de Timidina (Pai y Thomas, 1980).

La sustitución de la Timidina por su análogo Bromodesoxiuridina durante la fase de síntesis del ADN, retarda la condensación de las regiones ricas en pares de bases Adenina-Timina, provocando un alargamiento neto de los cromosomas (Zakharov y Egolina, 1972). Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

Incubación de 8-10 gotas de sangre heparinizada por cada 4 ml de medio de cultivo a  $37,5^{\circ}\text{C}$  durante dos o tres días (48-72 horas) en estufa de cultivos. Diecisiete horas antes del procesado se añadió, para la sincronización celular, Amethopterina (SIGMA) hasta una concentración final de  $10^{-7}$  M.

Transcurrido este tiempo, y tras 10 minutos de centrifugación a 1.000 rpm, se reemplazó el medio de cultivo por otro nuevo y se añadió  $25\ \mu\text{g}$  de BrdU por ml de medio. Se incubó a  $37,5^{\circ}\text{C}$  durante 5-5,30 horas y se añadió Colchicina a una concentración final de  $0,1-0,2\ \mu\text{g}$  por ml de medio manteniéndose nuevamente a esta temperatura durante 20-30 minutos. Los pasos siguientes (choque hipotónico y fijación) se realizaron como un cultivo linfocitario estándar.

Las metafases así obtenidas fueron utilizadas para la Hibridación *in situ* en aquellos casos que presentaron un cromosoma X con alteración estructural no muy definida.

### 3.1.2. TINCIÓN DE CROMOSOMAS: TÉCNICA DE BANDAS G

La técnica de tinción cromosómica de bandeado G es la más utilizada frecuentemente y permite distinguir la morfología de los cromosomas, siendo de gran utilidad en la obtención del cariotipo. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

Primeramente se procedió al envejecimiento de los cromosomas en estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos (den Nijs y col., 1985). Una vez fríos, se incubó en solución de Tripsina (1:250 DIFCO) al 0,05% en NaCl (0,9%) durante 3-5 segundos, seguido de un



breve lavado en tampón fosfato pH 6,8 y tinción con solución Giemsa, compuesta de 2,5 ml del colorante, 5 ml de tampón fosfato pH 6,8 y 42,5 ml de agua destilada, de 5-7 minutos. Transcurrido el tiempo de tinción, las preparaciones se lavaron muy brevemente con agua, procediendo al secado de las extensiones mediante el método clásico de secado al aire.

### 3.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

#### 3.2.1. SONDAS EMPLEADAS

La técnica de FISH se empleó para confirmar el cariotipo inicial y para estudiar la presencia de mosaicismo oculto. Para que un cromosoma, o un fragmento, sea estable es necesario la existencia del centrómero. Sin un centrómero, un fragmento cromosómico tiende a distribuirse arbitrariamente en la mitosis, y se perderá en el transcurso de las sucesivas divisiones. Por este motivo se utilizaron sondas y cebadores centroméricos.

El estudio del cromosoma X se realizó mediante la utilización de la sonda  $\alpha$ -centromérica **DXZ1** biotinilada (Oncor) que hibrida específicamente con la región  $\alpha$ -satélite altamente repetitiva del centrómero de dicho cromosoma (Waye y Willard, 1985; Willard y Waye, 1987a,b).

La naturaleza del material implicado en las reestructuraciones fue determinado mediante la utilización de dos sondas: la sonda de copia única **XIST**, marcada con digoxigenina (Oncor), que detecta el *locus* XIST en Xq13.2 y es el responsable de la inactivación del cromosoma X (Brown y col., 1991a,b); y la sonda macrosatélite **DXZ4** marcada con biotina (Oncor), que hibrida específicamente con un cluster de 50-100 copias de repeticiones de 3 kb localizadas en la región Xq24 (Giacalone, Friedes y Francke, 1992).

La utilización de estas sondas permite reconocer variaciones de la forma común del ST que quedan reflejadas en la Tabla 3, en la cual cada asterisco representa una señal fluorescente.

Tabla 3. Variaciones de la forma común del ST, según la sonda aplicada.  
Cada asterisco representa una señal fluorescente.

Cariotipo	DXZ1 ( $\alpha$ -satélite)	XIST (Xq13)	DXZ4(Xq24)
46,XX	**	**	**
45,X	*	*	*
46,X,i(Xq)	**	***	***
46,X,del(X)(p?)	**	**	**
46,X,idic(Xq)	***	***	***
46,X,idic(Xp)	***	***	*

El estudio del cromosoma Y se realizó mediante las sondas:  $\alpha$ -centromérica **DYZ3** biotinilada (Oncor) que hibrida específicamente con la región  $\alpha$ -satélite altamente repetitiva del centrómero de dicho cromosoma y la **DYZ1**, marcada también con biotina, y específica para las repeticiones satélites "clásicas" AATGG localizadas en la región heterocromática pericéntrica del cromosoma Y (Wevrick y Willard, 1989).

Cuando se estudió la presencia del cromosoma Y fue necesario el procesamiento, simultáneo e idéntico, de preparaciones cromosómicas de un varón como control positivo. En cuanto a la sonda DXZ1 la señal fluorescente del cromosoma X intacto en las mujeres Turner sirve como control interno, por lo que no fue necesario la incorporación de controles positivos de una mujer sana.

Para descartar la presencia de alteraciones numéricas o estructurales debidas al método empleado, se empleó la sonda  $\alpha$ -satélite **D1Z5** que hibrida específicamente con las secuencias altamente repetitivas localizadas en el centrómero del cromosoma 1. Ello se llevó a cabo en cultivos de tres y cuatro días de mujeres control 46,XX y de una de las pacientes con ST.

Dependiendo del número y tipo de sondas los procedimientos seguidos para la Hibridación *in situ* fueron fundamentalmente dos, los cuales se describen a continuación y son una adaptación comercial (Oncor) del método originalmente descrito por Pinkel, Straume y Gray, (1986).



Tabla 4.- ESQUEMA GENERAL DE HIBRIDACIÓN *IN SITU***PREPARACIÓN DE PORTAOBJETOS Y FIJACIÓN DEL MATERIAL**

- preservar la morfología del cromosoma  
metanol / ac. acético

**PRETRATAMIENTO DEL MATERIAL (opcional)**

- Tratamiento para prevenir ruido de fondo.
  - Tratamiento con Rnasa
  - Inactivación enzimas endógenos
- Permeabilización.
  - detergentes / alcohol
  - proteasas

**PREHIBRIDACIÓN (opcional)**

- prevenir ruido de fondo
- Incubación en solución de hibridación (contiene todos los componentes de la solución de hibridación, excepto la sonda, a la misma temperatura)

**DESNATURALIZACIÓN DE LA SONDA Y MUESTRA**

- pH o calor
- simultanea o separadamente sonda y muestra

**HIBRIDACIÓN**

Componentes más frecuentes:

- Denhardt's Mix (Ficoll, BSA, PVP)
- EDTA, SDS, Fosfato sódico
- Formamida.
- Dextran sulfato

**POSTHIBRIDACIÓN**

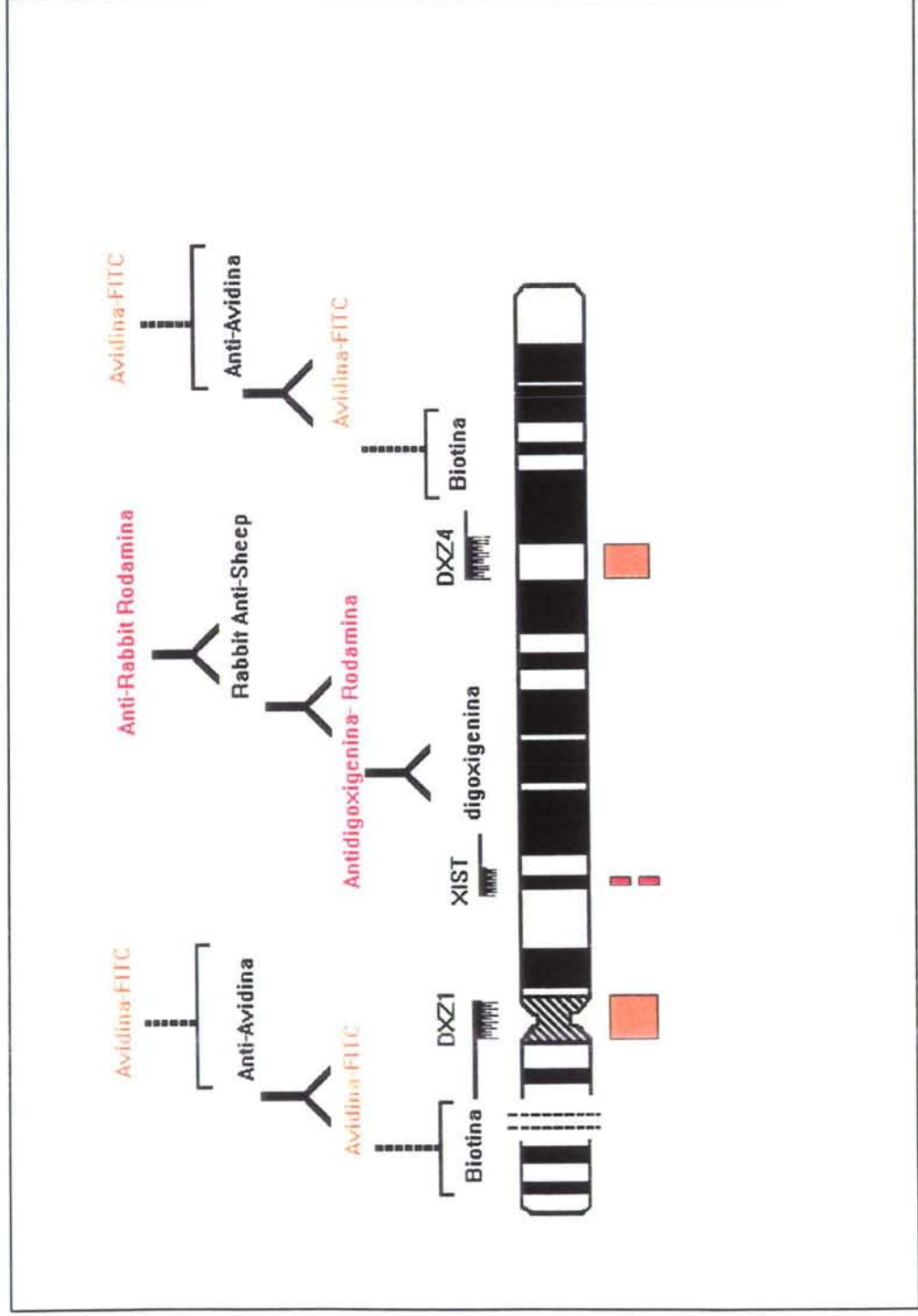
- lavados de astringencia máxima que elimine el exceso de sonda no hibridada y que evite la hibridación no específica

**DETECCIÓN IMMUNOLÓGICA**

- agente bloqueante
- incubación con anticuerpos específicos
- substrato colorimétrico o fluorescencia
- contratinción y montaje

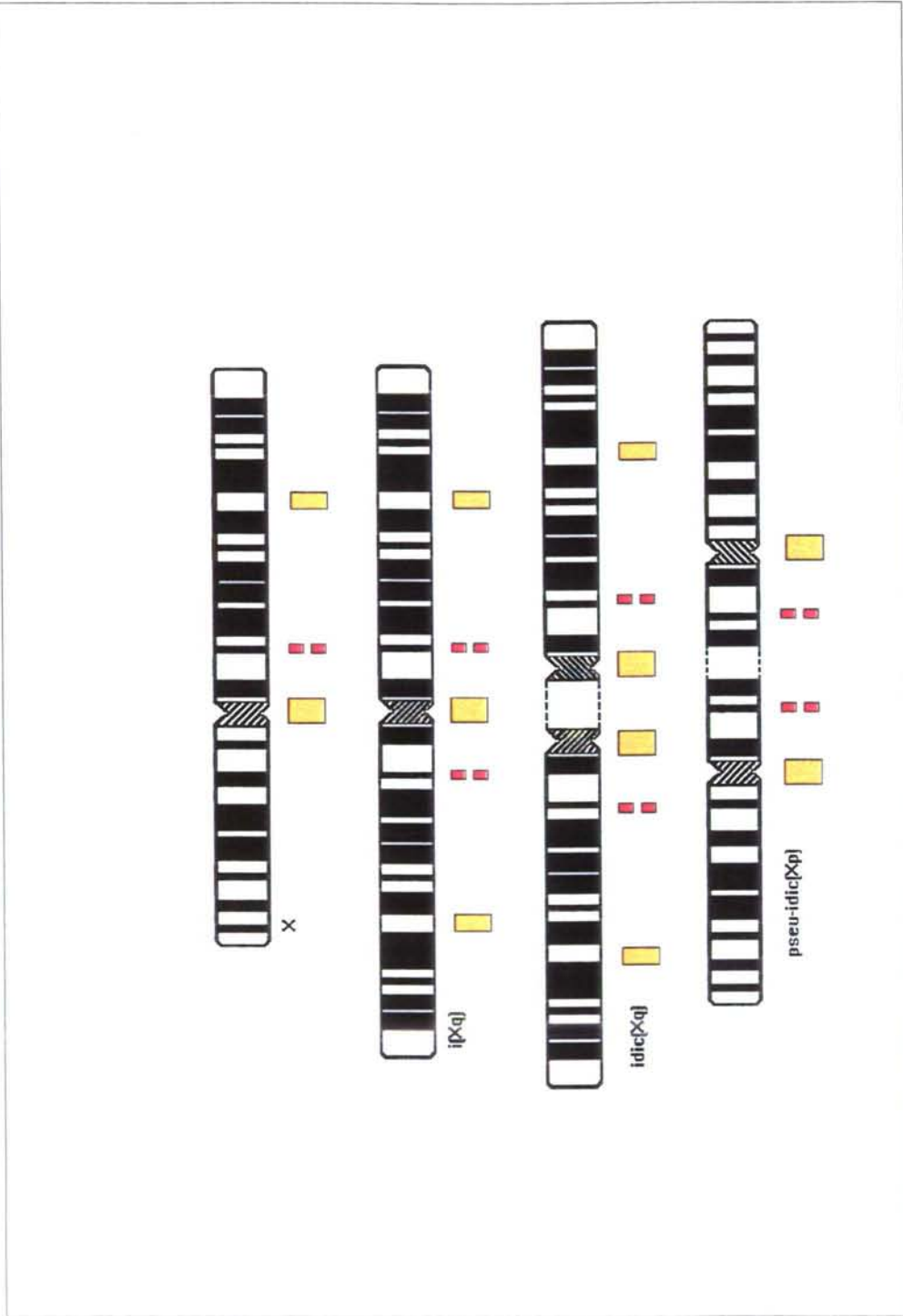
**MICROSCOPIA**

- análisis de resultados por microscopía



**Ilustr. 8.-** Esquema general de FISH indicando las sondas aplicadas y su localización en el cromosoma X.





**Ilustr. 9.-** Esquema de los diferentes tipos de alteraciones estructurales del cromosoma X y su correspondiente localización de las señales fluorescentes en la Hibrización in situ.

### 3.2.2. PROCEDIMIENTO DE FISH PARA LA HIBRIDACIÓN CON UNA SONDA: (DXZI, DXZA, XIST, DYZI, DYZ3 O DIZ5)

#### *Preparación de la muestra*

La preparación y extensión de la muestra a partir de sangre periférica se realizó según el método estándar (Moorhead y col., 1960; den Nijs y col., 1985) indicado anteriormente. Las extensiones utilizadas fueron frescas, en caso contrario se reemplazó el Carnoy por otro recién hecho, tras previa centrifugación. Nunca se utilizaron preparaciones cromosómicas envejecidas ya que dificulta la hibridación y disminuye la señal.

#### *Pretratamiento*

Las preparaciones cromosómicas fueron tratadas con RNAsa A (100  $\mu\text{g/ml}$  en 2xSSC) a 37°C durante una hora. Este tratamiento ayuda a eliminar el fondo fluorescente resultado de uniones no específicas, al mismo tiempo que facilita la unión específica. A continuación se prosiguió con lavados en 2xSSC y una deshidratación en baños sucesivos de etanol frío (70%, 80% y 95%).

#### *Desnaturalización*

La desnaturalización del ADN cromosómico se llevó a cabo por inmersión de los portaobjetos en solución de desnaturalización (70% Formamida/2xSSC) a 70°C durante 1-2 minutos, con agitación periódica. Inmediatamente se transfirieron a etanol frío al 70%. Se continuó con lavados sucesivos de 2 minutos en etanol frío al 80%, 90% y 100%. Posteriormente se dejaron secar las muestras al aire.

Paralelamente se procedió a la desnaturalización de la sonda, para ello se mezcló 1,5  $\mu\text{l}$  (10 ng/ $\mu\text{l}$ ) de sonda y 30  $\mu\text{l}$  del tampón de hibridación específico para cada sonda, por cada portaobjetos, se desnaturalizó a 70°C durante 5 minutos y se enfrió rápidamente a 0°C para evitar la renaturalización.

La única sonda que no se desnaturalizó fue la XIST, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, debido a que incluye ADN bloqueante por lo que no precisa ser desnaturalizada.



### *Hibridación*

Sobre cada portaobjetos se depositó 31,5  $\mu$ l de la solución (DXZ1, DXZ4, DYZ1, DYZ3 o D1Z5) y se cubrió con un cubreobjetos. La sonda XIST fue añadida directamente (10  $\mu$ l de sonda). Se sellaron los portaobjetos a lo largo de todo el perímetro y se incubaron a 37°C durante 4-16 horas en cámara de hibridación húmeda. El tiempo de incubación para la sonda XIST nunca fue inferior a 16 horas por ser una sonda de copia única.

### *Lavados de posthibridación*

Transcurrido el tiempo de hibridación se procedió al lavado para la eliminación del exceso de sonda. La astringencia de este lavado varía dependiendo del tipo de sonda, así para las sondas  $\alpha$ -centroméricas se llevó a cabo un lavado de alta astringencia: 65% Formamida/2xSSC a 43°C durante 15 minutos con agitación periódica, seguido de un lavado en 2xSSC (pH 7.0) a 37°C durante 8 minutos; mientras que la sonda XIST requiere un lavado de baja astringencia: 50% Formamida/2xSSC a 43°C durante 15 minutos con agitación periódica, seguido de un lavado en 2xSSC (pH 7.0) a 37°C durante 8 minutos. Se prosiguió con un lavado en PBD [2-fenil-5-(4-bifenilil)-1,3,4-oxadiazol] hasta el inicio de la incubaciones inmunocitoquímicas.

### *Detección: Incubaciones Inmunocitoquímicas*

Según el marcaje de la sonda empleada (conjugación con biotina o digoxigenina) se prosiguió con los anticuerpos que se señalan en la Tabla 5.

**Tabla 5.- Incubaciones según el tipo de marcaje de la sonda**

Detección	1ª incubación	2ª Incubación	3ª Incubación	Tinción
Biotina	Avidina-Fluoresceína	Anti-Avidina	Avidina-Fluoresceína	PI
Digoxigenina	Antidigoxigenina-Rodamina	Rabbit Anti-Sheep	Anti-Rabbit-Rodamina	DAPI

Cada incubación inmunocitoquímica consistió en la adicción de 60  $\mu$ l de la disolución correspondiente y en la incubación de las preparaciones a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se prosiguió con 3 lavados en PBD, de dos minutos cada uno, en agitación constante, pero sin violencia, y a temperatura ambiente<sup>4</sup>. Una vez finalizadas las tres incubaciones

<sup>4</sup> Los lavados en PBD fueron realizados en cápsula Petri totalmente cubierta, evitando el contacto de las preparaciones con la luz; ello favoreció una mayor intensidad de las señales fluorescentes.

immunocitoquímicas se procedió a la contratinción de las preparaciones con la solución de tinción adecuada (Ioduro de Propidio o DAPI) y a la observación al microscopio de fluorescencia y fotografiado de las muestras.

Por cada paciente se trataron, como mínimo y dependiendo del grado mitótico, tres portaobjetos conteniendo las preparaciones cromosómicas correspondientes, dos para el estudio del cromosoma X y uno para el cromosoma Y. En el caso de señal positiva para el cromosoma Y se repitió el experimento con las sondas específicas para este cromosoma en tres preparaciones más, con el correspondiente control positivo.

Para determinar el grado de mosaicismo oculto en los casos 45,X se empleó la Tabla de exclusión de mosaicismo de Hook (1977) (ver Anexo) que determina el grado de mosaicismo excluido según el número de células analizadas. Aunque una de las ventajas de la técnica de FISH es que tanto metafases como núcleos son informativos, para calcular el grado de mosaicismo sólo hemos tenido en cuenta el número de metafases analizadas.

El microscopio utilizado fue un fotomicroscopio de fluorescencia Nikon con cámara fotográfica incorporada. La película utilizada fue Kodak de 600 ISO/ASA y el tiempo de exposición rondó entre los 40-80 segundos.

### ***3.2.3. PROCEDIMIENTO DE FISH PARA LA HIBRIDACIÓN CONJUNTA DE SONDAS DE DIFERENTES CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN***

En las pacientes con alteraciones estructurales del cromosoma X se llevó a cabo la hibridación conjunta de las sondas DXZ1 y XIST. Este procedimiento requiere una hibridación secuencial ya que las sondas son de condiciones de hibridación diferentes (alta y baja astringencia). El procedimiento seguido fue el recomendado por la casa comercial consistente en:

Primero se procedió a la hibridación y a los lavados de posthibridación de la sonda de alta astringencia (DXZ1) de acuerdo con los pasos señalados anteriormente. El tiempo de hibridación fue de 4 horas. Se prosiguió con los lavados de posthibridación y al finalizar el lavado de 2xSSC se añadió la sonda de baja astringencia (XIST), se cubrió, se selló y se dejó hibridar durante toda la noche a 37°C en cámara húmeda.

Los lavados de posthibridación consistieron en un primer lavado en 50% formamida/2xSSC a 43°C 15 minutos seguido de un lavado en 2xSSC a 37°C 8 minutos ambos en agitación. A continuación se prosiguió con la detección y amplificación con los anticuerpos correspondientes para la biotina y seguidamente por los específicos para la digoxigenina.



### 3.3. ESTUDIO MOLECULAR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Una vez realizado el cariotipo (tinción de cromosomas con bandas G) y aplicada la técnica de hibridación *in situ*, se procedió, mediante PCR (*Reacción en cadena de la Polimerasa*), al estudio de la existencia del cromosoma Y, o un fragmento del mismo, en las pacientes con ST a partir de sangre periférica. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

#### 3.3.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE ALTO PESO MOLECULAR A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

La extracción de ADN genómico de alto peso molecular a partir de sangre periférica se realizó mediante el protocolo modificado de Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989). Primero se procedió a descongelar la muestra de 700  $\mu$ l en un baño a 37°C y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos. Finalizada la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se redisolvió el sedimento de leucocitos en 800  $\mu$ l de Tampón B (pH 8.0): Tris.HCl 50 mM, NaCl 150 mM y EDTA 100 mM; posteriormente se dividió el sedimento en dos tubos Eppendorf y se añadieron 25  $\mu$ l de SDS al 20% y 6  $\mu$ l de proteinasa K con una concentración 20 mg/ml. A continuación se agitó y se incubó 1 hora a 60°C.

Posteriormente se añadieron 80  $\mu$ l de perclorato sódico 5 M, invirtiendo varias veces el tubo sin violencia con el fin de obtener una buena mezcla; posteriormente se añadieron 500  $\mu$ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión. Tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos se recogió cuidadosamente el sobrenadante con pipeta y se pasó a otro tubo, añadiéndosele 500  $\mu$ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión. Tras una nueva centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos se recogió el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol absoluto frío y nuevamente se mezcló por inversión. Se prosiguió con una centrifugación a 12.000 rpm durante 1 minuto, retirando el etanol por decantación. Finalmente se lavó el ADN con 500  $\mu$ l de etanol al 80% frío y se centrifugó nuevamente 5 minutos a 12.500 rpm. Retirado el alcohol se dejó secar el ADN al aire y se resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón TE (tampón Tris-EDTA) estéril.

#### 3.3.2. AMPLIFICACIÓN DE LA MUESTRA DE ADN POR PCR

Para el análisis de las secuencias  $\alpha$ -centroméricas de los cromosomas X e Y mediante PCR se utilizaron dos pares de cebadores: X1, X2 (Waye y Willard, 1985) e Y1, Y2 (Wolfe y col., 1985) respectivamente, cuyas secuencias fueron descritas por Witt y Erickson (1989, 1991). En caso positivo de presencia del centrómero del cromosoma Y,

se procedió a la amplificación del gen SRY mediante los cebadores XES7, XES2 localizados en la fase abierta de lectura de dicho gen (Berta y col., 1990).

Los cebadores X1, X2 se utilizaron para amplificar un fragmento de 130 pb localizado en la región centromérica del cromosoma X (Waye y Willard, 1985). Los cebadores Y1, Y2 amplifican un fragmento de 170 pb localizado en la región centromérica del cromosoma Y (Wolfe y col., 1985; Witt y Erickson 1989, 1991).

Cuando se amplificó la región centromérica del cromosoma Y, y para evitar falsos positivos, tanto en las muestras de mujeres Turner como en las de los varones control, las muestras de ADN se digirieron previamente con la enzima de restricción *EcoRI* según las recomendaciones de la casa comercial (4 U/ $\mu$ g toda la noche a 37°C). Ello permite una mayor especificidad en el diagnóstico ya que el fragmento de 170 pb amplificado no contiene ninguna diana de restricción para esta enzima (Witt y col., 1993).

Para estimar el rango de sensibilidad del método se procedió a la creación de mosaicos artificiales 46,XX/46,XY mediante la mezcla de ADN de un varón y una mujer controles en proporciones diferentes: 100%, 50%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01% ADN de varón con respecto al ADN de mujer. Los cebadores utilizados fueron los centroméricos del cromosoma Y. Para minimizar el número de falsos positivos, todas las reacciones (previa adición del ADN muestra, cebadores y nucleótidos) se irradiaron con UV durante 5 minutos.

### *Condiciones de amplificación*

Para la amplificación de las regiones centroméricas de los cromosomas X e Y: X1, X2 (Waye y Willard, 1985) e Y1, Y2 (Wolfe y col., 1985). Se utilizó el procedimiento señalado por Witt y col. (1993). La secuencia de los cebadores empleados y los tiempos de desnaturalización, anillado y extensión, se especifican a continuación:

X1: 5' AATCATCAAATGGAGATTTG 3'

X2: 5' GTTCAGCTCTGTGAGTGAAA 3'

Y1: 5' ATGATAGAAACGGAAATATG 3'

Y2: 5' AGTAGAATGCAAAGGGCTCC 3'



100 ng ADN	
200 $\mu$ M dNTPs	Total 30 ciclos:
0,5 $\mu$ M de cada primer	- Desnaturalización a 94°C durante 1 minuto.
1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	- Anillado a 57°C 1 minuto.
10 mM Tris (pH 8.3)	- Extensión 72°C 1 minuto.
50 mM KCl	
2,5 U Taq polimerasa	

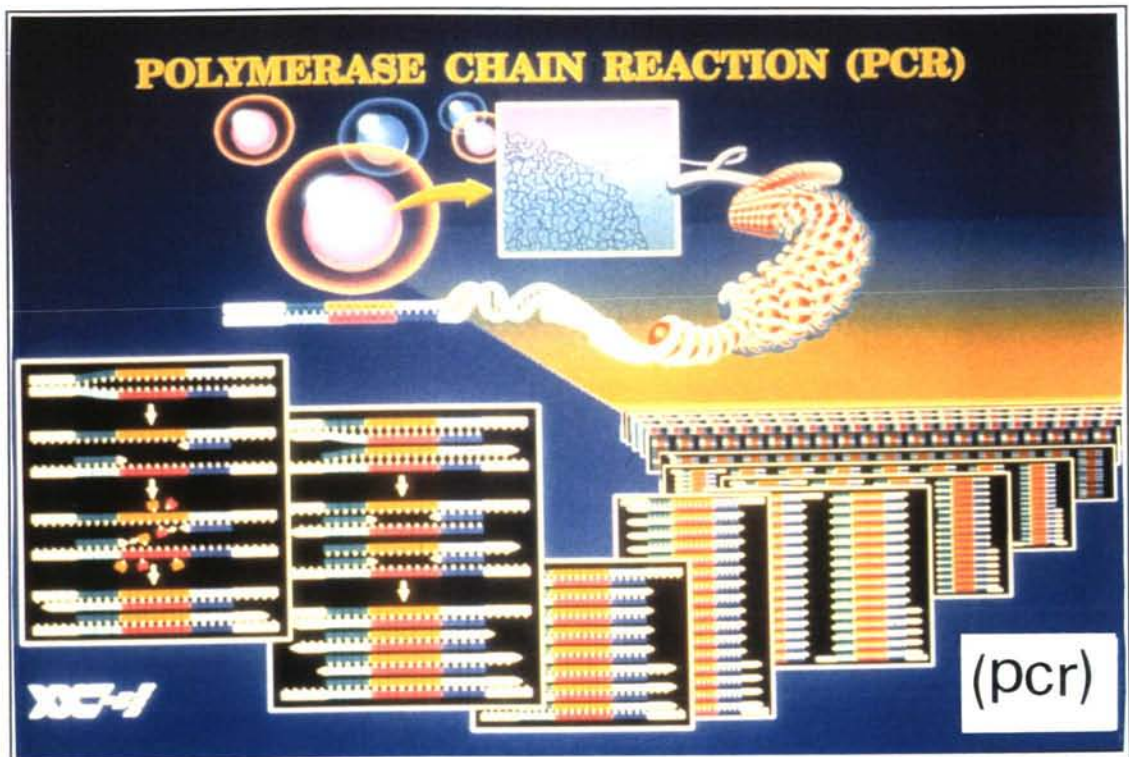
Para la amplificación del gen SRY con los cebadores: XES7, XES2 que flanquean un fragmento de 609 pb se siguió el protocolo señalado por Berta y col., (1990)

XES7: 5' CCCGAATTCGACAATGCAATCATATGCTTCTGC 3'

XES2: 5' CTGTAGCGGTCCCGTTGCTGCGGTG 3'

100 ng ADN	
200 $\mu$ M dNTPs	Total 35 Ciclos:
0,5 $\mu$ M de cada primer	- Desnaturalización a 94°C durante 1,2 minutos.
1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	- Anillado a 65°C 1,2 min
10 mM Tris (pH 8.3)	- Extensión a 72° 2 min
50 mM KCl	
2,5 U Taq polimerasa	

El producto de PCR fue analizado mediante gel de agarosa al 2%. El gel se tiñó con Bromuro de Etidio siguiendo el protocolo de Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989).



Ilustr. 10.- Esquema general de PCR tomado de Roche.



## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

En las Tablas que se exponen a continuación se reflejan los resultados obtenidos. En la Tabla 6 se muestra el diagnóstico previo de los pacientes cuyas muestras fueron remitidas a nuestro laboratorio; este diagnóstico fue realizado fundamentalmente mediante bandas G. En las dos columnas siguientes de la misma Tabla se muestra el cariotipo final obtenido en nuestro estudio utilizando FISH; se hace referencia al número de metafases analizadas mediante esta técnica y al porcentaje de cada una de las líneas celulares.

En la Tabla 7 se muestran los rasgos fenotípicos de cada uno de los casos estudiados, agrupados según el cariotipo final. La edad de los pacientes osciló entre 3,5 y 35 años, siendo la media de edad 14,5 años.

En la Tabla 8 se muestra la comparación del diagnóstico previo y el diagnóstico final, según la técnica utilizada.

En la Tabla 9 se muestran los resultados de los seis principales estudios citogenéticos realizados desde 1976, en comparación con los datos obtenidos en nuestro estudio.

En la Tabla 10 se comparan nuestros resultados con el estudio molecular realizado por Connor y Loughlin en 1991.



Tabla 6. Cariotipo inicial de cada paciente y cariotipo final por Hibridación *in situ*. Número de metafases analizadas y porcentaje de cada una de las líneas celulares.

Paciente	Diagnóstico previo	Hibridación <i>in situ</i>	
		Nº Metafases	Diagnóstico final
1	45,X/46,XX	348	45,X/46,XX (3,6%/96,4%)
2	45,X	301	45,X/46,XX (98,7%/1,3%)
3	?	325	46,XX
4	45,X/47,XXX	439	45,X/47,XXX (82,5%/17,5%)
5	45,X	532	45,X/46,XX (99,6%/0,4%)
6	?	727	46,XY
7	45,X	637	45,X/46,XX (99,7%/0,3%)
8	45,X	1.085	45,X/46,XX (99,8%/0,2%)
9	45,X	354	45,X (** mosaicismo <2%)
10	45,X	664	45,X/46,XX (99,2%/0,8%)
11	45,X/47,XXX/ 47,XX,del(X)(p?)	355	45,X/47,XXX/47,XX,del(X)(p?) (41,4%/35,5%/23,1%)
12	45,X/46,XX	830	45,X/46,XX/46,X, idic(Xp) (94,7%/0,7%/4,6%)
13	45,X	615	45,X/46,X + frag(X) (99%/1%)
14	45,X/46,X,i(Xq)	334	45,X/46,X,i(Xq) (81%/19%)
15	45,X/46,XX	910	45,X/46,XX (65%/35%)
16	45,X/46,X,del(X)(q12)	459	45,X/46,X, idic(Yp <sup>mf</sup> ) (59%/41%)
17	45,X	378	45,X/46,XX (99%/1%)
18	45,X	319	45,X (** mosaicismo <2%)
19	45,X/46,X,del(X)(q?)	443	45,X/46,XX/46,X,del(X)(p?) (83,5%/0,8%/15,7%)
20	45,X/46,XX	427	45,X/46,XX (5%/95%)
21	45,X/46,X,del(X)(q11)	314	45,X/46,X,del(X)(p?) (25%/75%)
22	45,X/46,X,i(Xq)/ 47,X,i(Xq),i(Xq)	800	45,X/46,X + frag(X)/ (43,7%/0,8%) 46,X,del(X)(p?)/46,X, idic(Xq)/ (0,8%/50,7%) 47,X, idic(Xq) + frag(X)/ (0,3%) 47,X, idic(Xq),del(X)(p?)/ (1,2%) 47,X, idic(Xq), idic(Xq)/ (1,7%) 47,X, idic(Xq) + r(X)/ (0,5%) 48,X, idic(Xq), idic(Xq), idic(Xq)/ (0,3%)
23	45,X/47,XXX	426	45,X/46,XX/47,XXX (87%/6%/7%)
24	46,X,i(Xq)	383	45,X/46,X, idic(Xq)/ (14,4%/60,6%) 47,X, idic(Xq),del(X)(p?)/ (1,3%) 47,X, idic(Xq), idic(Xq) (23,7%)
25	45,X	305	45,X/46,XX/46,X, idic(Xq) (91%/7/2%)
26	45,X/46,X, idic(Xq)	412	45,X/46,X, idic(Xq)/ (29,6%/69,9%) 47,X, idic(Xq), idic(Xq) (0,5%)
27	45,X/46,X + mar(?)	560	45,X/46,X + frag(X) (30/70%)
28	45,X	385	45,X (** mosaicismo <2%)
29	45,X	640	45,X/46,XX (99,7%/0,3%)
30	?	525	46,XX

\*\* Porcentaje de mosaicismo excluido con un grado de confianza de 0,99 según la Tabla de exclusión de Hook (1977), en base al número de metafases analizadas.

Tabla 7. Cariotipo y rasgos fenotípicos de los sujetos estudiados, agrupados según el cariotipo por FISH.

Paciente	Cariotipo	Rasgos Fenotípicos
<b>NO MOSAICOS</b>		
9	45,X	Edad 17 años. Talla 155 cm. Tórax en escudo, linfedema de pies, uñas hipoplásicas, útero normal, ovarios no identificados, ligera hipertrofia del clítoris, escoliosis dorso lumbar, anomalía menor de válvula aórtica (posible aorta bivalva). Tratada con GH, curva de crecimiento elevada (talla padres elevada).
18	45,X	Edad 3,5 años. Talla 88 cm. Implantación baja del cabello, orejas grandes y de implantación baja, <i>Pterygium colli</i> , clinodactilia, uñas hipoplásicas, micrognatia, coartación de aorta. Ningún tratamiento. Desconocido datos sobre útero y ovarios por su edad.
28	45,X	Edad 12,9 años. Talla 143,2 cm, ligera ptosis palpebral bilateral, paladar ligeramente ojival, cuello ancho y corto, <i>Pterygium colli</i> , tórax en coraza, mamilas excesivamente separadas, uñas hipoplásicas, linfedema de manos y pies observado al nacer, estrabismo convergente corregido, útero hipoplásico.
<b>MOSAICOS</b>		
	45,X/46,XX	
8	45,X/46,XX 99,8%/0,2%	Edad 10,6 años. Sin clínica característica salvo talla baja (110 cm). Tratada con GH. Diagnóstico tardío, problemas visuales.
29	45,X/46,XX 99,7%/0,3%	Edad 3,8 años. Talla 94,2 cm, orejas de implantación baja, retrognatia, asimetría facial, ptosis palpebral izquierda, paladar ojival, <i>Pterygium colli</i> , linfedema de manos y pies, hernia umbilical, infecciones frecuentes de vías respiratorias superiores.
7	45,X/46,XX 99,7%/0,3%	Edad 23 años. Talla 135 cm. Implantación baja del cabello, cuello ancho y corto, <i>Pterygium colli</i> , tórax en escudo, mamilas muy separadas. No recibió GH por retraso en el diagnóstico, tratada con estrógenos y progestágenos. Desarrollo de caracteres sexuales secundarios completo. Se desconoce datos sobre útero y ovarios.
5	45,X/46,XX 99,6%/0,4%	Edad 22 años. Talla 146 cm. Implantación baja del cabello, cuello ancho y corto, <i>Pterygium colli</i> , tórax en escudo, mamilas muy separadas, <i>cubitus valgus</i> ligero, problemas intestinales durante la infancia. Problemas visuales. No recibió GH por retraso en el diagnóstico, tratada con estrógenos y progestágenos.
10	45,X/46,XX 99,2%/0,8%	Edad 10 años. Talla baja, implantación baja del cabello, tórax en escudo, mamilas muy separadas, paladar ojival, epicanto, <i>Pterygium colli</i> , <i>cubitus valgus</i> , uñas hipoplásicas, acortamiento del cuarto metacarpiano. No presenta cardiopatía ni alteraciones renales. Tratada con GH.

Continúa ...



Paciente	Cariotipo	Rasgos Fenotípicos
17	<b>45,X/46,XX</b> 99%/1%	Edad 5,3 años. Talla 104,1 cm. Coartación aorta. Tratada con GH. Se desconoce otros datos.
2	<b>45,X/46,XX</b> 98,7%/1,3%	Edad 15 años. Talla 142 cm. Cuello ancho y corto, <i>Pterygium colli</i> , tórax en coraza, mamilas muy separadas, riñón en herradura. Problemas visuales.
15	<b>45,X/46,XX</b> 65%/35%	Edad 15,9 años. Talla 150,3 cm. Tórax ligeramente excavado, <i>nevus</i> y vello corporal ligeramente aumentado, útero y ovarios sin alteraciones. Menarquia espontánea a los 15 años. Tratamiento ninguno. Ausencia de rasgos Turnerianos.
20	<b>45,X/46,XX</b> 5%/95%	Edad 12 años. Talla 133 cm. Inicia espontáneamente desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Útero y ovarios sin alteraciones. Tratada con GH. Ausencia de rasgos Turnerianos.
1	<b>45,X/46,XX</b> 3,6%/96,4%	Edad 35 años. Talla 155 cm. Tórax en escudo. Desarrollo espontáneo de rasgos sexuales secundarios. Útero pequeño, ovarios en cintillas. Nunca recibió tratamiento. Ausencia de rasgos Turnerianos.
4	<b>45,X/47,XXX</b> 82,5%/17,5%	Edad 17 años. Talla 148 cm. Implantación baja del cabello, orejas rotadas, <i>Pterygium colli</i> leve, tórax en escudo, mamilas muy separadas, manos y pies pequeños, uñas hipoplásicas, desarrollo espontáneo de caracteres sexuales secundarios. Problemas visuales y escolares. Pobre adaptación. Tratada con GH.
13	<b>45,X/46,X + frag(X)</b> 99%/1%	Edad 13,6 años. Talla 133,8 cm. Implantación baja del cabello, raíz nasal ancha, orejas implantación baja, paladar ojival, pecho en coraza, amplia separación intermamilar, <i>cubitus valgus</i> , acortamiento cuarto metacarpiano, miopía. No presenta <i>Pterygium colli</i> ni afectación cardíaca. No presenta desarrollo mamario, escaso vello pubiano. Tratada GH y estrógenos. Retraso escolar, deficiencia ligera. Diagnosticada a los pocos meses de vida, fue intervenida de Tumor de Wilms, recibió quimioterapia y radioterapia. También intervenida de una otitis serosa.
27	<b>45,X/46,X + frag(X)</b> 30%/70%	Edad 7 años. Talla 104,8 cm, acromicria, paladar ojival, tórax en escudo, aumento de la distancia intermamilar, estrabismo, soplo sistólico en área aórtica valvular leve (aorta bivalva), útero infantil, no se visualizan ovarios. Tratamiento con GH. Profilaxis de endocarditis infecciosa.
16	<b>45,X/46,X, idic(Yp<sup>nf</sup>)</b> 59%/41%	Edad 17 años. Talla 150 cm, <i>Pterygium colli</i> leve, tórax en escudo, mamilas muy separadas, linfedema de manos y pies, vello intermamilar, coartación aorta yuxtaductal, útero pequeño sin evidencia de ovarios. Retraso evolución psicomotora. Tratada con GH, estrógenos y progestágenos. Desarrollo sexual femenino completo.

Continúa ...

Paciente	Cariotipo	Rasgos Fenotípicos
14	<b>45X/46,X,i(Xq)</b> 81%/19%	Edad 15,1 años. Talla 151,9 cm. Displasia de pabellones auriculares, paladar ojival, hipertrofia gingival, <i>cubitus valgus</i> y estrabismo. Útero prepúber sin visualización de gónadas. Osteoporosis. Desarrollo mamario y puberiano completo tras tratamiento con estrógenos y progestágenos. Tratamiento con GH. Diagnóstico tardío.
21	<b>45,X/46,X,del(X)(p?)</b> 25%/75%	Edad 16 años. Fenotipo Turneriano con morfología dismórfica: talla 145 cm, cuello ancho, <i>Pterygium colli</i> , tórax en escudo, mamilas separadas, <i>cubitus valgus</i> , osteoporosis, hipertrofia del clítoris, útero infantil, no se visualiza ovario izquierdo. Tratada con GH, estrógenos y progestágenos.
<b>TRIPLES MOSAICOS</b>		
23	<b>45,X/46,XX/47,XXX</b> 87%/6%/7%	Edad 10 años. Talla 134,7 cm. Paladar ojival, <i>nevus</i> , raíz nasal ancha y abertura palpebral antimongoloide, tórax ancho, útero infantil y ovarios de dimensiones reducidas. Tratada con GH. Posible válvula aorta bicúspide.
11	<b>45,X/47,XXX/47,XX,del(X)(p?)</b> 41,4%/35,5%/23,1%	Edad 10 años. Talla 114,3 cm. Paladar ojival, tórax en escudo, mamilas muy separadas, uñas hipoplásicas, riñón en herradura. No presenta cardiopatía. Útero normal, no se visualiza ovario izquierdo. Tratada con GH.
19	<b>45,X/46,XX/46,X,del(X)(p?)</b> 83,5%/0,8%/15,7%	Edad 7,9 años. Talla 111,1 cm. Orejas ligeramente rotadas, paladar ojival, tórax en escudo, separación intermamilar, <i>cubitus valgus</i> , útero infantil, no se visualizan ovarios. Ligera malrotación renal bilateral. Coxa vara izquierda. Tratada con GH.
12	<b>45,X/46,XX/46,X, idic(Xp)</b> 94,7%/0,7%/4,6%	Edad 14 años. Talla 159,9 cm. Implantación baja del cabello, orejas rotadas, cuello ancho y corto, paladar ojival, hipertelorismo, útero hipoplásico, ovario izquierdo no visualizado. No presenta alteraciones cardíacas. Tratada con GH siempre siguió una curva de crecimiento elevada. A tratamiento de estrógenos y progestágenos. Desarrollo sexual completo.
25	<b>45,X/46,XX/46,X, idic(Xq)</b> 91%/7%/2/	Edad 8 años. Talla 88,6 cm, frente amplia, epicanto, orejas de implantación baja, paladar ojival, estrabismo y tórax en escudo con separación intermamilar amplia. Útero infantil, no se visualizan ovarios. Fenilcetonuria clásica. Prolapso rectal. Tratamiento con GH y dieta para fenilcetonuria.
26	<b>45,X/46,X, idic(Xq)/ 47,X, idic(Xq), idic(Xq)</b> 29,6%/69,9%/0,5%	Edad 18,3 años. Talla 149,2 cm. Epicanto, paladar ojival, acortamiento de metacarpianos, <i>cubitus valgus</i> , extremidades cortas. Escaso desarrollo mamario y pubiano. Hipotiroidismo primario. Riñones en herradura sin repercusión clínica. Útero pequeño, no se visualiza ovario izquierdo. Megacolon. Tratamiento con GH, tiroxina, estrógenos y progestágenos.

Continúa ...



Paciente	Cariotipo	Rasgos Fenotípicos
<b>MOSAICOS MÚLTIPLES</b>		
24	<p>45,X/46,X,idic(Xq)/ 47,X,idic(Xq),del(X)(p?)/ 47,X,idic(Xq),idic(Xq) 14,4%/60,6%/1,3%/23,7%</p>	Edad 9,10 años. Talla 126,7 cm. Implantación baja del cabello, raíz nasal hundida, tórax en escudo, extremidades cortas, útero infantil, no se visualizan ovarios. Tratada con GH.
22	<p>45,X/ 46,X + frag(X)/ 46,X,del(X)(p?)/ 46,X,idic(Xq)/ 47,X,idic(Xq) + frag(X)/ 47,X,idic(Xq),del(X)(p?)/ 47,X,idic(Xq),idic(Xq)/ 47,X,idic(Xq) + r(X)/ 48,X,idic(Xq),idic(Xq),idic(Xq)  43,7%/0,8%/0,8%/50,7%/ 0,3%/1,2%/1,7%/0,5%/0,3%</p>	Edad 14 años. Talla 137 cm, displasia de pabellones auriculares, tórax ancho y ligero acortamiento de extremidades. Útero prepúber, no se visualiza ovario izquierdo. Tratamiento con GH y estrógenos conjugados. Rendimiento escolar muy bueno.
<b>NO TURNER</b>		
3	46,XX	Edad 17 años. Talla 90 cm. No es Turner. Niña acondroplásica.
6	46,XY	Edad 11 años. Niño con S. de Noonan. Talla 135 cm. Párpados caídos, orejas de implantación baja, cuello ancho y corto, miopía, dedos de las manos muy flexibles, pies valgus, dentición adulto, testículos ascendentes. Nivel de GH normal.
30	46,XX	Datos desconocidos. Talla baja.

Tabla 8. Clasificación de los cariotipos según las técnicas empleadas

Cariotipo	Citogenética	FISH
<b>No mosaicos</b>	13 (48,14%)	3 (11,1%)
45,X		
46,X,i(Xq)		
<b>Mosaicos</b>		
X/XX	4 (14,8%)	10 (37%)
X/XXX	2 (7,4%)	1 (3,7%)
X/X + frag(X)	1 (3,7%)	2 (7,4%)
X/X + frag(Y)	0	1 (3,7%)
Otros	5 (18,5%)	2 (7,4%)
<b>Triples mosaicos</b>		
X/XX/XXX	0	1 (3,7%)
Otros	2 (7,4%)	5 (18,5%)
<b>Mosaicos complejos (+ de 3)</b>	0	2 (7,4%)



Tabla 9. Comparación de la constitución cromosómica de la muestra con los seis principales estudios citogenéticos realizados.

	Autores						Presente estudio
	Palmer y Reichmann (1976)	Hall y col., (1982)	Rancke y col., (1983)	Park y col., (1983)	Held** y col., (1992)	Gotzsche y col., (1994)	
	Pacientes estudiados						
	n=110	n=127	n=150	n=116	n=85	n=179	n=27
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
<b>Cariotipo</b>							
45,X	58,2	55,0	60,0	61,2	21,2	58	11,1
<b>Mosaicismo</b>							
X/XX	8,2	13,4	14,7	11,2	12,9	7,8	37,0
X/XXX	1,8	0,8	1,3	0,9	3,5	1,7	3,7
X/X,i(Xq)	11,8	4,7	5,3	7,8	12,9	8,9	3,7
X/X +r(X)	5,5	3,9	4,7	1,7	3,5	7,3	--
X/X +mar	--	0,8	--	--	20,0	1,7	7,4
X/XY	5,4	3,1	--	2,6	5,9	2,2	3,7
<b>Mosaicos complejos</b>	--	7,1	6,0	3,4	8,2	1,7	29,6
<b>Alteraciones Estructurales</b>							
Xi(Xq)	7,3	5,5	6,0	6,0	5,9	3,9	Involucrados en diferentes mosaicos.
X,del(Xp)	0,9	0,8	1,3	2,6	2,4	0,6	
X,del(Xq)	--	1,6	--	1,7	2,4	0,6	
<b>Otros</b>	0,9	3,3	0,7	0,9	1,2	5	3,7

n = número de sujetos que componen la muestra

\*\* único trabajo en donde se estudia el mosaicismo cromosómico en más de un tejido.

**Tabla 10. Constitución cromosómica de la muestra estudiada comparada con el estudio molecular realizado por Connor y Loughlin (1991)**

Connor y Loughlin (1991)		Presente estudio	
	%		%
<b>Cariotipos más frecuentes</b>			
45,X	50	45,X	11
i(Xq)*	17	i(Xq)**	18,5
45,X/46,XX	15	45,X/46,XX	37
ring o frag (X)*	7	frag(X)*	7,4
45,X/46,XY	4	45,X/46,XY	3,7
Otros	7	Otros	22,4

\* (mosaicos y no mosaicos)

\*\* (isocromosomas con uno o dos centrómeros, mosaicos y no mosaicos)

Del conjunto global de 30 pacientes estudiados mediante FISH, tres no presentaron ST: una de ellas (*paciente 3*) presentaba talla baja debido a acondroplasia. Este síndrome posee una etiología autosómica dominante (McKusick, 1993) por lo que su cariotipo fue 46,XX (ver Tabla 6). Uno era un varón con síndrome de Noonan (*paciente 6*). Este síndrome puede aparecer tanto en mujeres como en hombres y, aunque poseen un fenotipo muy semejante al ST, no es el resultado de una alteración cromosómica; su etiología no está clara, pero se cree que su modo de herencia es autosómica dominante (Bergsma, 1979; McKusick, 1993). La tercera paciente a la que hacemos mención, fue remitida a nuestro laboratorio por presentar talla baja, desconociéndose otras alteraciones fenotípicas (*paciente 30*) y tampoco presentó ST; de un total de 525 metafases estudiadas por FISH, el cariotipo resultante fue 46,XX. El estudio con bandeado cromosómico tampoco mostró ninguna alteración cromosómica. Estos tres pacientes fueron excluidos del estudio por no presentar ST.

De las 27 pacientes con ST estudiadas, trece habían sido diagnosticadas previamente como Turner no mosaico (doce eran 45,X y una 46,X iXq), el grupo restante de pacientes comprendía mosaicos de dos y tres líneas celulares de diferente naturaleza (Tabla 6). En ninguna de las pacientes se había encontrado restos del cromosoma Y.

En la Tabla 6 se puede observar que tras la aplicación de la técnica de FISH, de las 27 pacientes Turner estudiadas, 17 mostraron diferencias con respecto a su cariotipo inicial. A continuación, agrupamos los resultados según la técnica empleada y las diferencias obtenidas.



## 4.1. RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE FISH

### 4.1.1. ESTUDIO GENERAL DE TODOS LOS CASOS

#### *Estudio de pacientes no mosaico*

Inicialmente el porcentaje de mujeres Turner no mosaico era del 48% (ver Tabla 8), mediante FISH este porcentaje quedó reducido a un 11%; sólo en tres *pacientes* (9, 18 y 28) no fue posible detectar una segunda línea celular. Según las Tablas de Hook (1977) el mosaicismo excluido ha sido, en las tres pacientes, de hasta 2% con un margen de confianza del 0,99 (ver Tabla de mosaicismo en el Anexo)

El incremento del número de pacientes con mosaicismo fue debido principalmente a la aparición de la línea celular 46,XX (Tablas 6 y 8). De las trece pacientes diagnosticadas inicialmente no mosaico, siete presentaron la línea celular 46,XX (*pacientes* 2, 5, 7, 8, 10, 17 y 29), una presentó una segunda línea celular conteniendo un fragmento derivado del X en una frecuencia del 1% (*paciente* 13), mientras que en la *paciente* 25 fueron detectadas dos líneas celulares nuevas 46,XX y 46,X,idic(Xq). La *paciente* 24 diagnosticada inicialmente 46,X,i(Xq) no mosaico, mostró cuatro líneas celulares (45,X/46,X,idic(Xq)/47,X,idic(Xq),del(X)(p?)/47,X,idic(Xq),idic(Xq) de las cuales la más frecuente fue la diagnosticada por citogenética clásica, esto es, la 46,X,idic(Xq) (60,6%) (Tablas 6 y 7). En esta paciente el isocromosoma presentó doble región centromérica por lo que ha sido denominado isocromosoma dicéntrico para el brazo largo (idic(Xq).

El estudio con las sondas DYZ1 y DYZ3 no dio señal en ninguna de las pacientes indicadas anteriormente, lo que indica la ausencia del cromosoma Y. Estos datos fueron confirmados por PCR.

El estudio con la sonda XIST mostró doble señal en todas las metafases 46,XX de las *pacientes* 2, 5, 7, 8, 10, 17 y 29, confirmando el diagnóstico anterior. En la *paciente* 13 no fue posible determinar la presencia del centro de inactivación (XIC) en el fragmento cromosómico derivado del X; mientras que en las *pacientes* 24 y 25 la línea celular 46,X idic(Xq) mostró triple señal de hibridación, uno en el cromosoma X normal y dos en el cromosoma idic(Xq) correspondientes a la duplicación del XIC, localizándose entre ambas señales la doble región centromérica.

### *Verificación del cariotipo inicial*

En siete de las pacientes Turner estudiadas, la aplicación de FISH ha permitido verificar el cariotipo inicial realizado por citogenética clásica. Estas pacientes han sido las siguientes: con cariotipo 45,X/46,XX las *pacientes 1, 15 y 20*; con cariotipo 45,X/47,XXX la *paciente 4*; con cariotipo 45,X/47,XXX/47,XX,del(X)(p?) la *paciente 11*; con cariotipo 45,X/46,X,i(Xq) la *paciente 14*. En la *paciente 27*, con cariotipo 45,X/46,X +mar(?), la determinación molecular final por FISH no ha variado con respecto al inicial, pero se ha podido definir la naturaleza de dicho fragmento cromosómico mediante la aplicación de las sondas DXZ1 y XIST. La utilización de las sondas DYZ1 y DYZ3 dio resultado negativo. Este dato fue confirmado por PCR.

### *Formación de mosaicos complejos*

La aplicación de la técnica de FISH permitió detectar nuevas líneas celulares en cinco pacientes diagnosticadas previamente como mosaicos (*pacientes 12, 19, 22, 23 y 26*) originándose mosaicos complejos de tres o más líneas celulares (nueve líneas en el caso 22). En tres de estos mosaicos están implicados cromosomas dicéntricos (*pacientes 12, 22 y 26*) aparte de la *paciente 24* comentada anteriormente (ver Tablas 6, 7 y Fotos de 14-19). En una de las pacientes (la *paciente 12*), el cromosoma dicéntrico estaba constituido por dos copias del brazo corto separadas por material proveniente de la región proximal del brazo largo por lo que se ha denominado pseudoisocromosoma dicéntrico para el brazo corto. En las dos restantes (*pacientes 22 y 26*), en el mosaicismo están implicados isocromosomas para el brazo largo, con dos centrómeros muy próximos entre sí.

El estudio mediante la hibridación conjunta con las sondas DXZ1 y XIST (ver Foto 16 y 19), mostró la naturaleza dicéntrica y la duplicidad de la región Xq13 en los cromosomas derivados del X de las *pacientes 12, 22 y 26*. En la *paciente 12* las dos copias del XIC se sitúan entre los dos centrómeros. Además, uno de los centrómeros está comprimido y el otro no, lo que indica la actividad de uno y la no funcionalidad del otro respectivamente.

En las *pacientes 22 y 26* se repite el patrón ya señalado para las pacientes con cromosomas idic(Xq) (*pacientes 24 y 25*): dos copias del brazo largo, dos centrómeros muy próximos entre sí y dos copias del XIC, uno en cada brazo. En las *pacientes 22 y 26* aparecieron otras líneas celulares, pero en menor proporción, por lo que no fueron tenidas en cuenta.

En las *pacientes 19 y 23*, la línea nueva detectada mediante FISH fue la 46,XX en porcentajes del 0,8% y 6% respectivamente, dando origen a mosaicos de tres líneas



celulares. La existencia de esta línea tiene implicación en la posible explicación del origen del mosaico. En la *paciente 19* la hibridación con las sondas XIST y DXZ4 mostró que la delección afectaba al brazo corto del cromosoma X, no al largo, por lo que ha variado ligeramente con relación al diagnóstico inicial.

La ausencia del cromosoma Y, o restos del mismo, en estas cinco pacientes fue demostrado mediante la hibridación con las sondas DYZ1 y DYZ3.

### ***Observación de reestructuraciones a nivel centromérico***

Del conjunto global de pacientes Turner, siete pacientes presentaron isocromosomas del X, con uno o dos centrómeros. La *paciente 12* mostró un pseudoisocromosoma X dicéntrico para el brazo corto (idic(Xp) además de las líneas celulares 45,X y 46,XX (Fotos 14-16). Este pseudoisocromosoma idic(Xp) había pasado desapercibido mediante las técnica de bandas G, habiendo sido definido como un segundo cromosoma X normal. La *paciente 14* mostró un isocromosoma monocéntrico para el brazo largo i(Xq) que ya había sido definido como tal mediante bandas G; en esta paciente no se encontraron nuevas líneas celulares. La *paciente 16* presentó un pequeño cromosoma con doble región centromérica que fue definido mediante FISH como un cromosoma Y dicéntrico no fluorescente, con dos brazos cortos idic(Yp<sup>nf</sup>); mediante bandas G este fragmento había sido definido como un cromosoma X con delección en Xq12. Las otras cuatro pacientes restantes (*pacientes 22, 24, 25 y 26*) presentan involucrados en sus líneas celulares isocromosomas X dicéntricos para el brazo largo (idic(Xq)) formando mosaicos complejos de hasta nueve líneas celulares en algún caso (Tablas 6, 7 y Fotos 17 y 18).

### ***Identificación de pequeños fragmentos de origen desconocido***

Tres fueron las pacientes que mostraron en sus líneas celulares pequeños fragmentos cromosómicos. La naturaleza de dichos fragmentos fue definida por FISH y PCR. En dos pacientes (*pacientes 13 y 27*) el fragmento derivaba de un cromosoma X, mientras que en la tercera (*paciente 16*) el fragmento provenía del cromosoma Y. Esta paciente había sido diagnosticada como mosaico 45,X/46,X,del(X)(q12) (Tablas 6 y 7). Mediante FISH se redefinió el fragmento del(X)(q12) como un cromosoma Y con dos centrómeros, dos copias del brazo corto y ausencia del brazo largo (idicYp). La utilización de la sonda DYZ3 demostró la naturaleza dicéntrica del fragmento.

La utilización de la sonda XIST, demostró su existencia en el fragmento cromosómico en una de las pacientes, (*paciente 27*), por el contrario, ni en la *paciente 13* ni en la *16* fue demostrado su existencia. En la primera, debido a la baja frecuencia del fragmento (1%), y en la *paciente 16*, debido a su origen (derivado del cromosoma Y).

#### 4.1.2. ESTUDIO DE MUJERES CONTROL MEDIANTE LA SONDA D1Z5

Para descartar la presencia de alteraciones numéricas o estructurales debidas al procedimiento, se empleó la sonda  $\alpha$ -satélite **D1Z5** que hibrida específicamente con las secuencias altamente repetitivas localizadas en el centrómero del cromosoma 1. Ello se llevó a cabo en cultivos de tres y cuatro días de mujeres control 46,XX y se repitió en la *paciente 22* por presentar un mosaico complejo de nueve líneas celulares.

**Tabla 11: Estudio metafásico en individuos control y en la paciente 22 mediante la sonda D1Z5**

Cultivos	Sujetos	Nº Metafases	Dicéntricos*	Fragmentos*	Anillos*	Trisomías*
72 horas	mujeres	113	0	0	0	0
	paciente 22	122	0	0	0	0
96 horas	mujeres	254	0	0	0	0
	paciente 22	279	0	0	0	0

\*Todas las alteraciones se refieren al cromosoma 1

#### 4.2. RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE PCR

El estudio molecular mediante PCR con los cebadores Y1, Y2 ha confirmado la existencia de material procedente del centrómero del cromosoma Y en la *paciente 16*. La señal específica de la región centromérica del cromosoma Y (170 pb) fue detectado sólo en varones control y en la *paciente 16*, pero no en el resto de las pacientes (Foto 20). El estudio molecular mediante PCR con los cebadores XES7, XES2 ha confirmado la existencia del gen SRY en esta paciente. El fragmento originado de 609 pb fue idéntico al obtenido en varones control y no apareció en el resto de las pacientes (Foto 20).



## **DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

Las alteraciones fenotípicas asociadas al ST (talla baja, disgenesia gonadal, *Pterygium colli* y *cubitus valgus*) son muy similares independientemente de si existe o no mosaicismo. Sin embargo, más del 99% de las concepciones humanas 45,X dan lugar a un aborto natural en los primeros estadios del desarrollo embrionario (de la Chapele, 1983; Hook y Warburton, 1983; Robinson, 1990; Thaddeus y Ferguson y Golden, 1992). Por el contrario, el número de pérdidas embrionarias es reducido si existe mosaicismo (Hook y Warburton, 1983; Hassold, Benham y Leppert, 1988). Apoyándose en estos hechos, Hook y Warburton (1983) especularon que los fetos 45,X que sobreviven son realmente mosaicos crípticos, siendo necesaria para la supervivencia intrauterina una doble dosis de algún(os) *locus* o *loci* del cromosoma X en determinados órgano(os) o tejidos, bien embrionales o extraembrionales (Kalousek y col., 1987; Robinson y col., 1995).

Basándonos en la hipótesis de Hook y Warburton, estudiamos la existencia de mosaicismo oculto en sangre periférica mediante la aplicación de las técnicas de FISH y PCR en una población previamente definida como Turner.

Estas técnicas permitieron reevaluar 27 pacientes con ST, encontrando diferencias entre los diagnósticos iniciales realizados por citogenética clásica (bandas G fundamentalmente) y los resultados moleculares finales, tras la aplicación de sondas y cebadores específicos para los centrómeros de los cromosomas X e Y.

### 5.1. SOBRE LOS CASOS NO MOSAICO

Inicialmente, las pacientes definidas como Turner no mosaico eran 13, lo que corresponde a un 48% de la muestra. Como se puede observar, este porcentaje es similar al obtenido por los principales estudios citogenéticos realizados entre 1976 y 1994 (Tabla 9). Al analizar los resultados obtenidos mediante FISH, este porcentaje quedó reducido a un 11% (Tabla 6); sólo en tres pacientes (9, 18 y 28) no fue posible detectar una segunda línea celular (Foto 1). Podríamos pensar que en estos casos el análisis de un mayor número de metafases nos permitiría detectar una segunda línea celular. Así, según la Tabla de exclusión de mosaicismo de Hook (1977) (ver Anexo), y en base al número de metafases analizadas, se ha podido excluir en sangre hasta un 2% de mosaicismo, con un grado de confianza del 0,99. Los datos obtenidos mediante FISH se asemejan a los especificados por el grupo de Held y colaboradores (1992). Teniendo en cuenta que estos autores han



realizado un estudio de mosaicismo oculto en dos tejidos: sangre periférica y fibroblastos, nuestros datos reflejan que un estudio exhaustivo, a ser posible combinando técnicas citogenéticas y moleculares y en más de un tejido, el cariotipo 45,X tendería a disminuir, sino a desaparecer. Esto es, todas las mujeres Turner son realmente mosaicos en algún tejido u órgano, y por lo tanto son el resultado de un error mitótico y no meiótico.

Held y col. (1992) en su estudio de mosaicismo oculto encontraron que la segunda línea celular más frecuente estaba constituida por pequeños fragmentos que tendían a perderse en sucesivas divisiones. Nuestros datos reflejan un incremento de mosaicismo debido, principalmente, a la aparición de la línea celular 46,XX (Tablas 6 y 8) lo que indica el origen mitótico y no meiótico del síndrome, apoyando la hipótesis propuesta por Hook y Warburton (1983). En este grupo de pacientes el porcentaje de la segunda línea celular osciló entre el 0,2-1 % (Tabla 6). La detección de un mosaicismo tan bajo mediante las técnicas de citogenética clásica implica un trabajo muy laborioso, lo que explica la dificultad de definir correctamente un cariotipo de estas características. Los datos obtenidos señalan que el empleo de sondas específicas mediante FISH facilita substancialmente este trabajo y permite un diagnóstico más acertado.

El origen de la aneuploidía 45,X puede ser tanto meiótica (precigótica) como mitótica (postcigótica), por no disyunción o por pérdida anafásica del segundo cromosoma sexual. La aparición de la línea 46,XX en las pacientes inicialmente diagnosticadas como 45,X no mosaicos, implica que el error cromosómico ha tenido lugar durante las primeras divisiones cigóticas. Estos datos corroboran las hipótesis actuales de un origen mitótico del síndrome y apoyan también la necesidad, en un momento determinado, de la existencia de una segunda línea celular en algún tejido embrionario o extraembrionario, para el desarrollo del embrión.

Actualmente se sabe que ambos cromosomas X permanecen activos al menos durante las primeras divisiones del cigoto y que posteriormente, uno de los dos cromosomas X se inactiva (Monk y Harper, 1979; Tan, Williams y Tan, 1993; Migeon, 1994). Pero la inactivación no tiene lugar como un todo en el cromosoma X; existen genes que "escapan" a la inactivación. Estos genes incluyen no sólo la región pseudoautosómica próxima a la región telomérica del brazo corto, sino también algunos de la región proximal del brazo corto y la región proximal del brazo largo del mismo cromosoma (ver Ilustr. 6) (Brown y Willard, 1990; Davies, 1991; Disteche, 1995).



**Foto 1:** Hibridación de la sonda DXZ1 mediante FISH que indica la presencia de un sólo cromosoma X.



En base a los conocimientos actuales, el alto porcentaje de pérdidas fetales y embrionarias 45,X podría ser debido a la necesidad de los dos cromosomas X en los primeros estadios del desarrollo, más concretamente, en el período en el cual los dos cromosomas están activos. De aquí podría deducirse que las mujeres 45,X que sobreviven son realmente mosaicos crípticos. Robinson y col., (1995) apoyan la hipótesis de la supervivencia de los fetos 45,X sólo cuando esta línea aparece relativamente tarde en el desarrollo. Por otro lado, las alteraciones fenotípicas que se observan en el ST podrían ser el resultado de la ausencia de los genes que "escapan" a la inactivación del cromosoma X, o bien que, por algún motivo, han dejado de ser activos (no se expresan) (Therman y Susman, 1990).

Teniendo en cuenta que la detección de mosaicismo se ve influenciada fundamentalmente por tres factores: el *número de tejidos* analizados, el *número de células* estudiadas y la *sensibilidad de las técnicas* empleadas, y que la ausencia de mosaicismo en sangre no implica ausencia de mosaicismo en otros tejidos (gónadas, cerebro, etc), los tres casos en los cuales no se pudo detectar una segunda línea celular, no contradicen la hipótesis de la necesidad de mosaicismo para la supervivencia de las mujeres Turner 45,X (Held y col., 1991; 1992; Kocova y col., 1994). Siguiendo la hipótesis de Hook y Warburton (1983) y Kalousek y col., (1987; 1989; 1994) es necesario, para la supervivencia intrauterina, una doble dosis de algún(os) *locus* o *loci* del cromosoma X en determinados órgano(s) o tejidos, bien embrionales o extraembrionales. Nuestro estudio se ha realizado en un único tejido (sangre); para poder excluir la presencia de un segundo cromosoma sexual en estas tres pacientes (9, 18 y 28), sería necesario el estudio de un segundo o tercer tejido. Aun así, el mosaicismo no quedaría totalmente excluido ya que el segundo cromosoma sexual podría haberse localizado en tejidos extraembrionales (Kalousek y Dill, 1983; Kalousek, 1993;1994a,b; Kalousek u Barretti, 1994; Simoni y Sirchia, 1994).

Existen otras justificaciones para estos tres casos con monosomía para el cromosoma X: una sería la argumentada por Held y col., (1992) según los cuales es posible la selección en contra de la línea celular con un fragmento cromosómico, durante un estadio temprano del desarrollo, debido a su inestabilidad. Otra es la de Hook (1985a) y Catalán y col., (1995) según los cuales existe un claro incremento de las células 45,X en sangre periférica con la edad y que es mayor en mujeres que en hombres. Así la edad cronológica de las mujeres está claramente relacionada con un incremento de las células 45,X y de la formación de micronúcleos en sangre periférica. Este proceso de pérdida del cromosoma X ha sido atribuido a una separación centromérica prematura y a otros tipos de disfunciones centroméricas en el cromosoma X de replicación tardía (Fitzgerald, 1975; Fitzgerald y McEwan, 1977; Abruzzo y col., 1983).

Ello explicaría el alto porcentaje de la línea 45,X y la dificultad para localizar una segunda línea celular, bien porque ha sido eliminada por su inestabilidad, o bien porque se halla en una proporción muy baja. Una tercera explicación la aporta Thaddeus, Ferguson y Golden (1992) según los cuales todas las pacientes 45,X que sobreviven presentaron mosaicismos durante la embriogénesis, con alteraciones estructurales del cromosoma X o del Y, pero estas líneas celulares desaparecieron en períodos anteriores al nacimiento. Así, la presencia de mosaicismos permite la supervivencia del feto, pero éste mostrará una severidad fenotípica que estará en relación con la cantidad de material cromosómico presente durante el período de la embriogénesis, y directamente relacionada con el período en el cual se perdió este material. Thaddeus relaciona el fenotipo de las pacientes con ST con las líneas celulares presentes durante la embriogénesis y no con el cariotipo actual.

Las tres pacientes 45,X no mosaico (*pacientes 9, 18 y 28*) presentan un fenotipo Turner completo y en todas ellas las alteraciones son severas, aunque su fenotipo no se diferencia del de otras pacientes estudiadas con mosaicismos cromosómicos (Tabla 7). En el grupo de las 27 pacientes estudiadas, la talla baja es una característica constante; el resto de los rasgos parecen distribuirse de una manera arbitraria, con excepción de la deficiencia mental (Tabla 7).

Las *pacientes 18 y 28* presentan un fenotipo Turner característico; sin embargo, *la paciente 9* presenta un desarrollo normal de útero, por lo que podríamos presuponer mosaicismos a este nivel (existencia de la línea 46,XX), que ha inducido este desarrollo normal. Como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de mosaicismos a nivel sanguíneo no excluye la presencia de mosaicismos en otros órganos o tejidos (Kocova y col., 1994; Robinson y col., 1995; Novak y col., 1995). En este caso es posible que durante el desarrollo embrionario las células 46,XX diesen lugar al útero, por lo que no se vería afectado. Esta hipótesis podría generalizarse al resto de las pacientes con ST; así, aunque varía de unas mujeres a otras, los síntomas debidos a deleciones del Xp y Xq, son tremendamente similares entre sí (Therman y Susman, 1990). Y aunque en general, las mujeres con mosaicismos cromosómicos parecen estar menos afectadas fenotípicamente, existen excepciones que no se explican sino es por un mosaicismos oculto en diferentes órganos o tejidos (Apostolopoulos y col., 1994; Robinson y col., 1995). En general, la severidad fenotípica parece depender del porcentaje y de la distribución de las líneas celulares en los diferentes tejidos (Partsch y col., 1994; Robinson y col., 1995).

De todas las pacientes Turner, las que presentan un mayor riesgo de gonadoblastoma son aquellas en las que se ha demostrado la existencia de restos del cromosoma Y (más específicamente la región centromérica) (Page y col., 1987; Page, 1988; Petrovic y col., 1992; Page, 1994) pero también las pacientes 45,X no mosaico son pacientes con un alto riesgo de desarrollo del cáncer, (cuando el cromosoma X presente



ha sido heredado de la madre) pues se desconoce qué cromosoma sexual han heredado del padre, y por tanto, existe un 50% de probabilidad de haber heredado un Y. Aunque mediante PCR hemos demostrado que no existen restos del cromosoma Y en estas tres pacientes hasta mosaicismos del 0,01%, existen estudios que demuestran la existencia de mosaicismo en gónadas pero no en sangre (Bisat y col., 1993; Kocova y col., 1994), por lo que en este grupo de pacientes estaría indicado que se sometieran a revisiones médicas periódicas para detectar precozmente el desarrollo de gonadoblastoma.

En el caso de que el cromosoma X presente sea de origen paterno, el riesgo de desarrollo de gonadoblastoma, es el mismo que el que presenta una mujer 46,XX, pues han heredado el cromosoma X del padre, y de existir mosaicismo en gónadas, siempre implicaría restos del cromosoma X y no del Y.

Hasta el momento sólo se han descrito seis casos de tumor gonadal en mujeres 45,X no mosaico. En cinco de ellos sólo fueron realizados análisis citogenéticos por lo que se puede dudar de la inexistencia de mosaicismo para el cromosoma Y, pero en el caso descrito por Pierga y col., (1994) se realizó un exhaustivo estudio citogenético y molecular tanto en sangre como en células tumorales. Estos datos apoyan la necesidad de revisiones periódicas en los casos de mujeres 45,X.

## 5.2. SOBRE LOS CASOS MOSAICO

En cuanto a las pacientes con mosaicismo, las diferentes líneas celulares que pueden aparecer en un mismo individuo pueden originarse por diferentes mecanismos cromosómicos como son la no disyunción, pérdida anafásica, deleciones, reestructuraciones complejas, etc. El origen de estas líneas celulares es siempre mitótico (postcigótico), pero la célula inicial puede, o no, presentar un cromosoma X con una alteración cromosómica. A continuación detallaremos cada uno de los casos encontrados en nuestro trabajo intentando dar una explicación a su origen, al mismo tiempo que se relacionará los genotipos con los fenotipos correspondientes.

**45,X/46,XX:** Según los seis principales estudios citogenéticos sobre el ST realizados entre 1976 y 1994 (Tablas 9 y 10) esta constitución cromosómica se presenta en la población Turner en una proporción entre el 8,2% y 15%; en nuestra muestra representa el 37%. El alto porcentaje de este mosaico se ve incrementado en nuestro estudio, con respecto a los estudios mencionados, debido al alto número de casos inicialmente diagnosticados como 45,X y que han pasado a ser definidos como 45,X/46,XX tras el estudio por FISH. Como hemos mencionado anteriormente, el aumento de casos con mosaicismo respecto al estudio inicial realizado por técnicas de citogenética clásica (bandas G fundamentalmente) se debe principalmente a la aparición de la línea 46,XX.

La existencia de la línea 46,XX indica que este mosaico se ha formado por pérdida anafásica de uno de los cromosomas X durante alguna(s) de las divisiones mitóticas en los primeros estadios del desarrollo embrionario. La célula originaria, el cigoto, es, por tanto, 46,XX; las pacientes han heredado un cromosoma X de cada uno de sus progenitores (Ilustr. 11). La presencia de restos del cromosoma Y es, en este grupo, mínima, pues sólo sería posible si existiese una quimera o un fragmento del cromosoma Y translocado. Sólo en uno o dos de los cientos de casos con ST descritos en la literatura existen claras evidencias de la existencia de mosaicismo para el cromosoma Y en ausencia del centrómero de dicho cromosoma (Held, 1993; Page, 1994).

Todas nuestras pacientes 45,X/46,XX han sido estudiadas por PCR para el centrómero del cromosoma Y y el gen SRY mediante los cebadores Y1, Y2 y XES7, XES2 respectivamente, y ninguna de estas pacientes ha dado positivo por dicha técnica. Por este motivo, la posibilidad de desarrollo de gonadoblastoma es la misma que en las mujeres 46,XX.

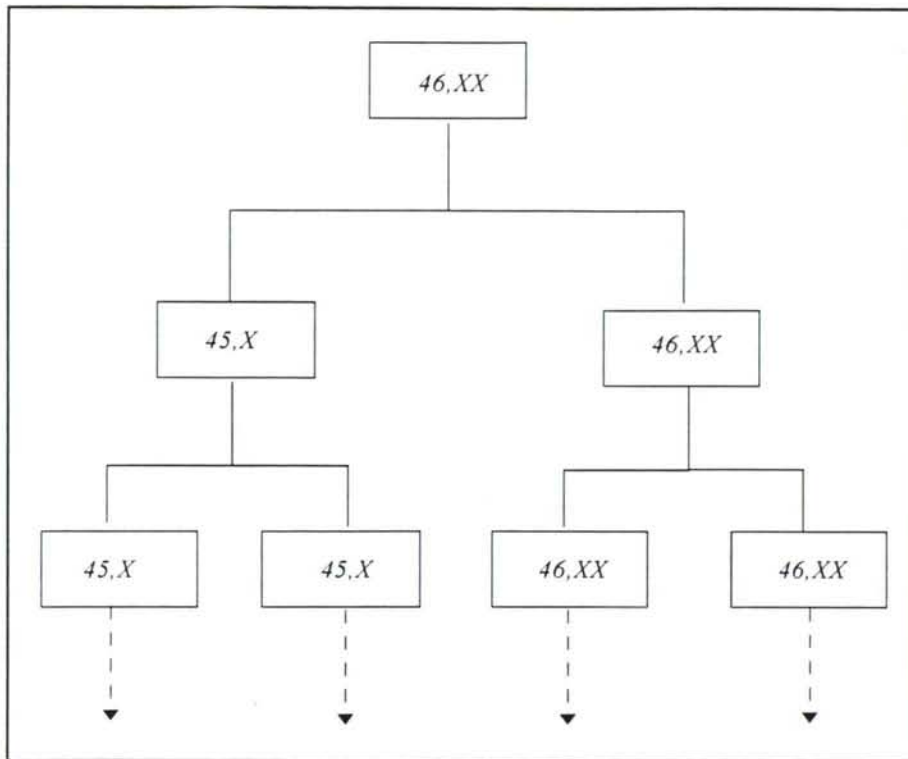
El estudio comparativo del fenotipo de estas pacientes, en relación con el porcentaje de la línea 46,XX (Tabla 7), muestra que:



a.- Existe un porcentaje mínimo de la línea 46,XX para que el fenotipo resultante no sea el del ST, o se vea atenuado. A partir de un porcentaje superior al 35% de la línea 46,XX no aparecen los rasgos característicos del ST como pecho en coraza o *Pterygium colli*, salvo talla baja, que parece ser un rasgo característico de toda la población estudiada, independientemente de su cariotipo.

b.- Las pacientes con un porcentaje bajo de la línea 46,XX presentan un fenotipo Turner acusado: tórax en coraza con mamilas muy separadas, *Pterygium colli*, *cubitus valgus*, útero prepúber con gónadas en cintillas, etc. La excepción viene dada por la *paciente 8* con un porcentaje del 0,2% de la línea 46,XX, pues no presenta fenotipo Turner, salvo talla baja. La explicación posible sería, como ya se ha indicado, una localización de la línea 46,XX en órganos vitales durante el período embrionario que la ha preservado de estos rasgos. Así la localización de la línea 46,XX en algún período embrionario clave podría dar lugar, o no, a un fenotipo Turner severo. Otra posible explicación es una selección en contra de la línea celular 46,XX a través de las sucesivas divisiones mitóticas, por motivos desconocidos hasta el momento (Robinson y col., 1995).

c.- Dependiendo de la localización de las líneas celulares 45,X y 46,XX diferentes órganos o tejidos pueden verse afectados. Así el alto porcentaje en sangre periférica de la línea 46,XX (96,4%) en la *paciente 1* no la preserva de esterilidad debida a un útero pequeño y gónadas en cintillas, aunque no presente otros rasgos característicos del ST.



**Ilustr. 11.-** Mosaicismo cromosómico de origen mitótico por pérdida anafásica del cromosoma X.

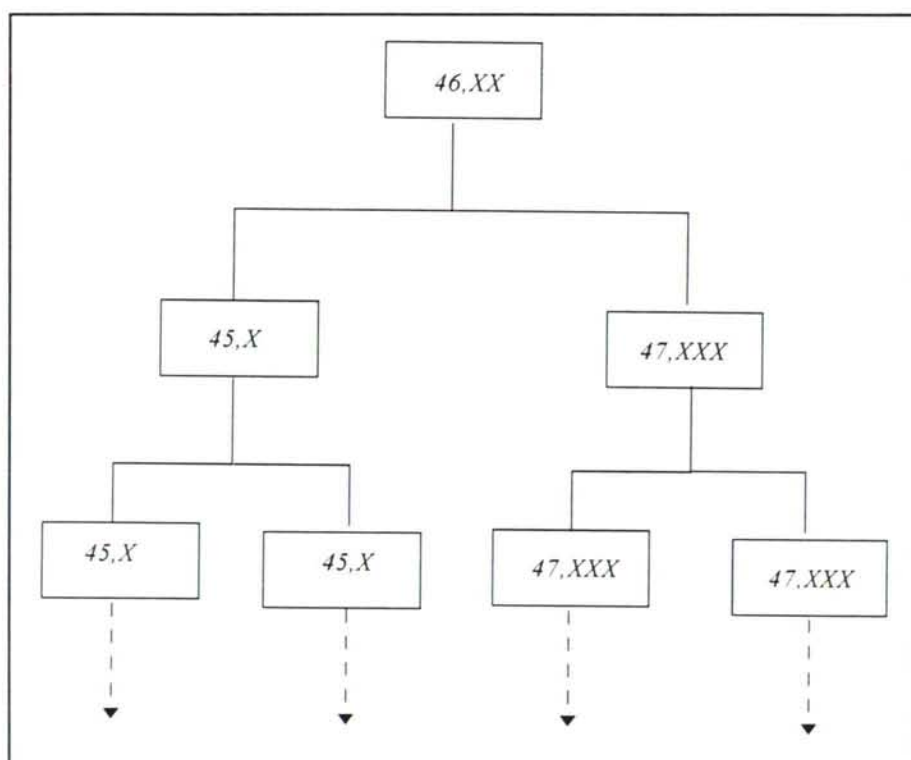
**45,X/47,XXX:** Este mosaicismo, según diferentes estudios, aparece en la población Turner con una frecuencia del 0,8-3,5% (ver Tabla 9). En nuestro trabajo el porcentaje es muy similar (3,7%). Al igual que el mosaico anterior, la célula original es la 46,XX (han heredado un cromosoma X de cada uno de sus progenitores), pero el proceso de formación de mosaicismo se diferencia del anterior en que las dos líneas celulares, con una constitución cromosómica diferente pero complementaria, se ha producido por una no disyunción cromosómica en la primera división mitótica (Ilustr. 12). Si la no disyunción hubiese tenido lugar posteriormente, debería persistir la línea 46,XX, configurándose un triple mosaico: 45,X/46,XX/47,XXX (Ilustr. 13).

Del conjunto de 27 pacientes con ST estudiadas, el único caso con mosaicismo 45,X/47,XXX ha sido la *paciente 4* (ver Tablas 6 y 7; Fotos 2 y 3), que presenta un fenotipo Turner clásico, con la salvedad de un desarrollo espontáneo de caracteres sexuales. Ello podría tener diferentes explicaciones; una de ellas podría ser que la línea 47,XXX podría haber contrarrestado, en parte, las deficiencias debidas a la línea 45,X; así el exceso de producto de los genes del cromosoma X que "escapan" a la inactivación en la línea 47,XXX, podría contrarrestar el defecto de dichos productos en la línea 45,X. Otras explicaciones posibles serían la localización de la línea 47,XXX o de la línea 46,XX en ciertos tejidos que permitan el desarrollo espontáneo de los caracteres sexuales secundarios. La presencia de la línea celular 46,XX implicaría una no disyunción en



divisiones mitóticas posteriores, permaneciendo la línea 46,XX en algunos de sus tejidos. Esta hipótesis es difícil de demostrar, pues se requeriría un estudio de más tejidos que nos permitiesen detectar la tercera línea celular, es decir la línea 46,XX, ya que en sangre no aparece.

La presencia de tres cromosomas X generalmente no da lugar a unos síntomas determinados, aunque suele estar asociado con un conjunto de pequeñas anomalías que pueden aparecer también en recién nacidos normales. Se han descrito retrasos en la pubertad, menopausias precoces, alteraciones en la menstruación (Hecht y Hecht, 1987; Bergsma, 1979; Jones, 1990); pero nada parece ser constante. Se trata de mujeres generalmente fértiles.

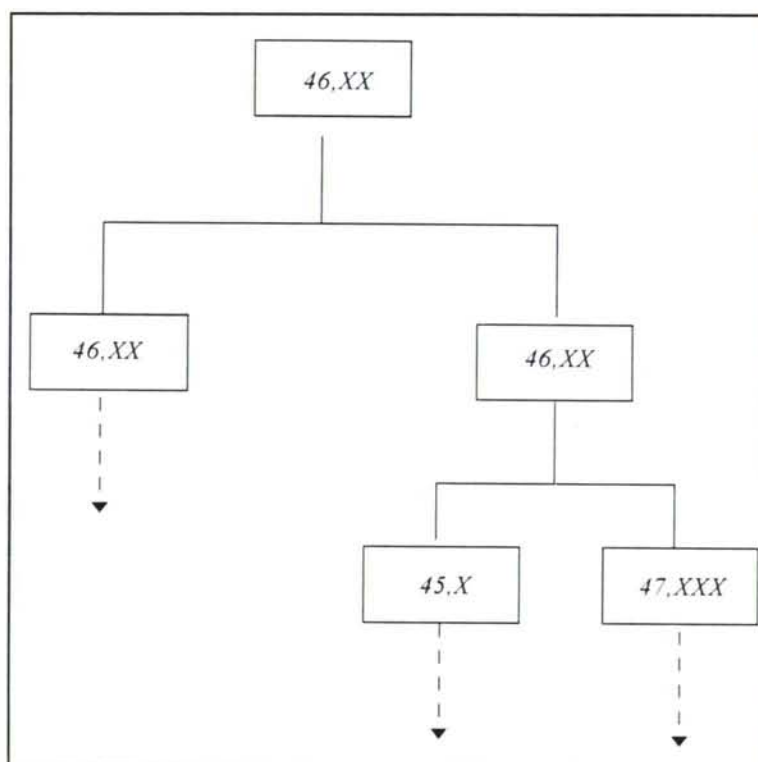


**Ilustr. 12.-** Mosaicismo por no disyunción cromosómica en la primera división mitótica.

En las células con más de dos cromosomas X, la inactivación ocurre en todos los cromosomas X excepto en uno. Las alteraciones que presentan estas pacientes con más de dos cromosomas X suelen ser más graves cuanto más cromosomas X presentan. Esto puede ser debido al exceso de producto de aquellos genes del cromosoma X que "escapan" a la inactivación, o bien debido al resultado del período crítico en las primeras divisiones en las que todos los cromosomas X están activos. Pero debido a la escasa repercusión fenotípica del cariotipo 47,XXX se podría pensar que es más probable la primera hipótesis, es decir, el resultado de un exceso de producto de los genes que "escapan" a la

inactivación. Si ello es cierto para la trisomía del cromosoma X, cabría esperar el mismo razonamiento para las mujeres con ST.

En la *paciente 4* el porcentaje de la línea 47,XXX es del 17,5% por lo que no parece afectar notablemente a su fenotipo, resultando las alteraciones típicas del ST. Cabría preguntarse si una paciente con un cariotipo 45,X/47,XXX con un porcentaje del 50% de cada línea, presentaría las alteraciones del ST, o si por el contrario manifestaría alteraciones fenotípicas no específicas del síndrome. Podríamos suponer que a porcentajes similares de las dos líneas, y con una distribución homogénea en todos los tejidos, no debería presentarse ninguna alteración si el fenotipo del ST fuese el resultado de una haploinsuficiencia de los genes que "escapan" a la inactivación del cromosoma X.



**Ilustr. 13.-** Mosaicismo por no disyunción cromosómica en la segunda división mitótica



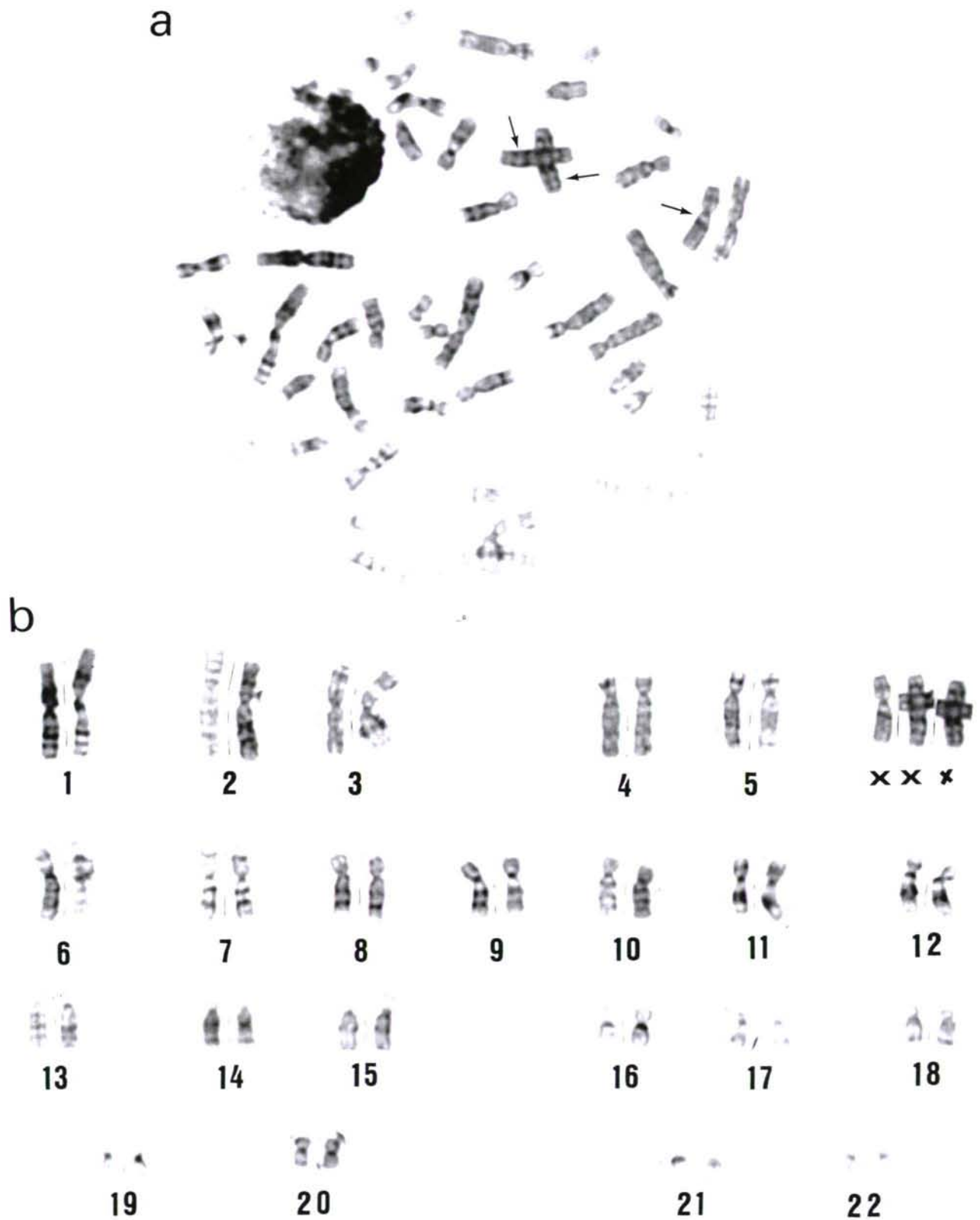
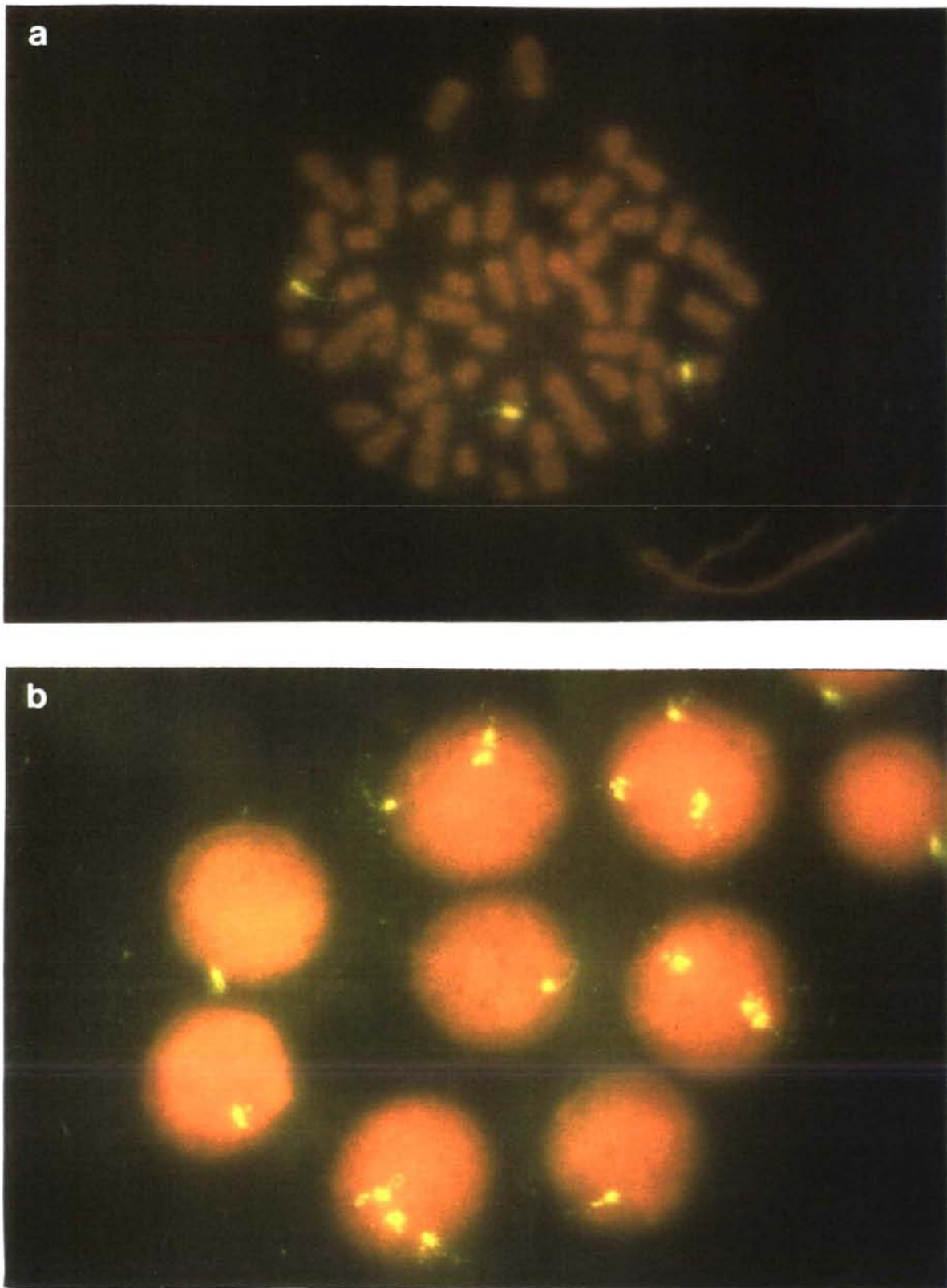


Foto 2: a) Metafase 47,XXX de la paciente 4 obtenida mediante bandas G.  
b) Cariotipo de la misma célula.



**Foto 3:** a) Hibridación con la sonda DZX1 mediante FISH que indica la presencia de tres cromosomas X en una de las metafases de la paciente 4. b) Presencia de una y tres señales en núcleos, que indican un mosaico 45,X/47,XXX en la misma paciente.



**45,X/46,X + frag(X):** La presencia de pequeños fragmentos de origen desconocido en el ST puede oscilar entre un 0,8 y un 20% según los diferentes estudios (ver Tabla 9). El grupo de investigación que ha detectado el porcentaje más alto de líneas celulares con un fragmento cromosómico ha sido el de Held y colaboradores. Ello es debido a que en su estudio de mosaicismo oculto realizado en más de un tejido (sangre y fibroblastos), han encontrado un alto porcentaje de mujeres 45,X que presentaron pequeños fragmentos que tienden a mostrar diferentes tamaños y cierta tendencia a formar anillos. Estos fragmentos, según Held y su equipo, tienden a desaparecer en sucesivas divisiones mitóticas debido a su gran inestabilidad.

En nuestro estudio la presencia de una línea celular con un fragmento cromosómico representa del orden del 11% (Tabla 9; Fotos de 4-7). No tan alta como la obtenida por el equipo de Held, pues la línea aparecida en mujeres inicialmente 45,X ha sido la 46,XX, y no tan baja como en los estudios en los que sólo se ha realizado un estudio citogenético clásico. Held y col. estudiaron la presencia de mosaicismo en dos tejidos diferentes, y según ellos, esta es la razón por la que se ve incrementada la presencia de pequeños fragmentos con respecto a los otros estudios. Posiblemente, el estudio de más de un tejido nos permitiría localizar un porcentaje más alto de pacientes con esta línea celular.

Si comparamos nuestros resultado con los obtenidos por Connor y Loughlin (1991) en su estudio molecular del mosaicismo cromosómico en el ST vemos que se asemejan (Tabla 10). Ello demuestra, una vez más, la necesidad de aplicar conjuntamente las técnicas citogenéticas y moleculares conjuntamente para un diagnóstico más preciso en los pacientes con alteraciones cromosómicas.

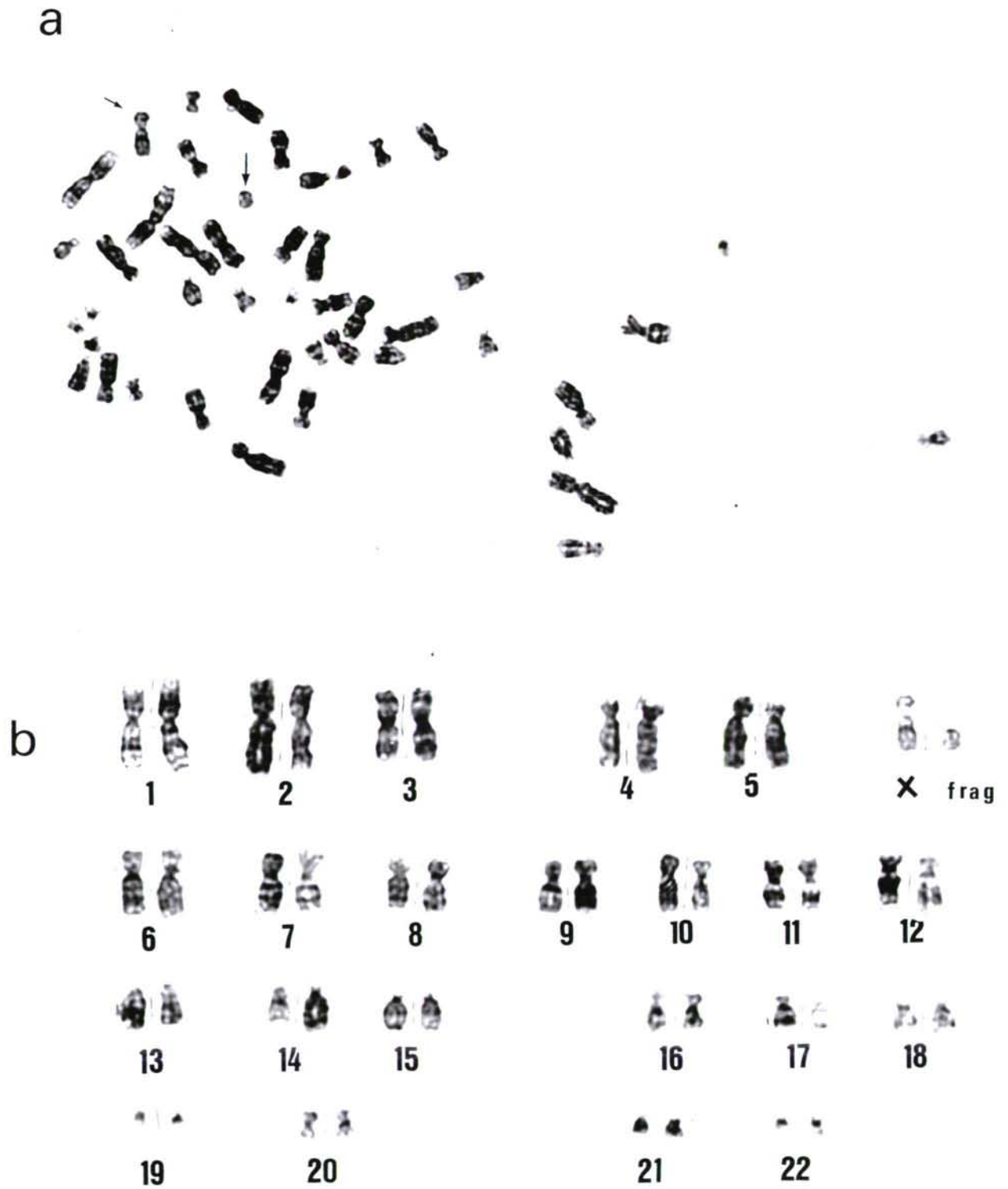
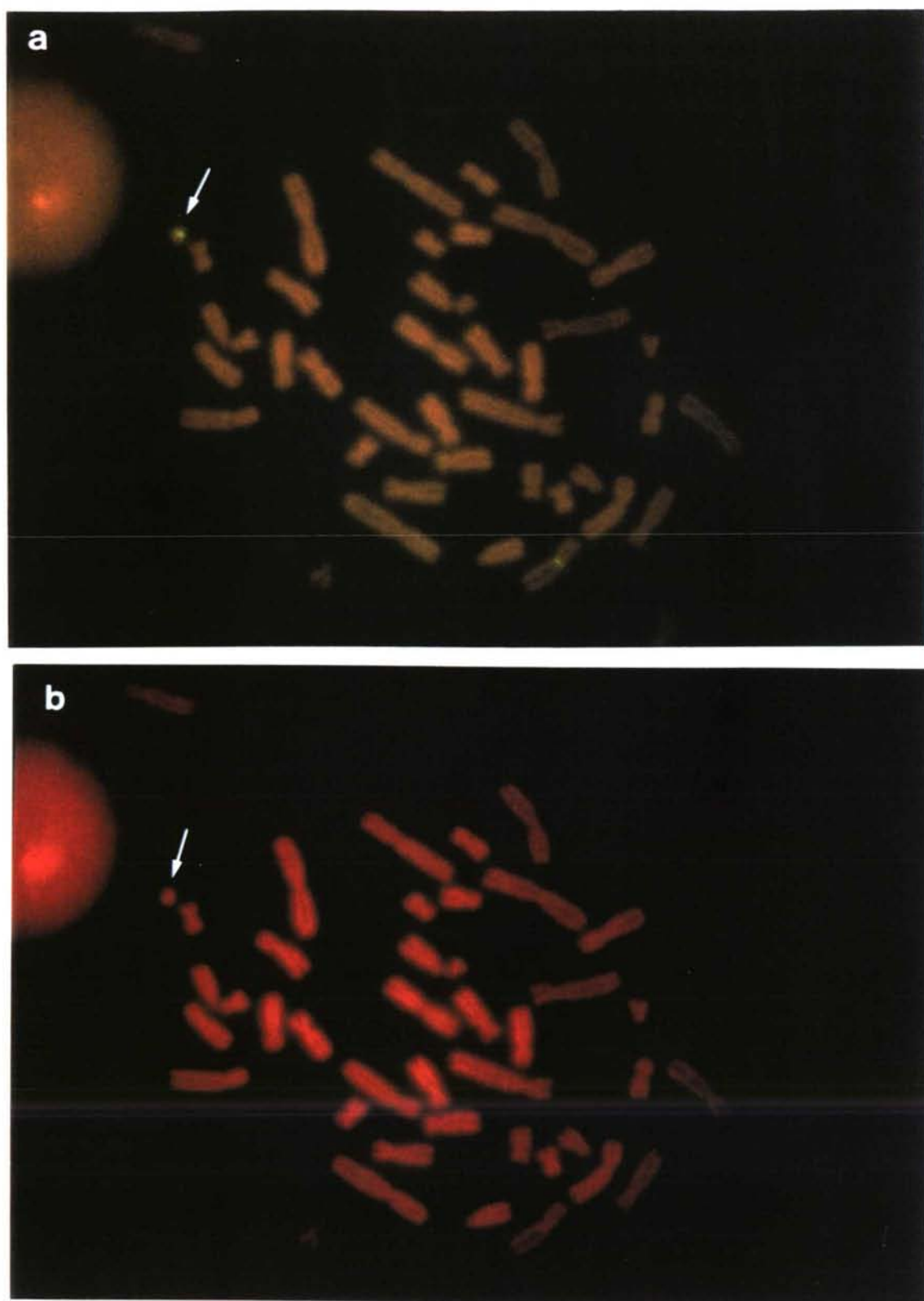
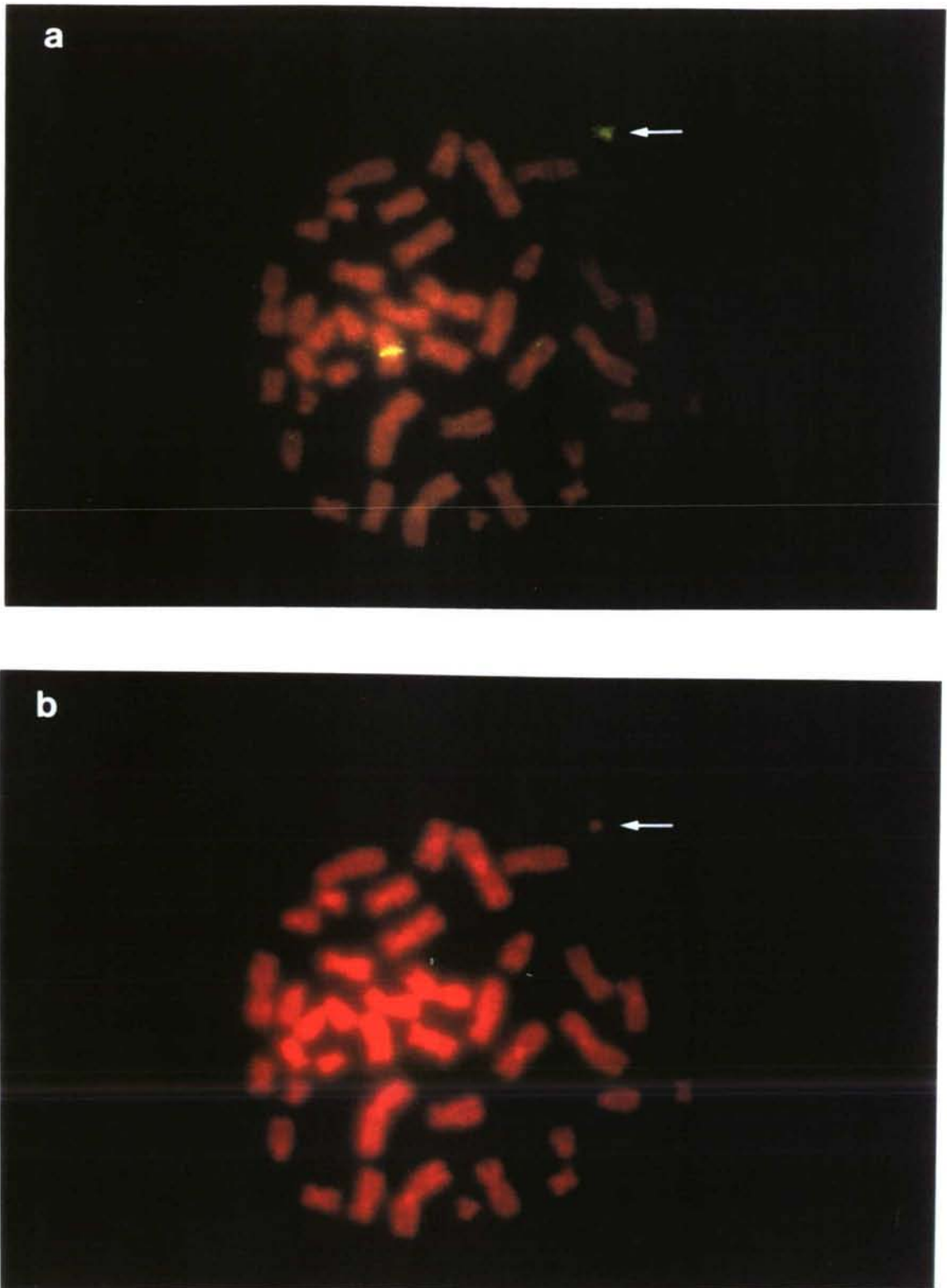


Foto 4: a) Metafase obtenida mediante bandas G que indica la presencia de un fragmento cromosómico. b) Cariotipo de la misma célula.





**Foto 5:** a) Hibridación de la sonda DZX1 mediante FISH que indica el origen del fragmento cromosómico (46,X + frag(X)). b) La misma metafase.



**Foto 6:** a) Hibridación de la sonda DZX1 mediante FISH que indica el origen del fragmento cromosómico (46.X + frag(X)). b) La misma metafase.



La ausencia de la línea 46,XX en las pacientes con un fragmento cromosómico en una de sus líneas celulares permite dos posibles explicaciones del origen de este mosaico. Una de ellas es que los cromosomas X heredados de los padres hayan sido normales (46,XX) y que, en la primera división mitótica, tras una delección, se haya originado un fragmento. Si esto ocurre, el fragmento con centrómero será el que se transmita de unas células a otras, originándose esta línea celular. El resto del cromosoma, al no poseer un centrómero se distribuirá arbitrariamente y se perderá tarde o temprano en las sucesivas divisiones mitóticas. Los fragmentos con centrómero, debido a su inestabilidad tienden también a perderse (Held y col.,1992), originándose células 45,X que incrementarán su porcentaje con respecto a la línea 46,X +frag(X). Si sucede así, el porcentaje de una línea con respecto a la otra variará con la edad, tendiendo a disminuir la línea 46,X +frag(X) y a incrementarse la línea 45,X. En algunos casos el porcentaje de la línea 46,X +frag(X), por algún motivo que desconocemos, es alto; el fragmento originado es relativamente estable. En la población estudiada, son dos las pacientes con una línea celular con un fragmento derivado del cromosoma X. La *paciente 13*, de 13,6 años, presenta esta línea celular en una frecuencia del 1% mientras que la *paciente 27* presenta la línea con un fragmento en un porcentaje del 70% y su edad es de 7 años. Sus edades no contradicen la hipótesis anterior. La tercera paciente que presenta un fragmento cromosómico es la *paciente 16* derivado del cromosoma Y.

Otra posible explicación a su origen es que el fragmento haya sido heredado, como tal, de alguno de sus progenitores, siendo la célula originaria la 46,X +frag(X) que, posteriormente, por inestabilidad, originaría la línea 45,X. Debido al alto porcentaje de la línea 46,X +frag(X) en la *paciente 27* (70%) parece más probable esta explicación en este caso, pero no así en la *paciente 13*.

Aunque la deficiencia mental no es un rasgo común en el ST, sí existen casos relacionados con pequeños fragmentos cromosómicos, o anillos, derivados del cromosoma X, que han perdido el centro de inactivación (XIC), dando lugar a dos copias activas de los genes de la región pericentromérica. Las hipótesis actuales señalan que las alteraciones dismórficas y la deficiencia mental en el ST pueden ser el resultado de un fallo en la inactivación del cromosoma X y de la disomía funcional resultante de las secuencias pericentroméricas (Kushnick y col., 1987; Grompe y col., 1992; Lindgren y col., 1992; Van Dyke y col., 1991; 1992; Dennis y col., 1993; Ishikiriyama, Iai y Tanaba, 1993; Cole y col., 1994; Collins y col., 1994; Daniel y col., 1994; Robson y col., 1994; Wolff y col., 1994; Migeon y col., 1993; 1994; 1995).

En la población estudiada, la *paciente 27* presenta una línea celular con un pequeño fragmento derivado del cromosoma X, según hemos comprobado por FISH y PCR. Aunque la frecuencia de esta línea celular es muy alta, un 70% con respecto a la línea 45,X, la paciente no muestra ni rasgos dismórficos ni deficiencia mental. La presencia del

XIC en los fragmentos cromosómicos se ha demostrado mediante la hibridación conjunta de las sondas DXZ1 y XIST (Foto 7), lo que apoya la hipótesis anterior. Por otro lado, la presencia del XIC podría dotar a estos fragmentos de cierta estabilidad.

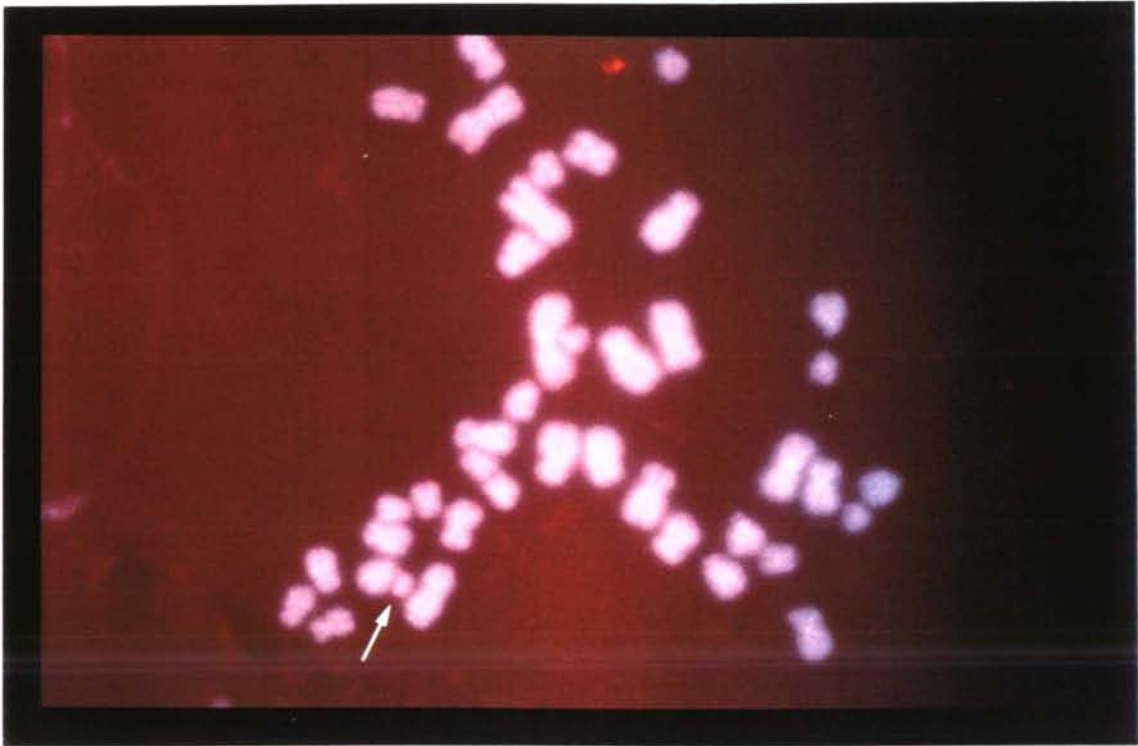
Por el contrario la *paciente 13*, con porcentaje de la línea 46,X + frag(X) del 1%, sí presenta deficiencia mental ligera, aunque las alteraciones fenotípicas son las características del síndrome que padece, agravadas por un tumor de Wilms y una otitis serosa. En esta paciente no ha sido posible demostrar mediante FISH la existencia del XIC en el fragmento cromosómico, lo que corrobora los datos obtenidos por otros autores (Kushnick y col., 1987; Grompe y col., 1992; Lindgren y col., 1992; Van Dyke y col., 1992; Dennis y col., 1993; Cole y col., 1994; Collins y col., 1994; Migeon y col., 1994; Robson y col., 1994; Wolff y col., 1994). El fenotipo de la *paciente 13* está agravado con respecto al de la *paciente 27*, aunque existe una clara diferencia en el porcentaje de la línea celular que contiene el fragmento. Podríamos concluir que la existencia del XIC en el fragmento cromosómico de la *paciente 27* la ha preservado de alteraciones fenotípicas severas como deficiencia mental y rasgos dismórficos.

**45,X/46,X,idic(Yp<sup>nf</sup>)**. La *paciente 16* había sido diagnosticada inicialmente como un mosaico 45,X/46,X del(X)(q?); tras el estudio mediante FISH y PCR, el fragmento cromosómico fue identificado como un isocromosoma Y dicéntrico para el brazo corto, no fluorescente (idic Yp<sup>nf</sup>). La utilización combinada de las sondas DYZ1 y DYZ3 mediante FISH confirmó la presencia por duplicado de la región centromérica y la inexistencia del brazo largo del mismo cromosoma. La utilización de estas sondas descartó una posible translocación. Se trata de un cromosoma Y que ha sufrido una compleja restructuración, presentando dos centrómeros, dos copias del brazo corto y la pérdida parcial del brazo largo; un derivado semejante al señalado por Rivera y col, 1993 y Macera y col., 1994 (Fotos 8 y 9). La explicación más probable para este derivado del cromosoma Y sería una rotura y posterior unión de ambas cromátides hermanas en la región próxima al centrómero durante la espermatogénesis. La paciente habría heredado un cromosoma X de la madre y el derivado (idic Yp<sup>nf</sup>) del padre. Posteriormente, debido a la inestabilidad que origina la naturaleza dicéntrica del derivado del cromosoma Y se pudo haber originado la línea 45,X por pérdida anafásica, dando lugar al mosaico 45,X/46,X,idic(Yp<sup>nf</sup>). Los porcentajes de las líneas son respectivamente 59%/41%, lo que parece indicar que la pérdida anafásica podría haber tenido lugar durante las primeras divisiones mitóticas (Ilustr. 14).

Otra explicación posible sería la mitótica, es decir el cromosoma idic Yp<sup>nf</sup> no habría sido heredado del padre como tal alteración estructural sino que se habría formado durante las primeras divisiones mitóticas, y posteriormente, los fragmentos acéntricos se perderían.



Independientemente del origen del cromosoma idic( $Yp^{nf}$ ), esta paciente constituye un claro ejemplo en sí mismo de la necesidad de aplicar técnicas sensibles como FISH y PCR que permitan definir correctamente los fragmentos cromosómicos que aparecen en las pacientes con ST. La presencia de pequeños fragmentos o anillos cromosómicos en el ST es relativamente común. Entre un 6%-11% de las pacientes suelen presentar fragmentos cromosómicos de origen desconocido (Schmid y col., 1974; Coco y Bergada, 1977; de Almeida y col., 1985; Crolla y Llerena, 1988; Callen y col., 1991 y Lindgren y col., 1992; Nagafuchi y col., 1992; Zinn, Page y Fisher, 1993). Y la identificación precisa de estos fragmentos es imperativa debido al elevado riesgo de desarrollo de gonadoblastoma (López López y col., 1993; Tanaka y col., 1994).



**Foto 7:** Hibridación con la sonda XIST que indica la presencia del centro de inactivación en el fragmento cromosómico (paciente 27).

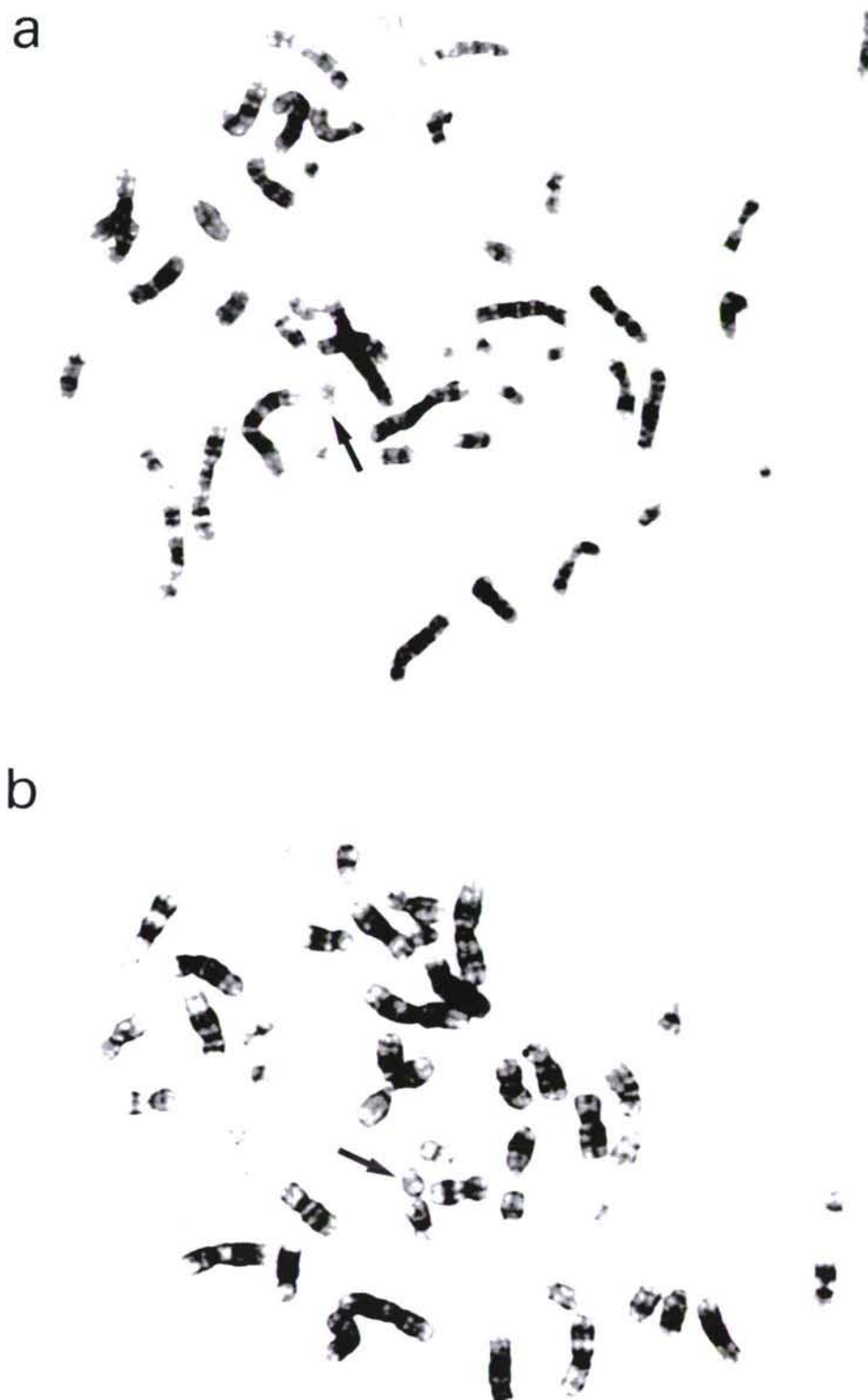


Foto 8: Metafases a y b obtenidas mediante bandas G que indican la presencia de un fragmento cromosómico de origen desconocido en la paciente 16.



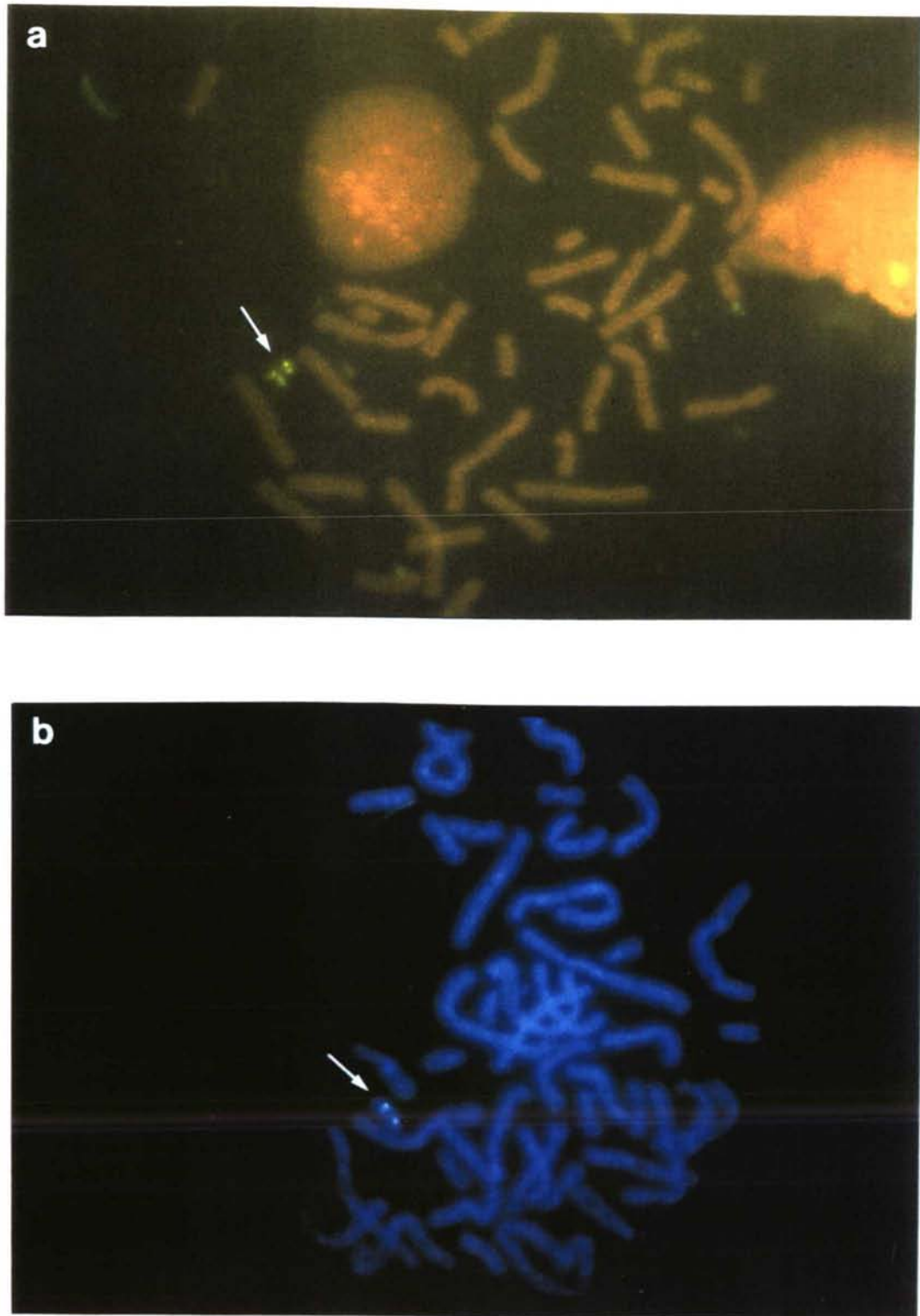
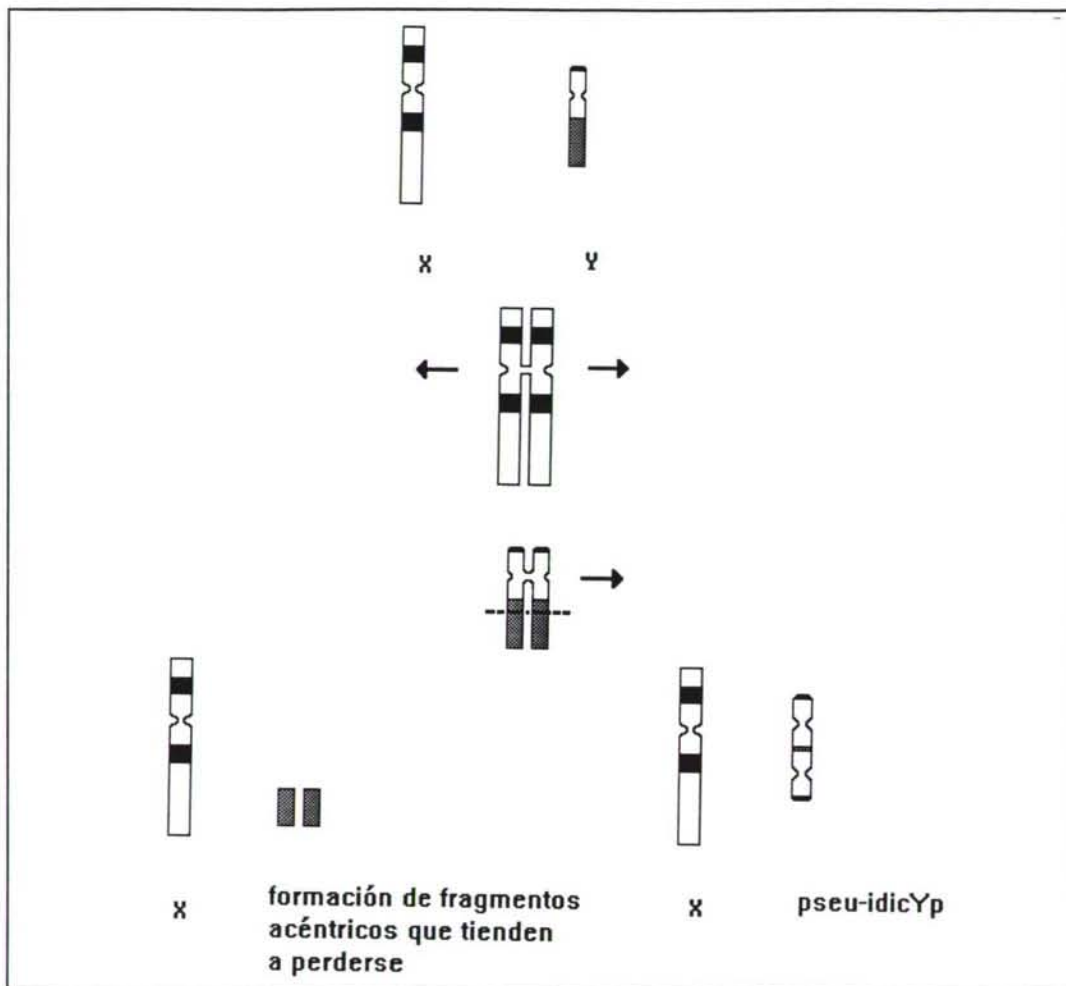


Foto 9: a) Hibridación con la sonda DYZ3 que identifica el fragmento cromosómico de la paciente 16 como un cromosoma idic( $Yp^{nf}$ ). b) Hibridación con la misma sonda en una metafase teñida con DAPI.



**Ilustr. 14.-** Formación del cromosoma pseu-idicYp

El estudio molecular mediante PCR con los cebadores Y1, Y2 ha confirmado la existencia de material procedente del cromosoma Y en esta paciente. La señal específica de la región centromérica del cromosoma Y (170 pb) fue detectado sólo en varones control y en la *paciente 16*, pero no en el resto de las pacientes estudiadas (Foto 20). El estudio por PCR fue realizado nuevamente tras la digestión del ADN control y de la *paciente 16* con la enzima de restricción *EcoRI* según las indicaciones señaladas previamente en el apartado de *Sujetos y Método*, resultando nuevamente positivo la presencia de la región centromérica del cromosoma Y. Esta paciente presenta, pues, una alta probabilidad de desarrollo de gonadoblastoma. Por otro lado, el estudio molecular mediante los primer XES7, XES2 ha confirmado la existencia del gen SRY en la *paciente 16*. El fragmento originado de 609 pb fue idéntico al obtenido en varones control y no apareció en el resto de las pacientes estudiadas (Foto 20).

El gen SRY es uno de los genes candidatos en la determinación del sexo (Sinclair y col., 1990) específico de varones y responsable del desarrollo de caracteres sexuales masculinos. Sin embargo esta paciente de 17 años presenta fenotipo femenino sin

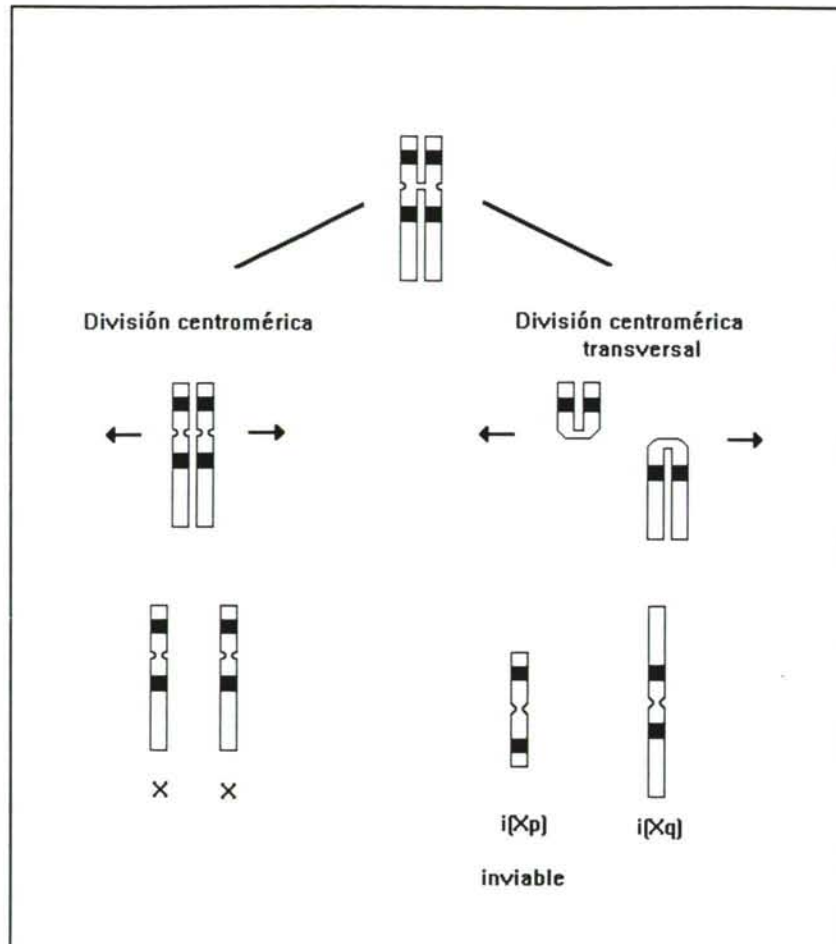


ambigüedad genital, útero pequeño sin evidencia de ovarios. El tratamiento con estrógenos y progestágenos dio lugar a su desarrollo sexual femenino completo.

La considerable heterogeneidad de las alteraciones fenotípicas entre las pacientes con ST hace difícil una correlación citogenética/fenotípica. Sin embargo, se sabe que los genes candidatos "anti-Turner" deben expresarse a partir del cromosoma X inactivo y tener su homólogo en el cromosoma Y. Este es el caso de los genes RPS4 (Fisher y col., 1990) y ZFX/ZFY (Ogata y col., 1993). Recientemente Erickson y col., (1995) han descrito una translocación Y;16 asociada a linfedema, lo que podría sugerir la posibilidad de diferentes genes "anti-Turner" localizados en la región heterocromática del cromosoma Y entre el que se encuentra el responsable del linfedema.

La *paciente 16* presenta una delección en la misma región que el caso presentado por Erickson y colaboradores teniendo en común ambos casos la presencia de linfedema neonatal. Nuestros datos no contradicen los aportados por estos autores.

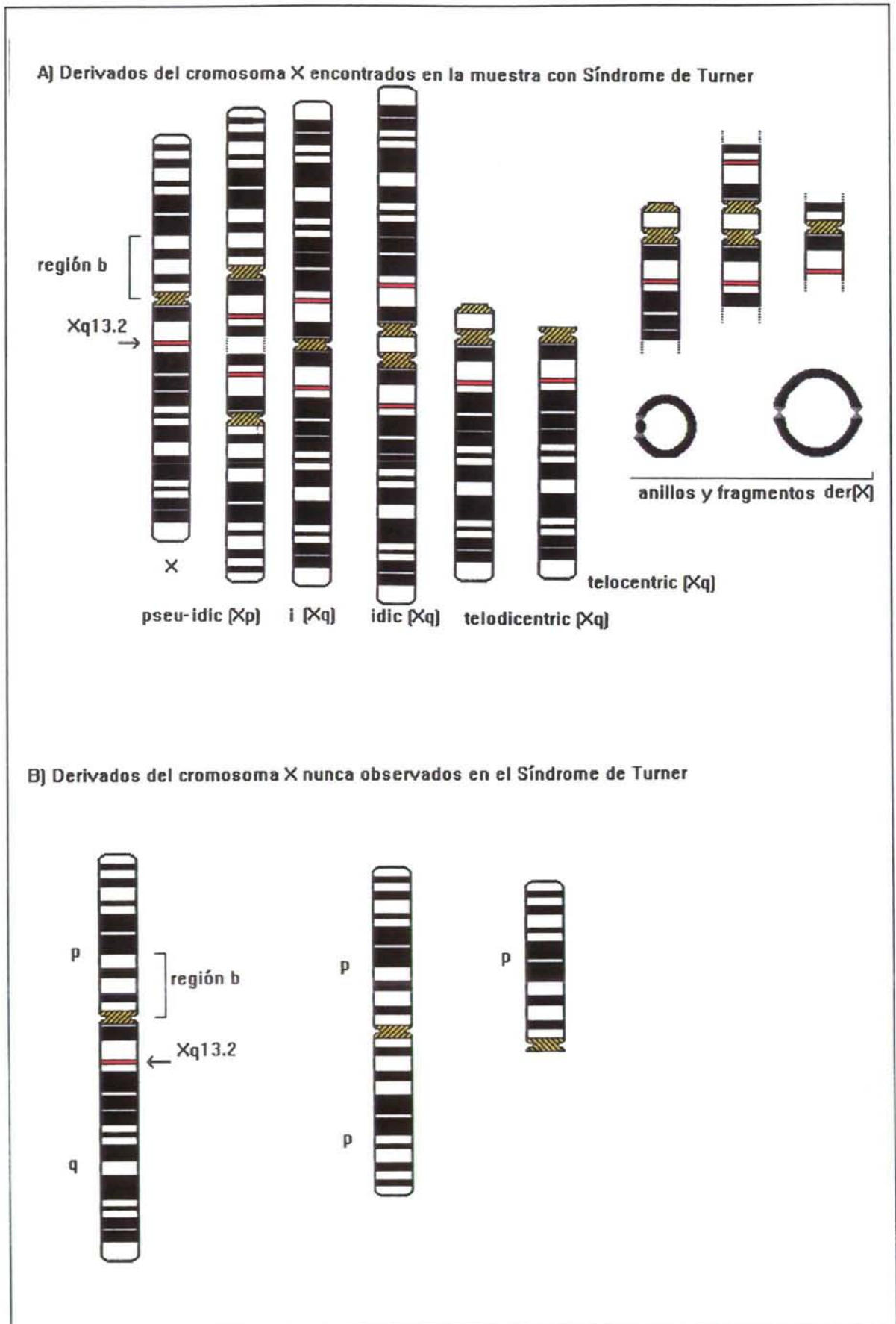
**45,X/46,X,i(Xq):** La formación de isocromosomas tiene lugar por división transversal del centrómero, separándose los dos brazos del cromosoma en lugar de las cromátides hermanas. Mediante la división transversal del centrómero, en el cromosoma X pueden formarse dos tipos de isocromosomas (Ilustr. 15) un isocromosoma para el brazo corto i(Xp), presumiblemente inviable, (Therman y Patau, 1974; Therman y Sarto, 1983) y un isocromosoma para el brazo largo i(Xq).



**Ilustr. 15.-** Formación de isocromosomas por división centromérica transversal.

Los isocromosomas para el brazo corto  $i(Xp)$  deberían aparecer con una frecuencia similar a la del brazo largo  $i(Xq)$ , alrededor del 15% en las pacientes con ST, (Hook y Warburton, 1983), sin embargo, no existe ningún caso bien documentado de isocromosomas  $iXp$  en la literatura (Therman y Sarto, 1983; Therman y Susman, 1993); el segmento próximo al centrómero situado en el brazo q siempre se mantiene (Pettigrew y col., 1991). A partir de estas observaciones se ha hipotetizado que el *locus* que controla la inactivación del cromosoma X se localiza en esta región "crítica" (Brown y col., 1991b). Los cromosomas que poseen este *locus* pueden inactivarse, sin embargo, los fragmentos del cromosoma X que no lo poseen no podrían, y así tendrían dos o más copias activas de varios genes del cromosoma X, lo que se presume que es inviable (Pettigrew y col., 1991).





Ilustr. 16.- Diferentes derivados del cromosoma X en el Síndrome de Turner.

Los isocromosomas son una de las alteraciones estructurales más comunes (Pettigrew y col., 1991). Se han encontrado en 1 de cada 50.000 recién nacidos, y al menos un 15% de las pacientes con ST presentan  $i(Xq)$  (Hook y Warburton, 1983). Se han descrito alrededor de 200 casos de isocromosomas Xq, con o sin mosaicismo, en la literatura (Kaffe y col., 1983; Midro y col., 1988; Pettigrew y col., 1991) constituyendo el segundo cariotipo más frecuente en el ST (Guttenbach, Köhler y Schmid, 1991).

Therman y Susman (1990) en su estudio de 150 pacientes no mosaico con ST concluyeron que el fenotipo Turner clásico puede ser debido a la pérdida del brazo corto del cromosoma X, más específicamente a la región denominada región "b" (Xcen-p11). Ello concuerda con el fenotipo Turneriano clásico de la *paciente 14* con cariotipo  $45,X/46,X,i(Xq)$  en un porcentaje del 81%/19% respectivamente.

También encontraron que los síntomas debidos a deleciones ( $Xp-$ ) y ( $Xq-$ ), aunque varía de unas pacientes a otras, son tremendamente similares entre sí, y que las deleciones ( $Xq-$ ) no dan lugar a alteraciones adicionales específicas a las presentes por deleciones en ( $Xp-$ ). Basándose en estos datos, propusieron que la región "b" escapa a la inactivación normal del cromosoma X. Cuando un cromosoma X presenta una deleción, se inactiva, y el proceso también influye a la región "b" (que también se inactiva). Así la similitud de las alteraciones inducidas por deleciones ( $Xp-$ ) y ( $Xq-$ ) podrían ser el resultado bien de la ausencia de la región "b" (por deleción), o bien, por la inactivación de ésta. El fenotipo resultante siempre sería similar.

La región "b" muestra otro comportamiento característico y diferencial del resto de las regiones del cromosoma X. En estudios del centro de inactivación, Therman y col., (1974; 1979) observaron que en aquellos cromosomas que poseían por duplicado el centro de inactivación, dicha región daba lugar a la formación de corpúsculos de Barr bipartidos proporcionales. La frecuencia de dichos corpúsculos de Barr y la distancia entre las dos partes, son mayores cuanto más separados estén los dos centros de inactivación. Sin embargo, si una o dos regiones "b" están insertadas entre los dos centros, estos parámetros se incrementan significativamente (Therman y col., 1976). Estos hallazgos fueron interpretados como el resultado de la inactivación de la región "b" en el cromosoma X inactivo.

Si la región "b" estuviese siempre activa, o al menos en parte, podría explicar las alteraciones causados por su ausencia (Therman, 1983). Therman propone que la región "b" se inactiva en los cromosomas X con deleciones, especialmente en aquellos casos en los cuales parte del brazo largo se ha perdido, haciéndolos funcionalmente equivalentes a cromosomas que han perdido la región "b".



El proceso de inactivación se inicia en el centro de inactivación y se extiende en ambas direcciones, como se ha demostrado en traslocaciones no balanceadas (X; autosomas), en los cuales la inactivación puede extenderse al segmento del autosoma involucrado, a parte de él, o a nada. Siguiendo la analogía de este fenómeno, los autores asumen que, en cromosomas X con deleciones, la inactivación se puede extender a la región "b", inactivándose de esta forma regiones que normalmente están activas. La inactivación en cromosomas Xq-, en la mayoría de los casos, puede extenderse al extremo del brazo corto (Xp) (Ropers y col., 1981). Ello podría explicar la baja talla presente en las portadoras de deleciones Xq- y que sea uno de los rasgos fenotípicos característicos de todas las pacientes con ST, independientemente de las variaciones en su cariotipo.

Sin embargo, aunque los rasgos fenotípicos dentro del ST son bastante constantes, existen variaciones de unas pacientes a otras, incluso con cariotipos aparentemente idénticos. Un número de factores pueden ser los responsables de estas variaciones: (1) mosaicismo oculto (Held y col., 1992), (2) mosaicismo placentario (Thaddeus, Ferguson y Golden, 1992; Caspari y col., 1994; Simoni y Sirchia, 1994), (3) diferente distribución de las líneas celulares en los mosaicos (Partsch y col., 1994) (4) aunque normalmente el cromosoma X anormal es el que se inactiva, a veces, puede tener lugar una inactivación aleatoria, y así, la inactivación de la región "b" puede ser parcial (Therman y Susman, 1990), (5) Otra posibilidad, es que esta región, esté sujeta a diferentes grados de inactivación, como ocurre con otros genes que permanecen siempre activos en el cromosoma X normal inactivo, pero presentan una inactivación menor que su alelo en el cromosoma X activo (Migeon y col., 1982; Therman y Susman, 1990).

El origen de los isocromosomas, mayoritariamente, es meiótico (Therman y Susman, 1993), por lo que podría suponerse que en la *paciente 14* el i(Xq) ha sido heredado de uno de sus progenitores. Posteriormente, por pérdida anafásica se originará la línea 45,X. Otra posibilidad es la herencia de dos cromosomas X normales que, tras un proceso de división transversal durante la primera división mitótica en uno de los cromosomas X, ha originado un isocromosoma para el brazo largo. El resultado son dos células con dotación cromosómica diferente, pero complementaria, es decir, un mosaico de la forma 45,X/46,X,i(Xq) (Fotos 10 y 11). El resto del material cromosómico del X se ha perdido por no presentar centrómero (Ilustr. 15). La única paciente con este cariotipo es la *paciente 14*, de 15 años, con un fenotipo Turner clásico que no se diferencia del manifestado en otras pacientes con cariotipo 45,X o 45,X/46,XX (Tabla 7).



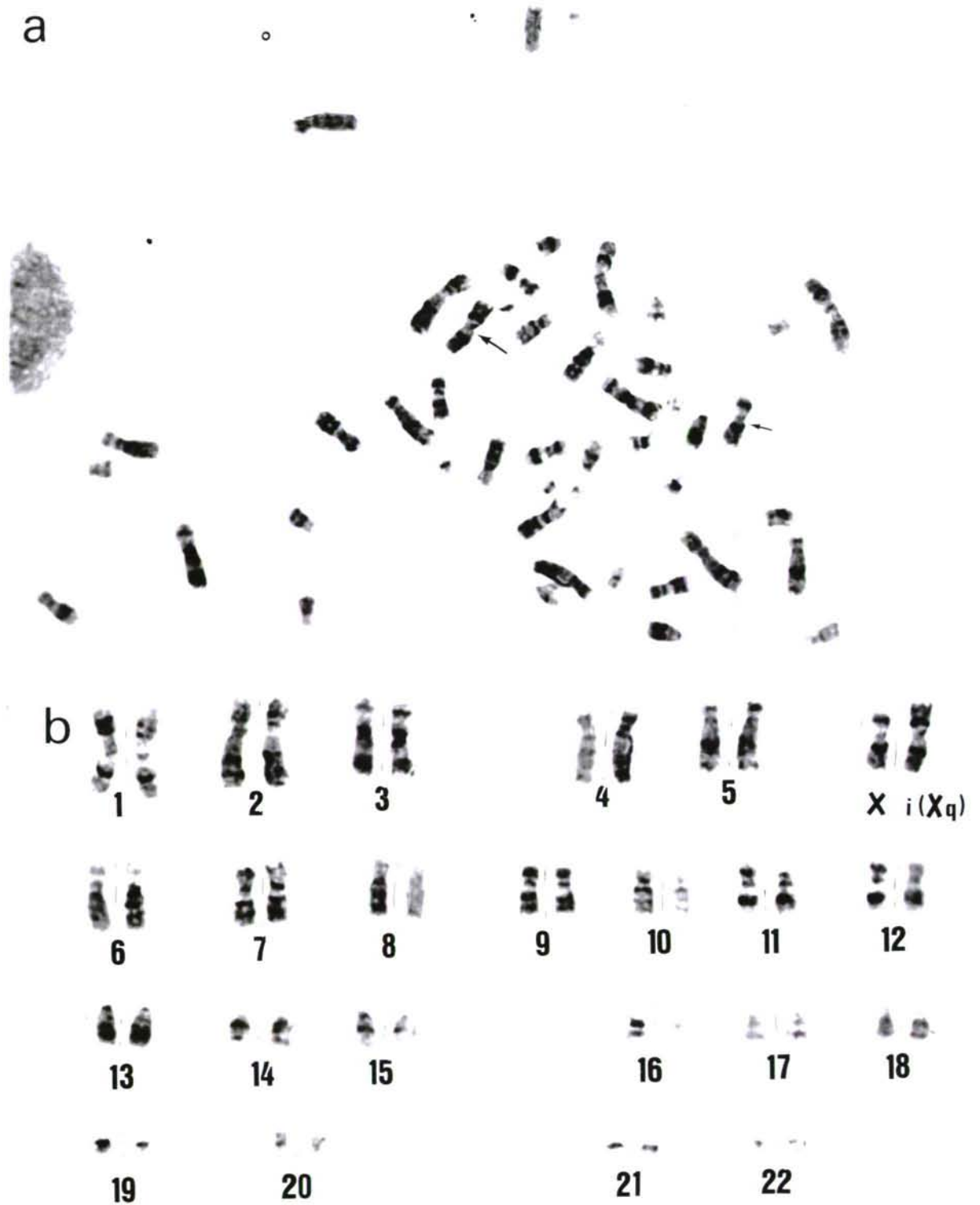
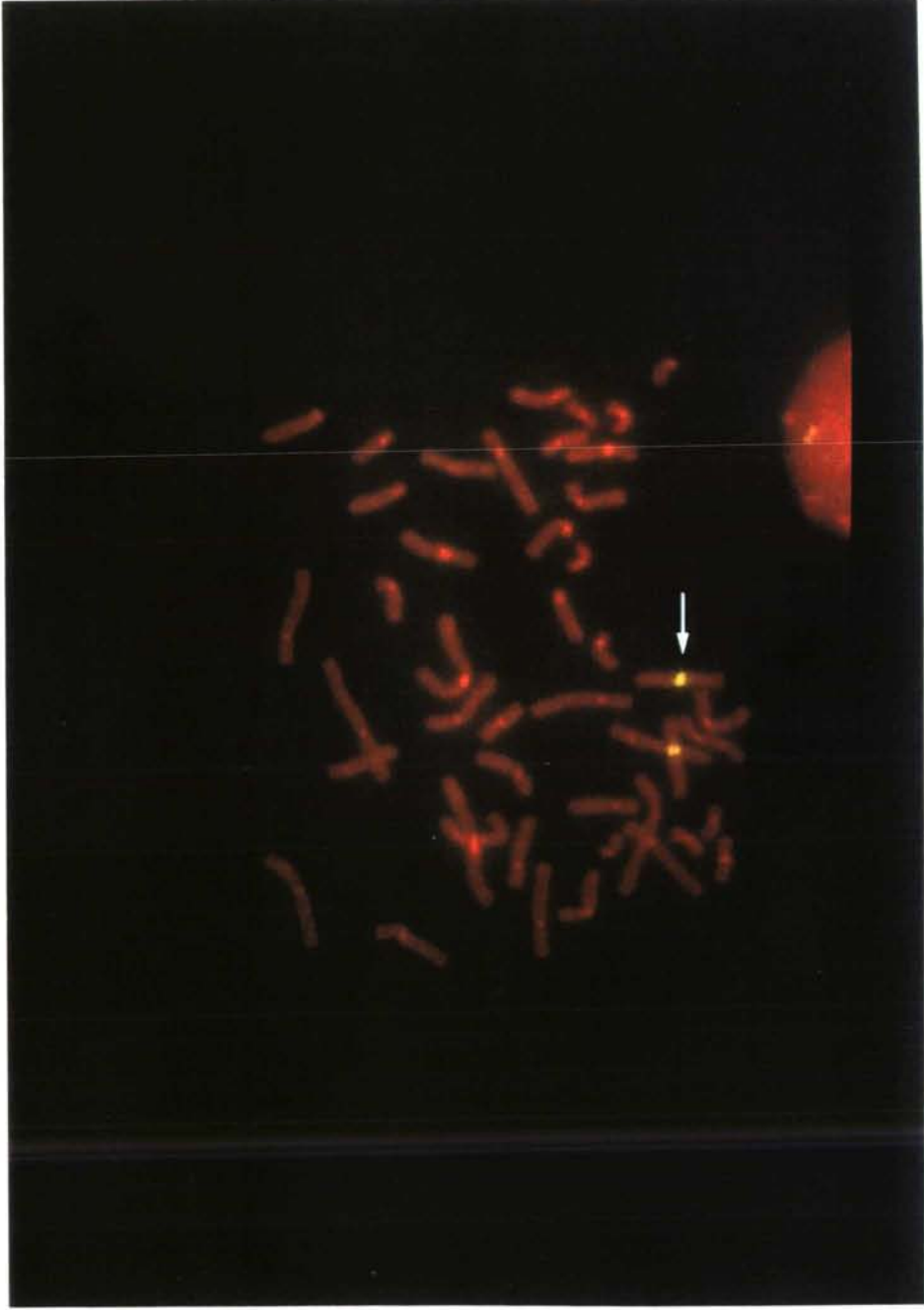


Foto 10: a) Metafase obtenida mediante bandas G que indica la presencia de un isocromosoma Xq en la paciente 14. b) Cariotipo de la misma célula.



**Foto 11:** Hibridación con la sonda DXZ1 que indica la presencia de un isocromosoma Xq en la paciente 14. Metafase 46,X,i(Xq) teñida con Ioduro de Propidio.

**45,X/46,X,del(X)(p?)**: Este cariotipo lo presenta una única paciente, la *paciente 21*, con un porcentaje de las líneas celulares 25%/75%. La ausencia de la línea 46,XX apoya la hipótesis de una herencia del derivado cromosómico (delXp-) como tal cromosoma X delecionado, que posteriormente se ha perdido por inestabilidad, dando lugar a la línea 45,X.

Esta paciente tiene en común con la paciente anterior (*paciente 14*), la ausencia total del brazo corto del segundo cromosoma X. Como ya hemos indicado, se cree que el fenotipo Turner clásico puede ser debido a la pérdida del brazo p del cromosoma X, más específicamente a la región "b" (Xcen-p11). Así según la hipótesis de Therman se esperaría un fenotipo similar en ambas pacientes, sin embargo, las alteraciones fenotípicas son más acusadas en la paciente 21 que en la 14, pese a presentar un porcentaje de la línea 45,X mucho más bajo (Tabla 7; Foto 12). La *paciente 21* presenta un fenotipo Turneriano severo, con morfología dismórfica. En este sentido existe una aparente contradicción, ya que esta paciente está más afectada fenotípicamente que las pacientes 45,X no mosaico. La explicación podría ser la aportada por Thaddeus, Ferguson y Golden (1992) según la cual la severidad fenotípica estaría en relación con la cantidad de material cromosómico presente durante el período de la embriogénesis, y con el momento en el cual se perdió este material, relacionando, así, el fenotipo con las líneas celulares presentes durante la embriogénesis y no con el cariotipo actual de las pacientes con ST.

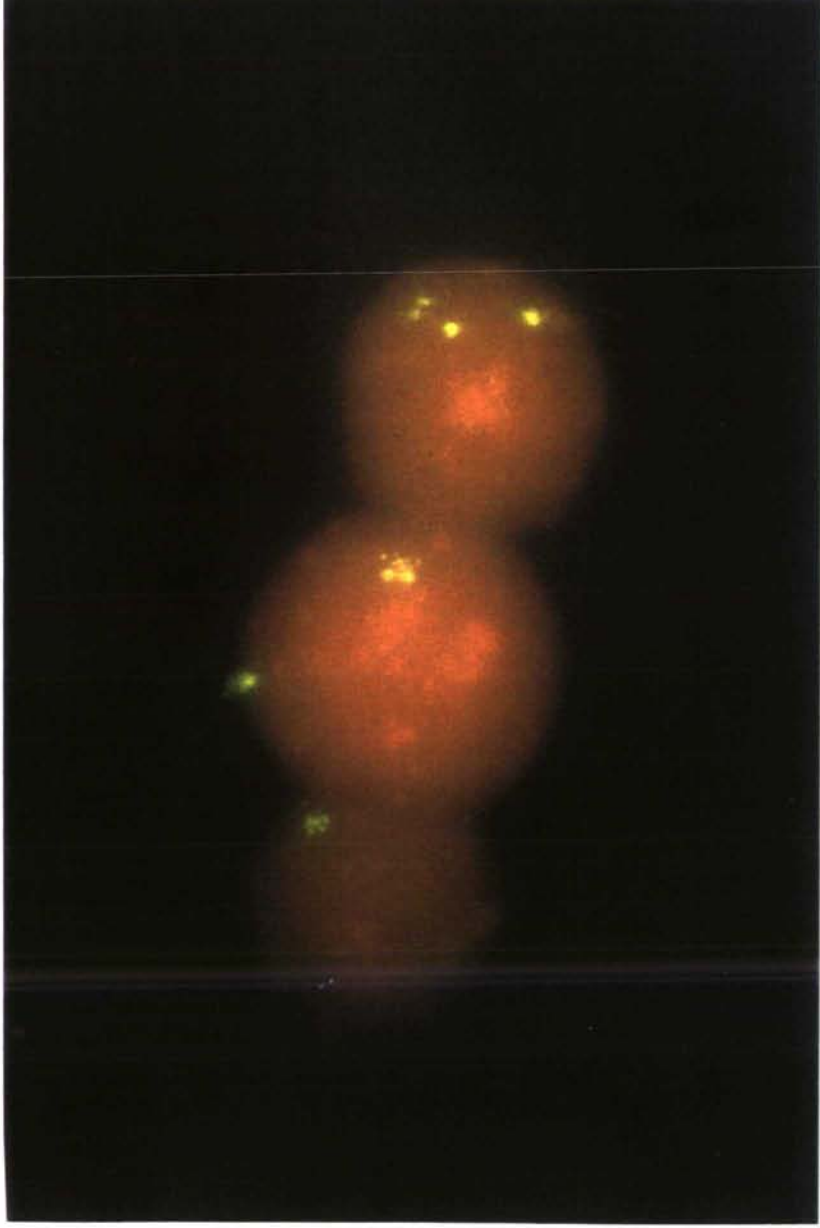
### *Triples mosaicos*

**45,X/46,XX/47,XXX**: El origen de este mosaico ya ha sido indicado anteriormente cuando se describió el cariotipo 45,X/47,XXX. La célula origen o cigoto ha sido una célula 46,XX que por no disyunción mitótica, ha dado lugar a las líneas 45,X y 47,XXX. Si este fenómeno ocurre en la primera división mitótica el resultado es el mosaico 45,X/47,XXX, si ocurre posteriormente, la línea originaria se mantendrá, originándose un triple mosaico 45,X/46,XX/47,XXX (Ilustr. 16; Foto 13); este es el caso de la *paciente 23*.

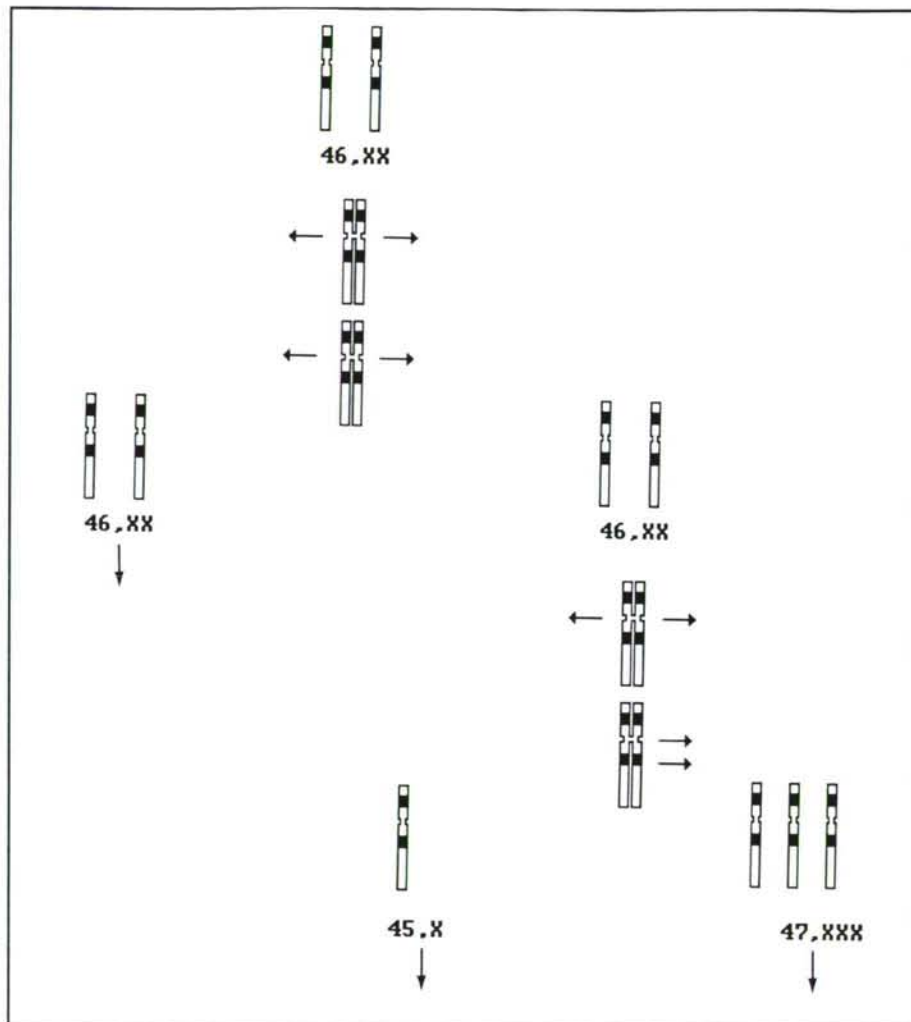




**Foto 12:** Hibridación con la sonda DXZ1 mediante FISH que indica la delección de uno de los brazos del cromosoma X en la paciente 21.



**Foto 13:** Hibridación con la sonda DXZ1 mediante FISH en la paciente 23. Núcleos con una, dos y tres señales fluorescentes correspondientes al cariotipo 45,X/46,XX/47,XXX



**Ilustr. 17.-** Formación del mosaico 45,X/46,XX/47,XXX por no disyunción en la segunda división mitótica.

La ausencia de *Pterygium colli* y *cubitus valgus* en esta paciente, parece indicar que la proporción entre las tres líneas celulares no es homogénea en todos los tejidos, así, aunque en sangre la línea mayoritaria es la 45,X con un 87% (Tabla 6), lo que daría lugar, en principio, a un fenotipo Turner severo, no aparecen algunos de los rasgos fenotípicos asociados al ST. Por otro lado, el desarrollo escaso de útero y ovarios indica una posible localización de la línea 45,X en estos tejidos. Otra explicación, como indicamos anteriormente, podría estar referida al mosaicismo en la etapa embrionaria. Así según Partsch y col., (1994) y Robinson y col., (1995) la severidad fenotípica dependerá de la distribución de las diferentes líneas celulares, de su proporción y de una selección *in vivo*.

**45,X/47,XXX/47,XX,del(X)(p?):** Al igual que en el caso anterior, la célula originaria pudo haber sido la 46,XX que por no disyunción en la primera división mitótica podría

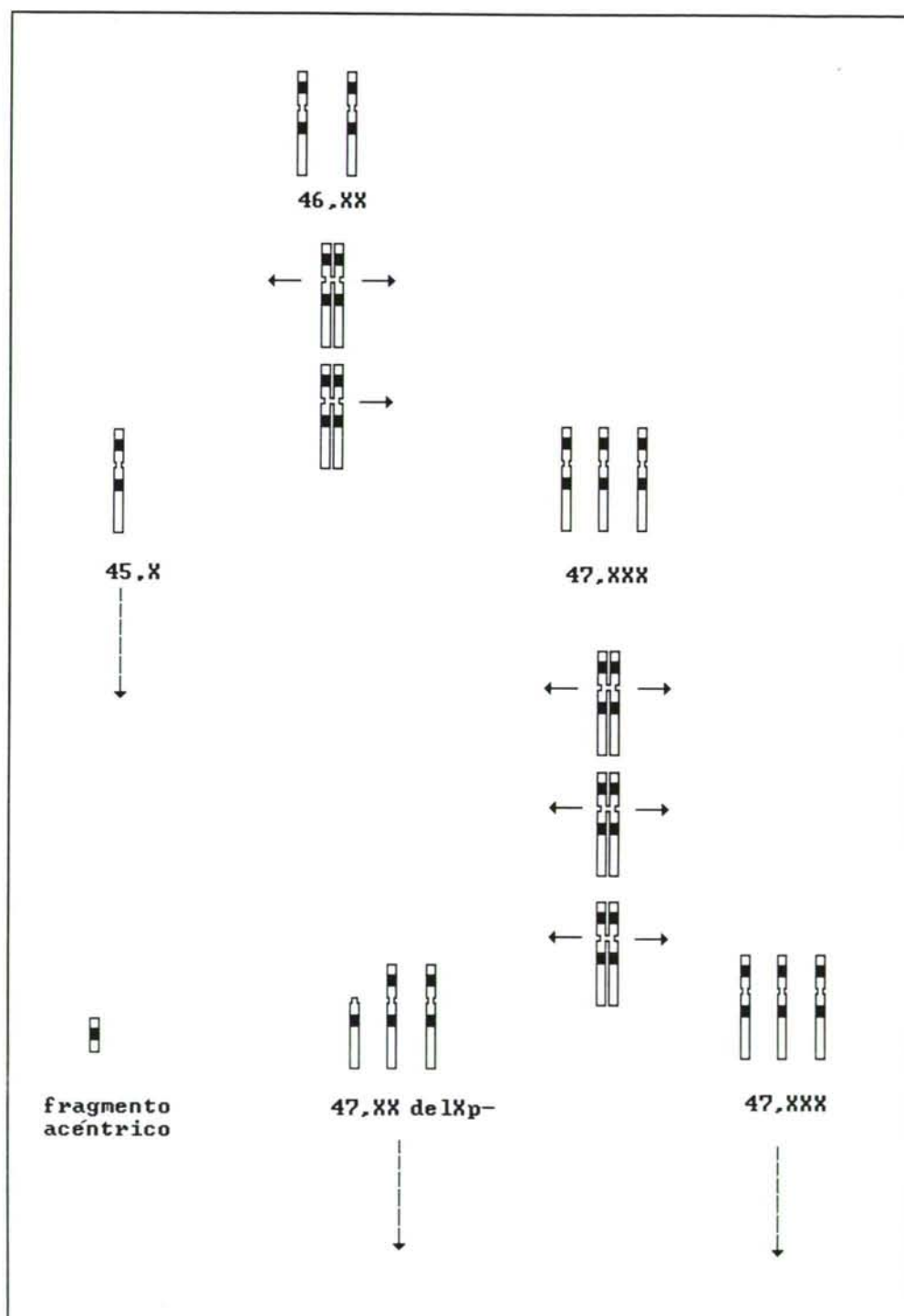


haber dado lugar a dos líneas celulares: 45,X y 47,XXX. Esta última, tras una delección del brazo corto originaría la tercera línea celular [47,XX,del(X)(p?)]. La ausencia de la línea 46,XX indica que la no disyunción ha tenido lugar en la primera división mitótica y no posteriormente (Ilustr. 17).

La única paciente con este cariotipo ha sido la *paciente 11* de 10 años de edad que no manifiesta un fenotipo Turner severo. No presenta alteraciones específicas como *Pterygium colli* ni *cubitus valgus*, al mismo tiempo que su útero es normal pero uno de sus ovarios presenta la forma característica de cintilla. Quizás el alto porcentaje de las líneas 47,XXX y 47,XX,del(X)(p?) (35,5% y 23,1% respectivamente) con respecto a la línea 45,X la ha preservado de alteraciones fenotípicas más severas. Al igual que en el resto de los casos, una distribución no homogénea de las líneas en los diferentes órganos y tejidos podría ser la explicación de estas alteraciones, o podría estar referida al mosaicismo en la etapa embrionaria.

**45,X/46,XX/46,X,del(X)(p?):** La existencia de la línea 46,XX en la *paciente 19* indica que ha heredado dos cromosomas X normales de los progenitores; la formación de las otras dos líneas celulares es postcigótica, posiblemente por pérdida anafásica de un cromosoma X en alguna de las primeras divisiones mitóticas (aunque no en la primera pues la línea 46,XX se mantiene) y delección del brazo corto del cromosoma X. El orden en que han ocurrido estos dos fenómenos (pérdida anafásica y delección de uno de los brazos) podría variar. Si el derivado del cromosoma X (delXp-) es inestable, se incrementaría el porcentaje de la línea 45,X por lo que podría ser posible que la delección haya tenido lugar primero, y posteriormente, por dicha inestabilidad, se formase la línea 45,X.

La paciente que presenta este mosaicismo es la *paciente 19*, con un fenotipo Turner clásico, debido posiblemente al alto porcentaje de la línea 45,X (83,5%) y a la pérdida del brazo corto en uno de los cromosomas X como segunda línea celular más frecuente (15,7%).



**Ilustr. 18.-** Formación del mosaico 45,X/47,XXX/47,XX,del(Xp-) por no disyunción y posterior delección del brazo corto del cromosoma X.

**45,X/46,XX/46,X,idic(Xp)**: Como hemos mencionado anteriormente, no existe ningún caso de isocromosomas Xp en la literatura (Therman y Sarto, 1983; Brown y col., 1991b; Therman y Susman, 1993). El segmento próximo al centrómero situado en el brazo largo siempre se mantiene (Pettigrew y col., 1991) pues contiene el centro de inactivación del cromosoma X y su ausencia da lugar a la existencia de dos o más copias de varios genes, lo que se presupone que es inviable (Pettigrew y col., 1991). La *paciente 12* constituye un caso excepcional debido al reducido número de pacientes con este cariotipo aparecidos en la literatura sobre el ST. Sólo existen dos casos similares descritos en la literatura, uno fue estudiado por Pettigrew y col. (1991) y otro por Caine y col., (1993).

Esta paciente había sido diagnosticada inicialmente como mosaico 45,X/46,XX. La utilización conjunta de las sondas DXZ1 y XIST mediante FISH demostró que el derivado del cromosoma X presente en la *paciente 12* es un pseudoisocromosoma dicéntrico que contiene dos copias del brazo corto del cromosoma X, dos centrómeros y dos copias de la región proximal del brazo largo conteniendo dos copias del centro de inactivación (XIC). Uno de los dos centrómeros no está condensado (Fotos 14-16) y por lo tanto es inactivo.

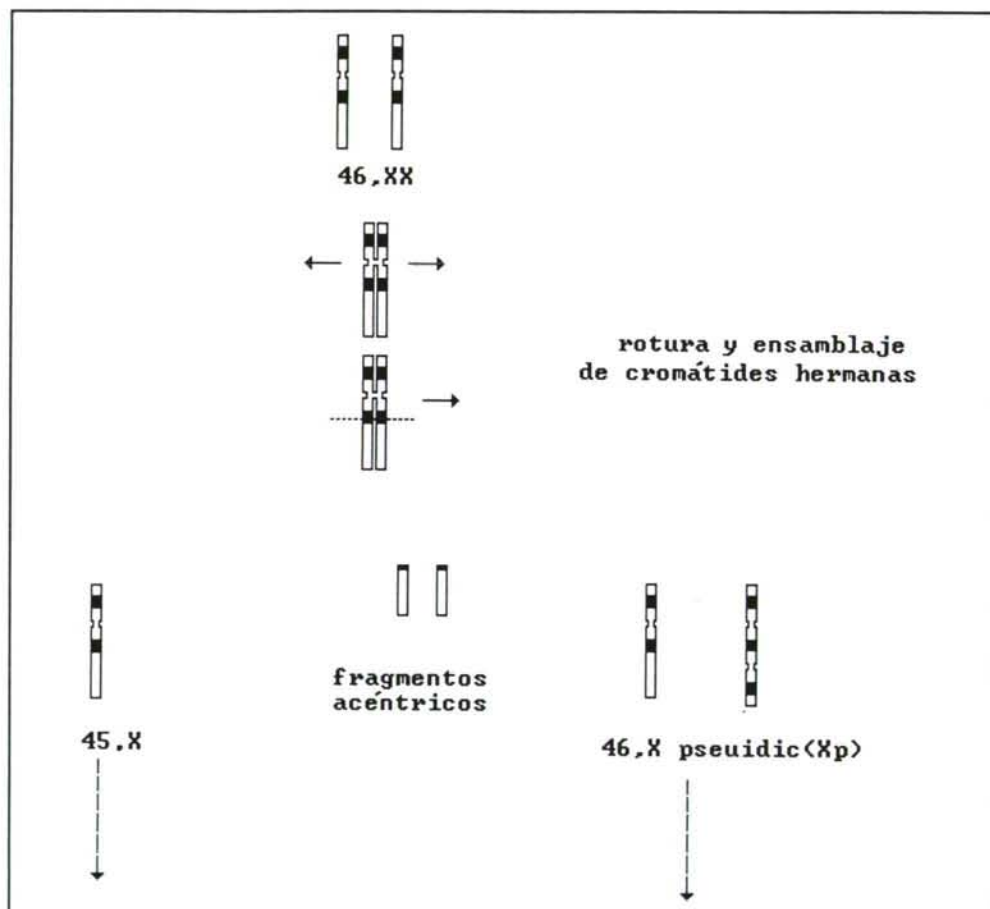
Al contrario que en el caso descrito por Pettigrew, el pseudoisocromosoma dicéntrico en esta paciente tiene un origen postcigótico; se ha formado durante las primeras divisiones mitóticas ya que la existencia de la línea celular 46,XX así lo indica. Su origen ha sido por rotura y ensamblaje de cromátides hermanas a nivel de la región Xq13 duplicándose los brazos p y la región del brazo q próxima al centrómero (incluyendo el centro de inactivación) (Ilustrs. 18 y 19). La hibridación con la sonda XIST demuestra su existencia por duplicado en la región situada entre los dos centrómeros (Foto 16).

Aunque el fenotipo de la *paciente 12* es muy semejante al resto de la población Turner estudiada, debido, quizás, al alto porcentaje de la línea celular 45,X (94,7%), destaca su elevada curva de crecimiento. Esta característica podría ser debida a la duplicación del brazo p (es la única paciente en la que se da esta duplicación).

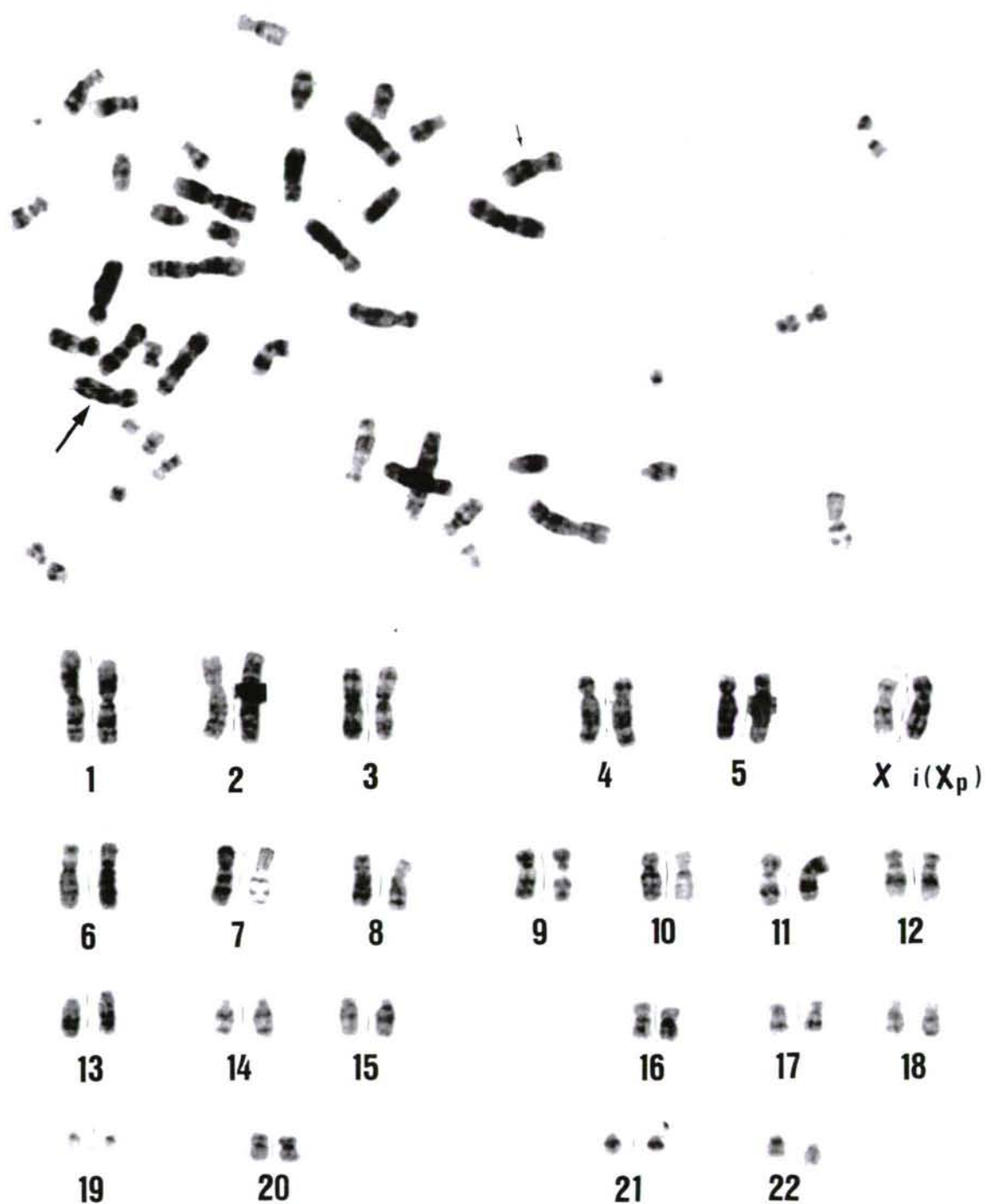
Epstein en 1990 propuso que el gen, o los genes responsables de la talla están localizados en la región terminal del brazo corto del cromosoma X. Estos genes están presentes en porciones homólogas de los cromosomas X e Y. Así, cuando existe un segundo cromosoma sexual, X o Y, portadores de estos genes, podría darse talla normal.



Nuestros datos concuerdan con la hipótesis propuesta por Epstein. Así, aunque la *paciente 12* presenta talla baja, (debido quizás al bajo porcentaje del pseudoisocromosoma dicéntrico), el tratamiento de GH ha dado mejores resultados que en el resto de la población Turner estudiada. Aunque el porcentaje de la línea 46,X,idic(Xp) es del 4,6% parece ser suficiente para que la paciente siga una curva de crecimiento elevada y reaccione mejor al tratamiento.



**Ilustr. 19.-** Formación de un pseudoisocromosoma dicéntrico idic(Xp) por rotura y ensamblaje de cromátidas hermanas.



**Foto 14:** a) Metafase obtenida mediante bandas G que indica la presencia de un pseudoisocromosoma dicéntrico (Xp) en la paciente 12. b) Cariotipo de la misma célula.

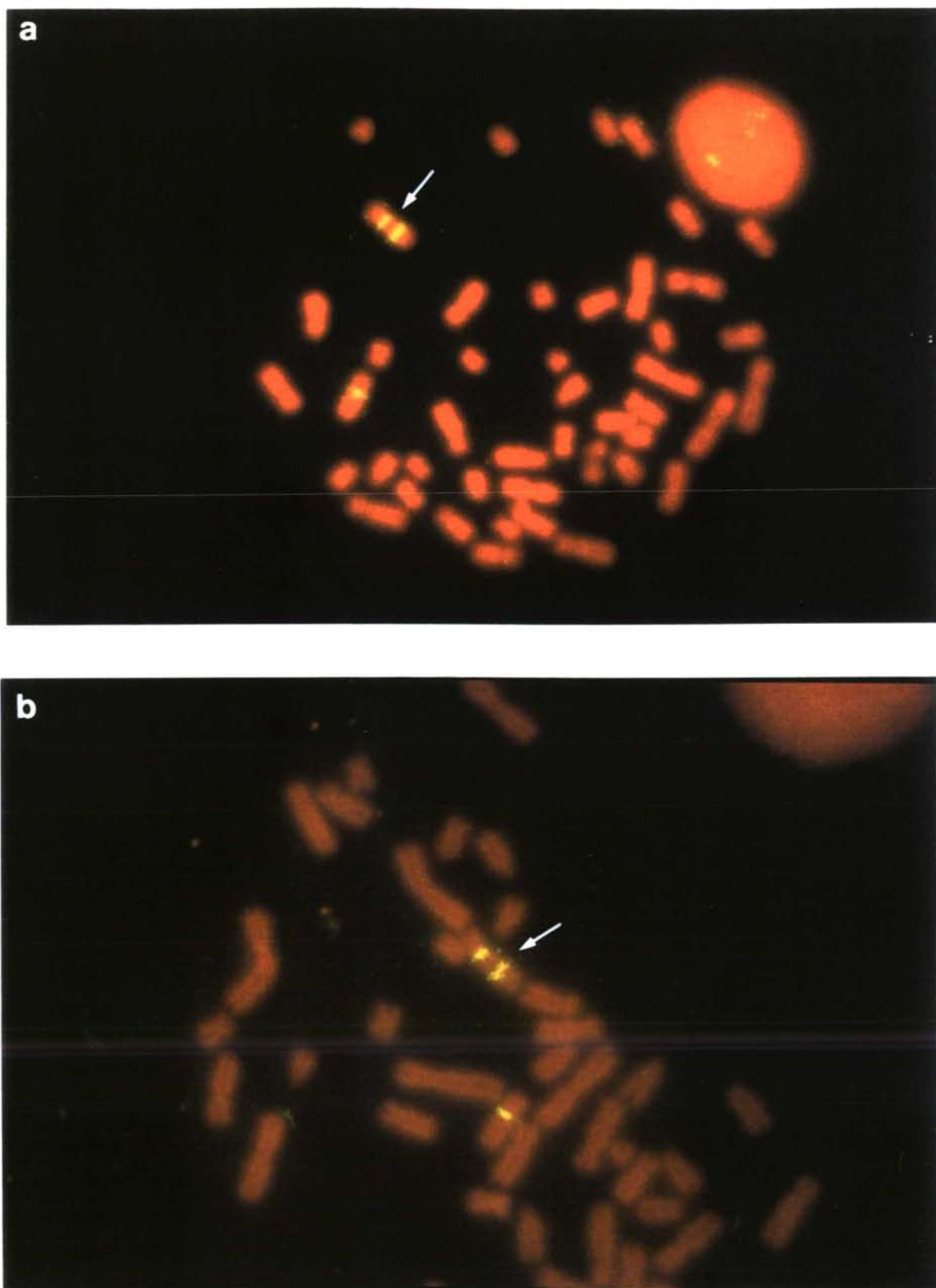
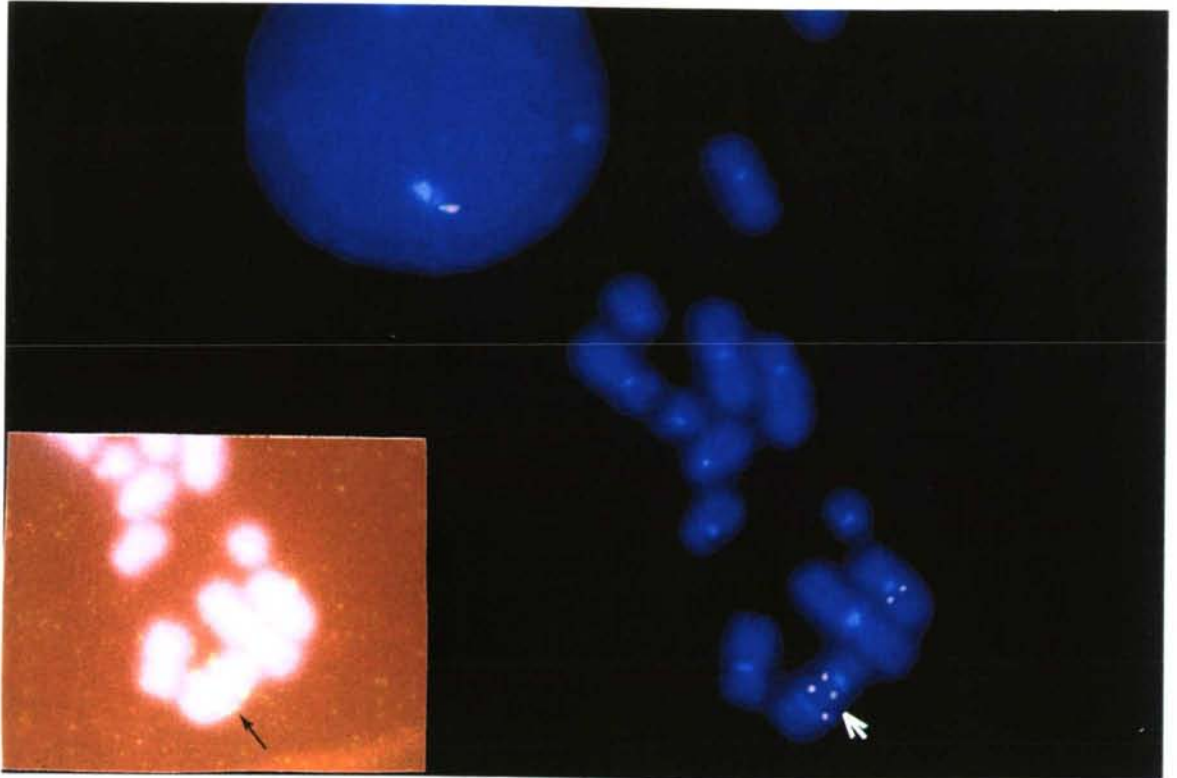
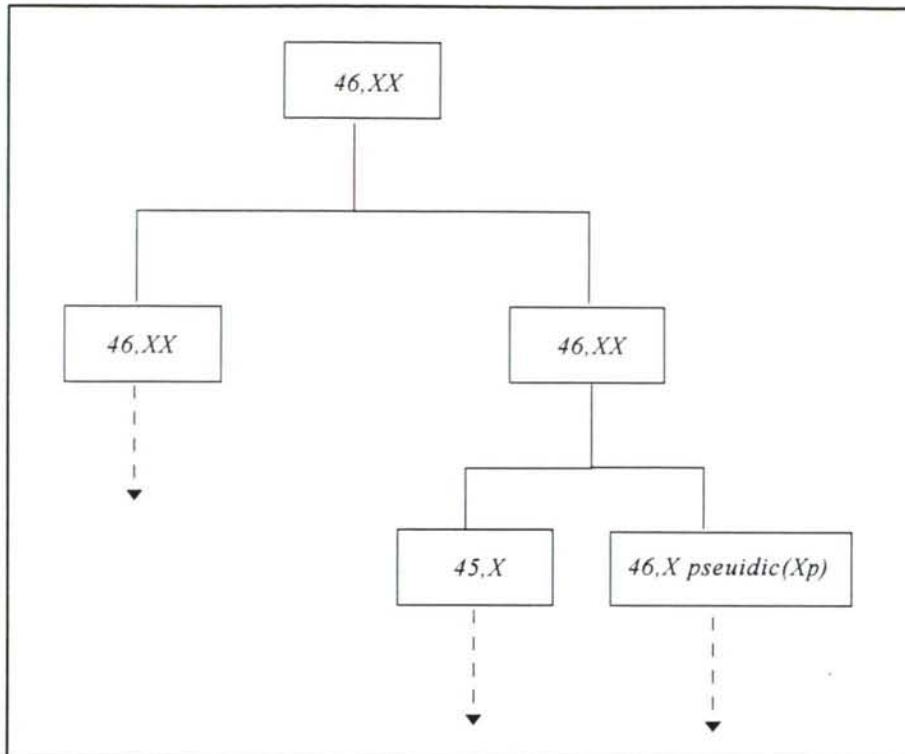


Foto 15: a y b) Hibridación con la sonda DXZ1 mediante FISH en la paciente 12, que indica la presencia de un pseudoisocromosoma dicéntrico Xp.





**Foto 16:** Hibridación conjunta con las sondas DXZ1 y XIST en una metafase de la paciente 12 que indica la presencia por duplicado del centro de inactivación en el pseudoisocromosoma dicéntrico (Xp)



**Ilustr. 20.-** Mosaico de tres líneas celulares en la paciente 12 por formación de un pseudoisocromosoma dicéntrico (Xp) y pérdida de fragmentos acéntricos.

**45,X/46,XX/46,X,idic(Xq):** La existencia de la línea celular 46,XX indica que la *paciente* 25 ha heredado dos cromosomas X normales de sus padres y que el síndrome es debido a un error postcigótico. El cromosoma isodicéntrico se ha formado por rotura y ensamblaje de cromátides hermanas durante las primeras divisiones mitóticas, que ha originado dos nuevas líneas celulares: la 45,X y la 46,X,idic(Xq).

La división transversal del cromosoma ha tenido lugar por la región superior del centrómero dando lugar a un cromosoma isodicéntrico. Estos cromosomas isodicéntricos están constituidos por dos copias del brazo largo y dos centrómeros muy próximos entre sí. Mediante la técnica de bandas G y debido a la proximidad de los dos centrómeros, este cromosoma había sido definido previamente como un isocromosoma monocéntrico.

Este derivado del cromosoma X ha aparecido implicado en otros cuatro mosaicos (*pacientes*, 25, 26, 24 y 22) dos de ellos mosaicos complejos de cuatro y nueve líneas celulares (*pacientes* 24 y 22 respectivamente) lo que parece ser indicativo de la gran inestabilidad de este derivado cromosómico.

El origen de este *idic(Xq)* es mayoritariamente meiótico (precigótico), exceptuando en la *paciente 25* que, por poseer la línea celular 46,XX, nos indica que es el resultado de un error postcigótico. La ausencia de la línea 46,XX en el resto de las pacientes, el alto porcentaje de la línea 46,X,*idic(Xq)* y la existencia de numerosas líneas celulares, nos lleva a pensar en un origen meiótico, así como en la inestabilidad de éste. Esta inestabilidad podría ser debida a la existencia de dos centrómeros muy próximos entre sí que podría conducir a errores en la distribución cromosómica durante la mitosis. En ninguno de estos cromosomas *idic(Xq)* se han apreciado diferencias entre las dos regiones centroméricas, lo que no nos orienta sobre la inactivación de ninguna de ellas. Si las dos regiones centroméricas fuesen funcionales, estos derivados cromosómicos serían inestables, originando frecuentes errores mitóticos. Pero aunque podría ser una explicación plausible, no parecen existir cromosomas dicéntricos con dos centrómeros funcionales, independientemente de la distancia entre los dos centrómeros (Therman y Susman, 1993), por lo que la razón de esta gran inestabilidad que conduce a mosaicos complejos de hasta nueve líneas celulares la desconocemos.

El fenotipo Turner de la *paciente 25* se ve complicado por fenilcetonuria clásica. El alto porcentaje de la línea 45,X (91%) puede explicar la presencia de un fenotipo Turner severo. Como se puede observar, la existencia de mosaicismo, no implica, necesariamente, un fenotipo menos afectado en comparación con las pacientes 45,X no mosaicos.

**45,X/46,X,*idic(Xq)*/47,X,*idic(Xq)*,*idic(Xq)***: Como hemos comentado anteriormente, los cromosomas isodicéntricos pueden originarse tanto en mitosis como en meiosis, pero la inexistencia de la línea celular 46,XX en la *paciente 26* indica un origen presumiblemente meiótico. Un origen mitótico sólo sería posible si la rotura y ensamblaje de cromátides hermanas hubiese tenido lugar durante la primera división mitótica del cigoto. Por ello se podría suponer que la paciente ha heredado el cromosoma *idic(Xq)* de uno de sus progenitores. Esta hipótesis se ve apoyada por el alto porcentaje de la línea 46,X,*idic(Xq)* (69,9%). Posteriormente, en algún momento durante el desarrollo embrionario, y debido a la gran inestabilidad de este cromosoma, por no disyunción mitótica se formarían dos líneas celulares distintas; unas células con dos cromosomas isodicéntricos 47,X,*idic(Xq)*,*idic(Xq)* y otras células con un sólo cromosoma X (45,X). La gran inestabilidad de los cromosomas *idic(Xq)* queda reflejada en el bajo porcentaje de la línea 47,X,*idic(Xq)*,*idic(Xq)* en relación con la 45,X; podría ocurrir que las líneas 45,X y 46,X,*idic(Xq)* se estén formando a partir de la línea 47,X,*idic(Xq)*,*idic(Xq)*.



### *Formación de mosaicos complejos por la aparición de nuevas líneas celulares*

Los cromosomas con más de un centrómero (dicéntricos y multicéntricos) son muy inestables en mitosis debido a que los centrómeros pueden orientarse hacia polos opuestos, resultando roturas y/o pérdidas de cromosomas. Sin embargo, los cromosomas dicéntricos y los multicéntricos pueden segregarse regularmente si 1) los centrómeros están muy próximos unos de otros o 2) todos los centrómeros menos uno permanecen inactivos. Pero si estos centrómeros se reactivan la línea celular se transforma en inestable, dando lugar a mosaicismos para los cromosomas dicéntricos (Ying y Ives, 1971; Hsu y col., 1978; Daniel y col., 1980; Camargo y Cervenka, 1984; Peretti y col., 1986; Haaf y Schmid, 1990; Wandall, 1995). Incluso un cromosoma dicéntrico puede, alternativamente, decidir que centrómero será activo en cada división mitótica.

Todos los mosaicos complejos que hemos observado en nuestra muestra tienen en común la implicación de isocromosomas dicéntricos para el brazo largo *idic(Xq)*. Ello podría ser debido a la reactividad de alguno de los dos centrómeros en algún momento, resultando cromosomas *idic(Xq)* inestables que originan múltiples líneas celulares. La reactivación de alguno de los dos centrómeros no se ha demostrado, pero la formación de mosaicos complejos cuando en alguna de las líneas celulares está implicado un *idic(Xq)* demuestra la gran inestabilidad de este derivado cromosómico.

La inexistencia de la línea celular 46,XX en estas pacientes (*pacientes 24 y 22*), indica un origen presumiblemente meiótico del derivado cromosómico *idic(Xq)*. Al igual que en el caso anterior, un origen mitótico sólo sería posible si la rotura y ensamblaje de cromátidas hermanas hubiese tenido lugar durante la primera división mitótica del cigoto. Por ello se podría suponer que las pacientes han heredado el cromosoma *idic(Xq)* de uno de sus progenitores. Posteriormente, en algún momento durante el desarrollo embrionario, y debido a la gran inestabilidad de este cromosoma, por no disyunción mitótica se formarían las líneas 47,X,*idic(Xq)*,*idic(Xq)* (Foto 17a) y 45,X. La existencia de células con tres cromosomas isodicéntricos podría tener una explicación semejante (Foto 18b).

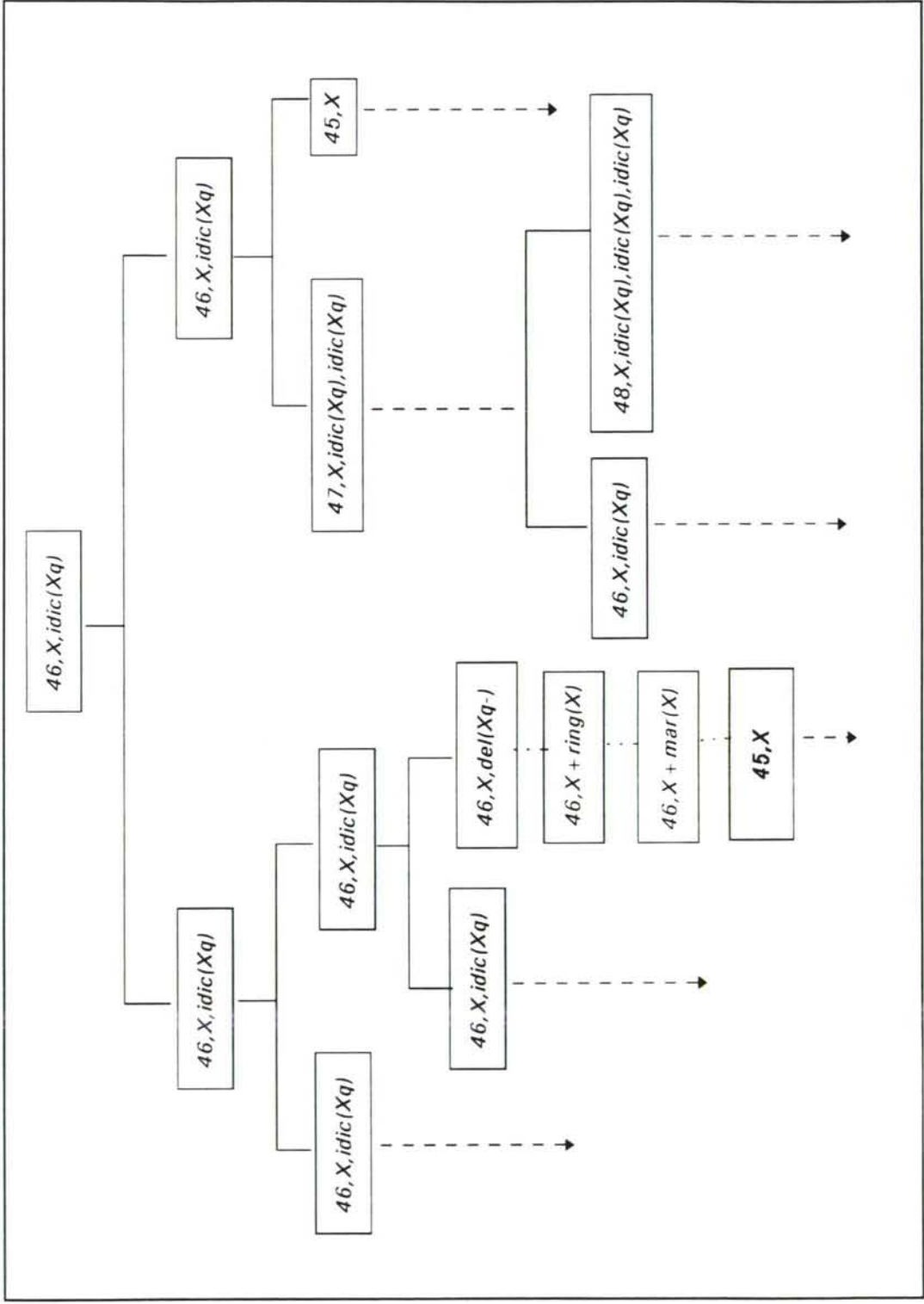
Al mismo tiempo que se produce acumulación de cromosomas *idic(Xq)*, y por el mismo principio de inestabilidad, se producen roturas que dan lugar a cromosomas dicéntricos que han perdido uno de sus brazos. Cuando por translocación se forman cromosomas con más de un centrómero, durante la mitosis se producen estructuras aberrantes, ya que los dos centrómeros de una misma cromátida pueden ser atraídos hacia polos diferentes, provocando la rotura del cromosoma (Lewin, 1993). El resultado es la formación de fragmentos acéntricos que tenderán a distribuirse arbitrariamente en la mitosis, y por ello, se perderán en el transcurso de las sucesivas divisiones; y un brazo "q" con dos centrómeros que funcionará como un fragmento cromosómico. A partir de estos fragmentos se podría explicar la formación de otros fragmentos más pequeños (también

con dos centrómeros) por sucesivas pérdidas de material genético. Los anillos (que presentan también dos centrómeros) (Foto 18a) podrían ser el resultado de reestructuraciones de los fragmentos cromosómicos idicéntricos, o bien a la inversa, la formación de anillos cromosómicos tienden a formar fragmentos cromosómicos de tamaño variable. Una posible explicación de la formación de los mosaicos complejos encontrados en las pacientes 24 y 22 se propone en las ilustraciones 20 y 22.

Las *pacientes 24 y 22* son muy semejantes entre sí cariotípicamente, pero varían en el número de líneas celulares. Sin duda este tipo de cromosoma derivado del X adquiere una gran inestabilidad que da lugar a la formación de numerosas líneas celulares por no disyunción y pérdida de material cromosómico. Estas pacientes presentan mosaicismos complejos de 4 y 9 líneas celulares respectivamente, como consecuencia de una acumulación de cromosomas isodicéntricos, por un lado, y rotura y pérdida de material por otro. Al igual que los casos anteriores, el cromosoma isodicéntrico comprende dos copias del brazo largo del cromosoma X y dos centrómeros muy próximos entre sí (Fotos 17 y 18). No se ha podido demostrar la inactivación de alguno de estos centrómeros debido a su proximidad. La aparición de estas líneas celulares no puede ser atribuida a un artefacto de la preparación celular ya que implica a cromosomas específicos (al cromosoma X), como se ha podido demostrar en el estudio del cromosoma uno mediante la sonda D1Z5 (Tabla 11).

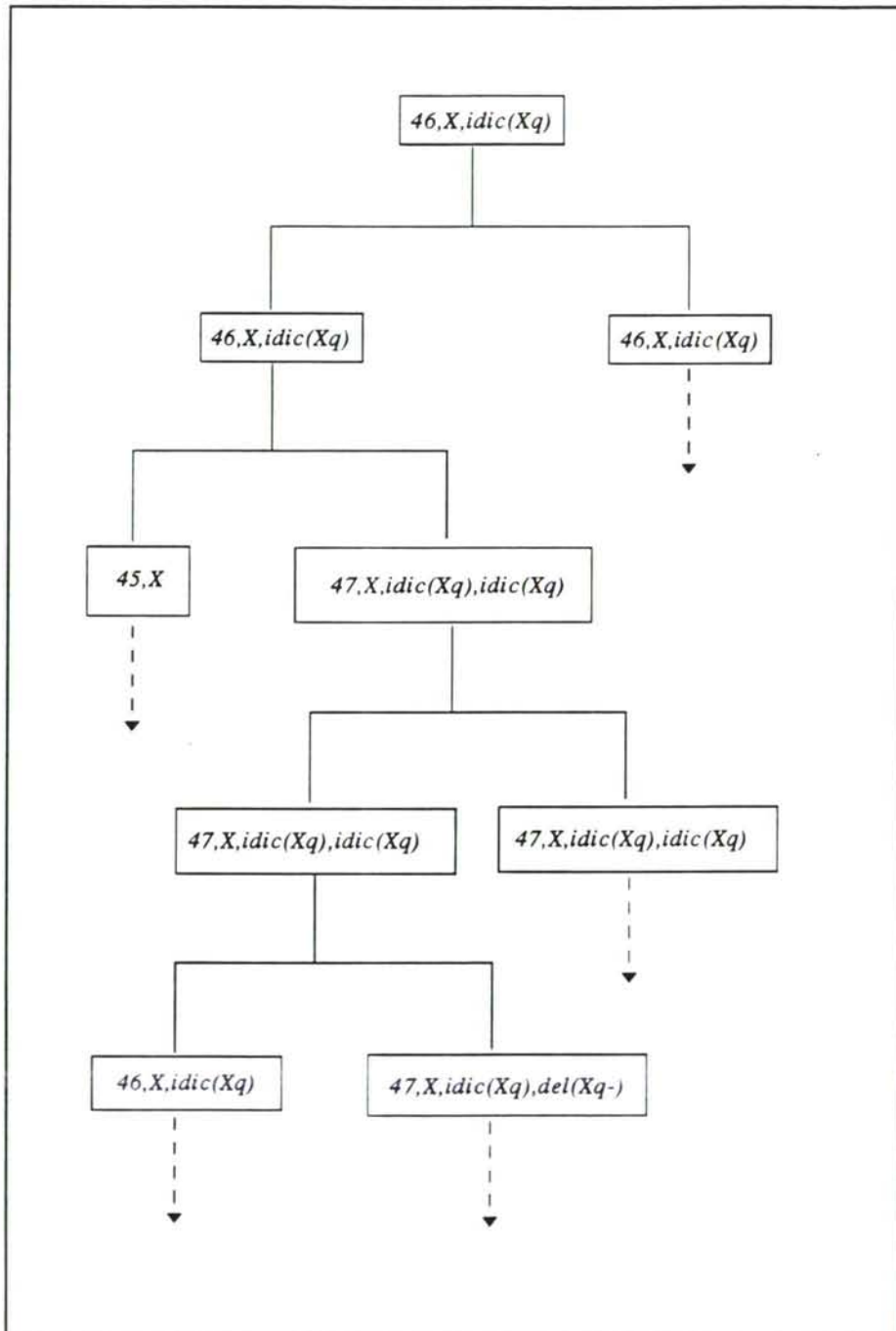
En la *paciente 22* se han encontrado otras líneas celulares más complejas como cromosomas X con tres centrómeros, pero sólo se ha encontrado una metafase por lo que no ha sido considerada como línea celular.

La paciente había sido diagnosticada como 45,X/46,X,i(Xq)/47,X,i(Xq),i(Xq), pasando desapercibido, mediante las técnicas de citogenética clásica, la existencia de otras líneas celulares (en concreto aquellas que aparecen en una proporción baja, alrededor del 1%), así como la naturaleza dicéntrica de los cromosomas. Mediante la técnica de FISH y con la sonda específica para la región centromérica del cromosoma X, hemos puesto de manifiesto la necesidad de aplicar esta técnica para un diagnóstico más preciso.

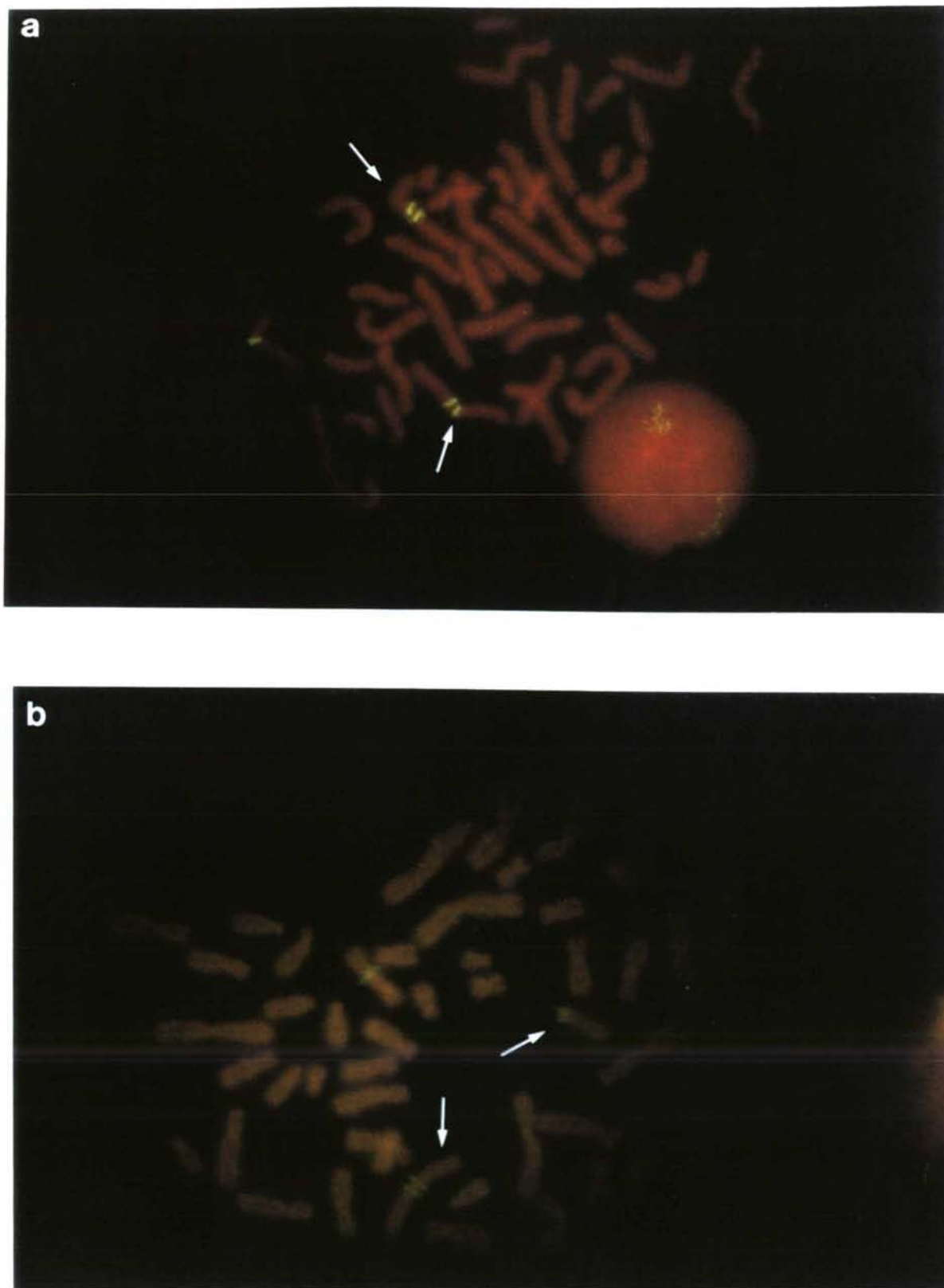


**Ilustr. 21.-** Ejemplo de formación del mosaico complejo en la paciente 22.

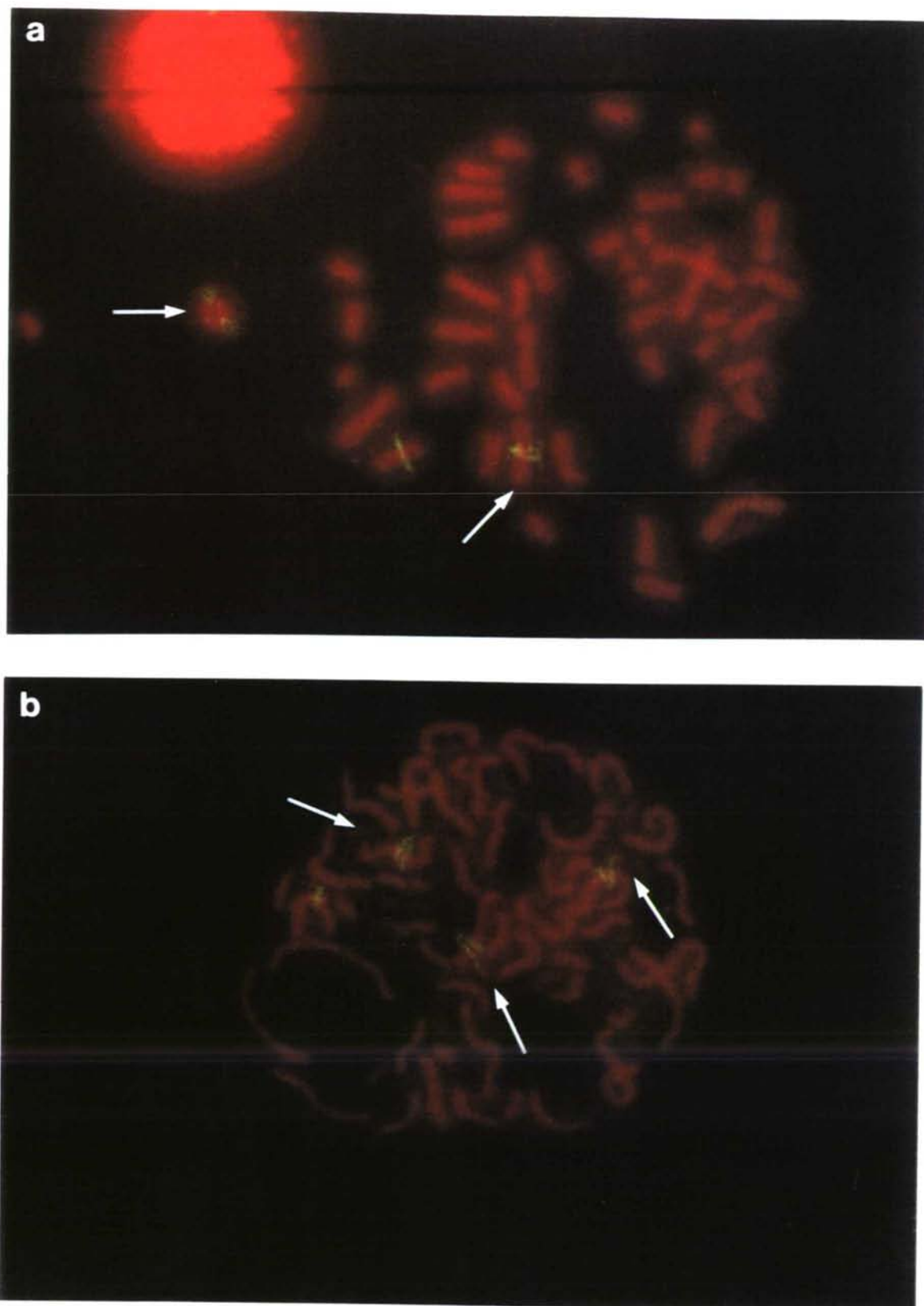




Ilustr. 22.- Ejemplo de formación del mosaico complejo en la paciente 24.

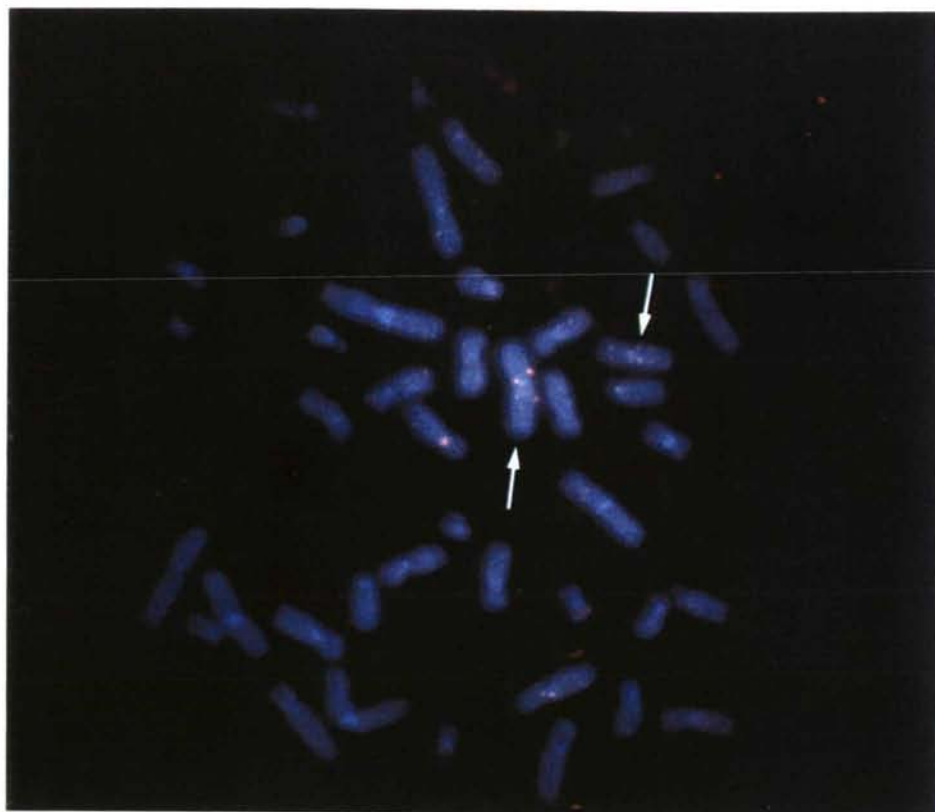


**Foto 17:** a) Metafase 47,X,idic(Xq),idic(Xq) en la paciente 22 mediante FISH (sonda DXZ1). b) Metafase 47,X,idic(Xq),del(X)(p?) en la misma paciente.



**Foto 18:** a) Metafase 47,X,idic(Xq) + r(X) en la paciente 22 mediante FISH (sonda DXZ1). b) Metafase 48,X,idic(Xq),idic(Xq),idic(Xq) en la misma paciente.





**Foto 19:** Hibridación con la sonda XIST mediante FISH que muestra la duplicidad del centro de inactivación en el *idic(Xq)* en la paciente 22.

### 5.3. OBSERVACIÓN DE REESTRUCTURACIONES A NIVEL CENTROMÉRICO

La utilización de la técnica de FISH ha permitido detectar alteraciones estructurales a nivel centromérico mediante la aplicación de la sonda DXZ1 que se une específicamente a la región  $\alpha$ -centromérica del cromosoma X. Esta técnica, además de facilitar el análisis de un mayor número de células (metafasas y núcleos), permite detectar alteraciones estructurales como se ha podido observar en las *pacientes 12, 16, 22 y 24*. En la *paciente 12* se definió un pseudoisocromosoma para el brazo corto que había pasado desapercibido mediante las técnicas de citogenética clásica. En la *paciente 16*, aparte de definir el origen del fragmento cromosómico que aparece en una de las líneas celulares, se definió la existencia de doble región centromérica en dicho fragmento, y lo que había sido diagnosticado como del(Xq12) fue redefinido como idic(Yp<sup>mf</sup>). La variación en el diagnóstico de las *pacientes 22 y 24* ha consistido, además de detectar nuevas líneas celulares, en definir la naturaleza dicéntrica de los isocromosomas presentes en estas pacientes.

Estos isocromosomas dicéntricos para el brazo largo se han visto involucrados en mosaicos complejos de hasta nueve líneas celulares, lo que pone de manifiesto su gran inestabilidad, y explica el origen de las numerosas alteraciones mitóticas que han tenido lugar y que han conllevado a la formación de numerosas líneas celulares. La existencia de los dos centrómeros podría explicar la "facilidad" para las roturas y no disyunciones durante las divisiones mitóticas, originando anillos y fragmentos de diferentes tamaños.

### 5.4. IDENTIFICACIÓN DE PEQUEÑOS FRAGMENTOS DE ORIGEN DESCONOCIDO

Las mujeres con disgenesia gonadal incrementan el riesgo de desarrollo de cáncer en gónadas en un 30% cuando se encuentra presente un cromosoma Y o un fragmento del mismo (Verp y Simpson, 1987). Se cree que uno o más genes del cromosoma Y predisponen a las mujeres con disgenesia gonadal al desarrollo de gonadoblastoma. Aunque todavía la identidad de este gen o genes no ha sido aclarada, sí existe información sobre su localización en el cromosoma Y. Las evidencias implican la porción media de este cromosoma (intervalo 4B y 5) región que incluye el centrómero (Page, 1994) (Ilustr. 4).

Por dos razones se han utilizado sondas y cebadores específicos para los centrómeros de los cromosomas X e Y; por una parte, porque para que un fragmento sea estable necesita obligatoriamente un centrómero, y por otro lado, porque en esta región del cromosoma Y parece encontrarse el gen o los genes responsables de gonadoblastoma.

Existen muy pocos casos de gonadoblastoma en individuos 45,X sin cromosoma Y detectado (Scully, 1970; Bonakdar y Peisner, 1980; Dewhurst y Ferreira, 1982; Pierga y col., 1994). La presencia de mosaicismo del cromosoma Y en el ST puede explicarse como el resultado de una no disyunción postcigótica. Esta posibilidad de pérdida postcigótica está apoyada por el estudio del origen del cromosoma X presente en los casos de ST; en el 80% de los casos su origen es materno (Hassold y col., 1988).

Para comprobar la sensibilidad de la técnica de PCR en diferentes grados de mosaicismo, y sabiendo que, potencialmente se puede detectar una secuencia del cromosoma Y en una dilución del 1:100.000 en ADN de mujer (Maness y col., 1989), se mezcló ADN de hombre y de mujer controles en diferentes proporciones, minimizando el ADN de una mujer Turner mosaico para el cromosoma Y, y se estudió la amplificación del segmento centromérico del cromosoma Y mediante los cebadores Y1, Y2 previa digestión del ADN con la enzima de restricción EcoRI. Obtuvimos una amplificación del fragmento de 170 pb hasta una dilución del 0,1% de ADN de varón en ADN de mujer controles.

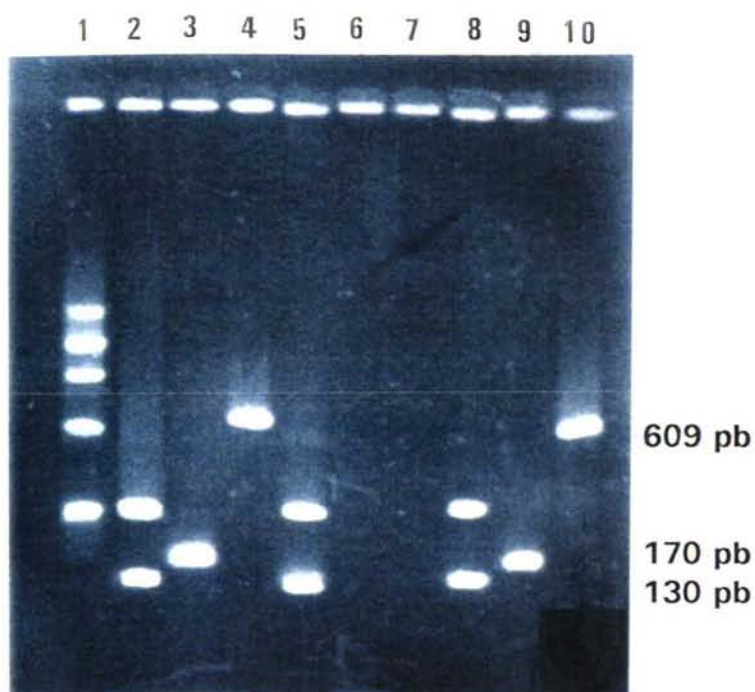
El fragmento de 170 pb amplificado se pudo detectar mediante gel de agarosa incluso en concentraciones tan bajas como 0,01%, lo que corresponde a un total de cerca de 100 pg de ADN de varón en un fondo de ADN femenino. Lo que demuestra la gran sensibilidad de esta técnica incluso en mosaicismos muy bajos.

El estudio molecular mediante PCR con los cebadores Y1, Y2 y XES7, XES2 ha confirmado la existencia de material procedente del cromosoma Y en la *paciente 16*. La señal específica de la región centromérica del cromosoma Y (170 pb) fue detectado sólo en varones control y en la *paciente 16* pero no en el resto de las pacientes (Foto 20), al igual que el fragmento de 609 pb correspondiente al gen SRY. Existen trabajos en los que se pone de manifiesto la ausencia del gen SRY, con desarrollo de fenotipo masculino (Vilain y col., 1994). Los autores concluyen que el desarrollo fenotípico masculino puede ocurrir en ausencia de este gen. Una mutación en un gen autosómico o en un gen ligado al X podrían explicar estos fenotipos.

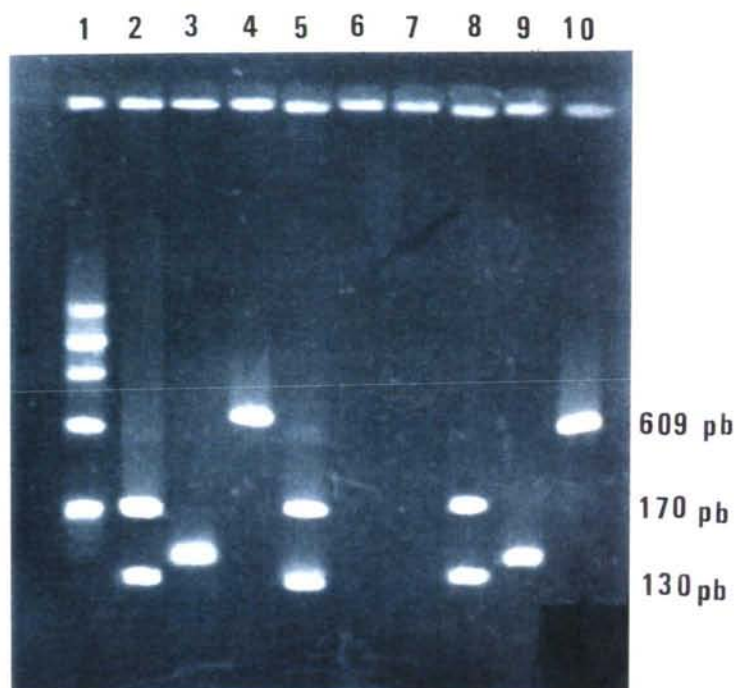
La *paciente 16* había sido diagnosticada inicialmente como 45,X/46,X,del(X)(q?); tras el estudio con FISH y PCR se definió el fragmento como idic(Yp<sup>nf</sup>), siendo indicado la necesidad de un control médico específico como previsión un gonadectomía. Este caso nos indica la necesidad de un correcto cariotipaje y de las consecuencias de un error en el diagnóstico.

En el resto de las pacientes con fragmentos las técnicas de FISH y PCR han demostrado que dichos fragmentos derivaban de un cromosoma X.





**Foto 20:** Análisis de ADN de las pacientes Turner y de varones control por PCR. **Línea 1:** marcador  $\phi$ X174/Hae III. **Líneas 2 y 5:** Fragmento de 130 pb con cebadores X1,X2 en un varón y en una mujer controles. **Línea 8:** El mismo fragmento en la paciente 16. **Líneas 3 y 6:** Fragmento de 170 pb con los cebadores Y1,Y2 en un varón y en una mujer controles. **Línea 9:** El mismo fragmento en la paciente 16. **Líneas 4 y 7:** Fragmento de 609 pb en un varón y en una mujer controles con los cebadores XES7 y XES2. **Línea 10:** El mismo fragmento de 609 pb en la paciente 16 con los mismos cebadores.



**Foto 20:** Análisis de ADN de las pacientes Turner y de varones control por PCR. **Línea 1:** marcador  $\phi$ X174/Hae III. **Líneas 2 y 5:** Fragmento de 130 pb con cebadores X1,X2 en un varón y en una mujer controles. **Línea 8:** El mismo fragmento en la paciente 16. **Líneas 3 y 6:** Fragmento de 170 pb con los cebadores Y1,Y2 en un varón y en una mujer controles. **Línea 9:** El mismo fragmento en la paciente 16. **Líneas 4 y 7:** Fragmento de 609 pb en un varón y en una mujer controles con los cebadores XES7 y XES2. **Línea 10:** El mismo fragmento de 609 pb en la paciente 16 con los mismos cebadores.

## **CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

*Primera:* de las 27 pacientes con síndrome de Turner estudiadas, 17 mostraron diferencias con respecto a su cariotipo inicial:

a) inicialmente, las pacientes definidas como Turner no mosaico eran 13, lo que corresponde a un 48% de la muestra, mediante FISH este porcentaje quedó reducido a un 11%. Sólo en tres pacientes no fue posible detectar una segunda línea celular. Según la Tabla de exclusión de mosaicismo de Hook (1977), y en base al número de metafases analizadas, en estas tres pacientes se ha podido excluir, en sangre periférica, hasta un 2% de mosaicismo, con un grado de confianza del 0,99.

b) el incremento de mosaicismo fue debido principalmente a la aparición de la línea celular 46,XX en un porcentaje del 0,2-1%.

c) se observó una mayor complejidad del mosaicismo debido a la aparición de nuevas líneas celulares. Los mosaicos de cuatro y más líneas celulares se produjeron por la inestabilidad de los cromosomas idic(Xq).

d) se definieron alteraciones a nivel centromérico como la existencia de cromosomas dicéntricos de diferente naturaleza.

e) se identificó la naturaleza de fragmentos cromosómicos.

*Segunda:* los datos obtenidos indican que el mosaicismo en el síndrome de Turner es mucho más común de lo que inicialmente se creía. Ello implica la necesidad de aplicar complementariamente las técnicas citogenéticas y moleculares en el diagnóstico de alteraciones cromosómicas, fundamentalmente para la detección de mosaicismo oculto y en la identificación de pequeños fragmentos cromosómicos.

*Tercera:* los datos obtenidos sugieren que la frecuencia de aparición del cromosoma Y, o un fragmento del mismo, en individuos 45,X es baja.

*Cuarta:* los cromosomas idic(Xq) pueden dar lugar a mosaicos complejos, debido quizás a su gran inestabilidad, consecuencia de la presencia de dos centrómeros.

*Quinta:* el origen mitótico del síndrome fue demostrado en 17 de las 27 pacientes estudiadas. Los datos obtenidos apoyan las hipótesis actuales sobre el origen mitótico del síndrome y de la necesidad de mosaicismo para su supervivencia intrauterina. Los tres casos en los cuales no se pudo detectar mosaicismo no contradicen necesariamente esta hipótesis, ya que la ausencia de mosaicismo en sangre no implica la ausencia de mosaicismo en otros tejidos embrionales o extraembrionales, que no han podido ser estudiados por nosotros.

*Sexta:* el fenotipo del síndrome de Turner es muy similar independientemente del cariotipo. De las alteraciones fenotípicas relacionadas con el ST, sólo hay dos que parecen estar claramente definidas: la deficiencia mental, que sólo aparece en los casos con fragmentos o anillos cromosómicos que han perdido el centro de inactivación; y por otro lado, la talla baja, que aparece en todas las pacientes con ST independientemente de su cariotipo. El resto de las alteraciones asociadas a este síndrome, aunque varía de unas mujeres a otras, son tremendamente similares entre sí independientemente del cariotipo. El estudio de un solo tejido no justifica las diferencias encontradas entre unas pacientes y otras. Las alteraciones fenotípicas dependen no sólo del número, tipo y porcentaje de las líneas celulares, sino también en qué momento del desarrollo embrionario se han originado y en qué tejido se localizan. Por otro lado las dificultades en la detección de mosaicismo explican las discrepancias fenotípicas-genotípicas en estas pacientes.

*Séptima:* la paciente que mejor ha respondido al tratamiento con GH ha sido la paciente con un pseudoisocromosoma dicéntrico para el brazo corto del X. Aunque el porcentaje de la línea 46,X,idic(Xp) es del 4,6%, parece ser suficiente para que siga una curva de crecimiento elevada. Nuestros datos concuerdan con la hipótesis propuesta por Epstein en 1990 según la cual el gen, o los genes responsables de la talla están localizados en la región terminal del brazo corto del cromosoma X.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

ABRUZZO, M.A., MAYER, M. y P.A. JACOBS (1985): Aging and aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.*, **36**: 275-278.

AFFARA, N.A., LAU, Y.F.C., BRIGGS, H., DAVEY, P., JONES, M.H., KHWAJA, O., MITCHELL, M. y C.SARGENT (1994): Report of the first international workshop on Y chromosome mapping 1994. *Cytogenet. Cell Genet.*, **67**:360-380.

AGULNIK, A.I., MITCHELL, M., MATTEI, M.G., BORSANI, G., AVNER, P.A., LERNER, J.L. y C.E.BISHOP (1994): A novel X gene with a widely transcribed Y-linked homologue escapes X-inactivation in mouse and human. *Hum. Mol. Genet.*, **3**(6):879-884.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. y J.D.WATSON (1983): *Mol. Biol. Cell* New York: Garland (ed).

ALDRIDGE, J., KUNKEL, L., BRUNS, G., TANTRAVAHU, U., LALANDE, M., BREWSTER, T., MOREAU, E., WILSON, M., BROMLEY, W., RODERICK, T. y S.LATT (1984): A strategy to reveal High-frequency RFLPs along the human X chromosome. *Am. J. Human. Genet.*, **36**:546-564.

ALEXANDER, D., EHRHARDT, A.A. y J.MONEY (1966): Defective figure drawing, geometric and human, in Turner's syndrome. *J. Nerv. Ment. Dis.*, **152**:161-167.

ANGELL, R.R. (1995): Meiosis I in human oocytes. *Cytogenet. Cell Genet.*, **69**:266-272.

ANSEDE, A.M. (1983): *La subnormalidad en Galicia. Estudio Genético y posibilidades de prevención.* Fundación Pedro Barrie de la Maza. "Colección Medicina Galaica".

APOSTOLOPOULOS, T.D., KYRIAKIDIS, M.K., KITSIOU, S.A., GALLA-VOUMVOURAKI, A.D., TSEZOU, A.N. y P.TOUTOUZAS (1994): 45,X Turner syndrome with normal ovarian function and multiple malformations of the aorta. *Postgrad. Med. J.*, **70**(829):838-840.

ARMSTRONG, S.J., KIRKHAM, A.J. y M.A.HULTEN (1994): XY chromosome behaviour in the germ-line of the human male: a FISH analysis of spatial orientation, chromatin condensation and pairing. *Chromosome. Res.*, **2**(6):445-452.

ASHWORTH, A., RASTAN, S., LOVELL-BADGE, R. y G.KAY (1991): X-chromosome inactivation may explain the difference in viability of XO humans and mice. *Nature*, **351**:406-408.

BACKER, L.C. y J.W.ALLEN (1987): Meiotic origin of aneuploidy: An overview. En *Aneuploidy, Part A: Incidence and Etiology.* Alan R. Liss, Inc. 219-232.

BAKER, B.S., CARPENTER, A.T.C., ESPOSITO, M.S., ESPOSITO, R.E. y L.SANDER (1976): The genetic control of meiosis. *Annu.Rev.Genet.*, **10**:53-134.

BANZAI, M., OMOE, K., ISHIKAWA, H. y A.ENDO (1995): Viability, development and incidence of chromosome anomalies of preimplantation embryos from XO mice. *Cytogenet.Cell Genet.*, **70**:273-277.

BECKER, B., JOSPE, N. y L.A.GOLDSMITH (1994): Melanocytic nevi in Turner syndrome. *Pediatr. Dermatol.*, **11**(2):120-124.

BERGSMAN, D. (1979): *Birth Defects compendium*. The National Foundation-March of Dimes. New York. The Macmillan Press Ltd. Alan R. Liss, Inc.

BERNASCONI, S., LARIZZA, D., BENSO, L., VOLTA, C., VANNELLI, S., MILANI, S., AICARDI, G., BERARDI, R., BORRELLI, P., BOSCHERINI, B. y col. (1994): Turner's syndrome in Italy: familial characteristics, neonatal data, standards for birth weight and for height and weight from infancy to adulthood. *Acta.Paediatr.*, **83**(3):292-298.

BERTA, P., HAWKINS, J.R., SINCLAIR, A.H., TAYLOR, A., GRIFFITHS, B.L., GOODFELLOW, P.N. y M.FELLOUS (1990): Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. *Nature*, **348**:448-450.

BISAT, T., MAY, K., LITWER, S. y B.BROECKER (1993): Y chromosome mosaicism in the gonads, but not in the blood, of a girl with the Turner phenotype and virilized external genitalia. *Clin.Genet.*, **44**(3):142-145.

BOCHKOV, N.P., KULESHOV, N.P., CHEBOTAREV, A.N., ALEKHIN, V.I. y S.A.MIDIAN (1974): Population cytogenetic investigation of newborns in Moscow. *Humangenetik*, **22**:139-152.

BONAKDAR, M.I. y D.B.PEISNER (1980): Gonadoblastoma with a 45,XO karyotype. *Obstet. Gynecol.*, **56**:748-750.

BOND, D.J. y A.C.CHANDLEY (1983): *Aneuploidy*. Oxford. Oxford University press.

BROCKDORFF, N., ASHWORTH, A., KAY, G.F., COOPER, P., SMITH, S., McCABE, V.M., NORRIS, D.P., PENNY, G.D. PATEL, D. y S.RASTAN (1991): Conservation of position and exclusive expression of mouse *Xist* from the inactive X chromosome. *Nature*, **351**:329-331.

BROWDER, L., ERICKSON, C. y W.JEFFERY (1991): *Developmental Biology*. Florida. Saunders College Publishing (ed).

BROWN, C.J. y H.F.WILLARD (1989): Nominactivation of a selectable human X-linked gene that complements a murine temperature-sensitive cell cycle defect. *Am.J.Hum.Genet.*, **45**:592-598.

BROWN, C.J. y H.F.WILLARD (1990): Localization of a gene that escapes inactivation to the X chromosome proximal short arm: Implication for X inactivation. *Am.J.Hum.Genet.*, **46**:273-279.

BROWN,C.J., BALLABIO,A., RUPERT,J.L., LAFRENIERE,R.G. y M.GROMPE (1991a): A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, **349**:38-44.

BROWN,C.J., LA FRENIER,R.J., POWERS,V.E., SEBASTIO,G., BALLABIO,A., PETTIGREW,A.L. y D.H.LEDBETTER (1991b): Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature*, **349**:82-84.

BROWN,C.J, HENDRICH,B.D, RUPERT,J.L., LAFRENIERE,R.G., XING-YIGONG., LAWRENCE,J. y H.F.WILLARD (1992): The human XIST gene: Analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*, **71**(3):527-542.

BROWN,C.J. y H.F.WILLARD (1994): The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature*, **368**:154-156.

BUCKTON,K.E., O'RIORDAN,M.L., RATCLIFFE,S., SLIGHT,J., MITCHELL,M., McBEATH,S., KEAY,A.J., BARR,D. y M.SHORT (1980): A G-banding study of chromosomes in liveborn infants. *Ann.Hum.Genet.*, **43**:227-239.

BURGOYNE,P.S., HOLLAND,K. y R.STEPHENS(1991): Incidence of Numerical Chromosome Anomalies in Human Pregnancy Estimulation from Induced and Spontaneous Abortion Data. *Hum.Reprod.*, **6**(4):555-566.

BUZIN,C.H., MANN,J.R. y J.SINGER-SAM (1994): Quantitative RT-PCR assays show Xist RNA levels are low in mouse female adult tissue, embryos and embryoid bodies. *Development*, **120**(12):3529-3536.

BYRNE,J.L. y K.WARD, (1994): Genetic factors in recurrent abortion. *Clin.Obstet.Gynecol.*, **37**(3):693-704.

CAINE,A., MASON,G., DALY,H.A. y S.M.RICKETTS (1993): An unusual tricentric X chromosome detected prenatally. *Prenat.Diagn.*, **13**(11):1061-1065.

CALLEN,D.F., EYRE,H.J., RINGENBERGS,M.L., FREEMANTLE,C.J., WOODDROFE P. y E.A.HAAN (1991): Chromosomal origin of small ring marker chromosomes in man: characterization by molecular genetics. *Am.J.Hum.Genet.*, **48**:769-782.

CAMARGO,M. y J.CERVENKA (1984): DNA replication and inactivation patterns in structural abnormality of sex chromosomes. *Hum.Genet.*, **67**:37-47.

CARLSON,B.M. (1990): *Embriología básica de Pattern*. México. Interamerica Mcgraw Hill (ed).

CARR,D.H., HAGGAR,R.A. y A.G.HART (1968): Germ cells in the ovaries of OX females infants. *Am.J.Clin.Pathol.*, **49**:521-526.

CASEY,M.D., SEGALL,L.J., STREET,D.R.K. y C.E.BLANK (1966): Sex chromosome abnormalities in two state hospitals for patients requiring special security. *Nature*, **209**:641-642.



- CASPARI,D., BARTELS,I., RAUSKOLB,R., PRANGE,G., OSMERS,R. y B.EIBEN (1994): Discrepant karyotypes after second- and third-trimester combined placentacentesis/amniocentesis. *Prenat.Diagn.*, **14**(7):569-576.
- CATALÁN,J., AUTIO,K., WESSMAN,M., LINDHOLM,C., KNUUTILA,S., SORSA,M. y H. NORPPA (1995): Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenet. Cell Genet.*, **68**:11-16.
- CATTANACH,B.M.A. (1962): XO mice. *Genet.Res.*, **3**:487-490.
- CATTANACH,B.M.A. (1975): Control of chromosome inactivation. *Rev.Genet.*, **9**:1-18.
- CLOSE,H.G, GOONETILLEKE,A.S.R., JACOBS,A. y W.H.PRICE (1968): The incidence of sex chromosomal abnormalities in mentally subnormal males. *Cytogenetics*, **7**:277-285.
- COCO,R. y C.BERGADA (1977): Cytogenetic findings in 125 patients with Turner's syndrome and abnormal karyotypes. *J.Genet.Hum.*, **25**:95-107.
- COHEN,M.M. DAHAN,S. y M. SHAHENS (1975): Cytogenetic evaluation of 500 Jerusalem newborn infants. *Israel J.Med.Sci.*, **11**:969-977.
- COLE,H., HUANG,B., SALBERT,B.A., BROWN,J., HOWARD-PEEBLES,P.N., BLACK,S.H., DORFMANN,A., FEBLES,O.R., STEVENS,C.A. y C.JACKSON-COOK (1994): Mental retardation and Ullrich-Turner syndrome in cases with 45,X/46X,+mar: additional support for the loss of the X-inactivation center hypothesis. *Am.J.Med.Genet.*, **52**(2):136-145.
- COLLINS,A.L., COCKWELL,A.E., JACOBS,P.A. y N.R.DENNIS (1994): A comparison of the clinical and cytogenetic findings in nine patients with a ring (X) cell line and 16 45,X patients. *J.Med.Genet.*, **31**(7):528-533.
- CONNOR,J.M. y S.A.R.LOUGHLIN (1989): Molecular genetics of Turner's syndrome. *Acta.Paediatr.Scan.*, **356**:77-80.
- CONNOR,J.M. y S.A.R.LOUGHLIN (1991): Molecular genetics analysis in Turner's syndrome. En: *Turner Syndrome: Growth promoting therapies*, New York. Ranke M.B. y Rosenfeld R.G. (eds). 3-9.
- COX,A.H. y R.J.MILLER (1974): *The theory of Stochastic Processes*
- CREMER,T., TESIN,D., HOPMAN,A.H. y L.MANUELIDIS (1988): Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by in situ hybridization with chemically modified DNA probes. *Exp.Cell Res.*, **176**:199-220.
- CROLLA,J.A. y J.C.LLERENA (1988): A mosaic 45,X/46,XX,r (?) Karyotype investigated with X and Y centromere specific probes using a non-autoradiographic in situ hybridization technique. *Hum.Genet.*, **81**:81-84.
- CUNNIFF,C., JONES,K.L. y K.BENIRSCHKE (1991): Ovarian dysgenesis in individuals with chromosomal abnormalities. *Hum.Genet.*, **86**:552-556.

- CHANDLEY, A.C. (1987): Aneuploidy: An Overview. En *Aneuploidy, Part A: Incidence and Etiology*, Alan R. Liss Inc (ed). 1-8.
- CHAPELLE, A de la. (1983): Sex chromosomes abnormalities. En *Principles and practice of medical genetics*. Edimburgo. Amery AEH. Rimoin DL (eds). 193-215.
- DANIEL, A., LYONS, N., CASEY, J.H. y L.GRAS (1980): Two dicentric Y isochromosomes, one without the Yqh heterochromatin segment. *Hum.Genet.*, **54**:31-39.
- DANIEL, A., MALAFIEJ, P., PREECE, K., CHIA, N., NELSON, J. y M.SMITH (1994): Identification of marker chromosomes in thirteen patients using FISH probing. *Am.J.Med.Genet.*, **53**(1):8-18.
- DAVIES, K. (1991): The essence of inactivity. *Nature*, **349**:15-16.
- De ALMEIDA, J.C.C., LLERENA, J.C., GOMES, D.M., MARTINS, R.R., JUNG, M., REIS, D.I. y D.G.CUNHA (1985): G-11 Staining in turner's Syndrome with mosaic 45,X/46,X,r(X). *Ann.Genet.*, **28**:37-41.
- DELOOZ, J., VAN-DEN-BERGHE, H., SWILLEN, A., KLECZKOWSKA, A. y J.P.FRYNS (1993): Turner syndrome patients as adults: a study of their cognitive profile, psychosocial functioning and psychopathological findings. *Genet.Couns.*, **4**(3):169-179.
- DEN NIJS, J.L., GONGGRIJP, H.S., AUGUSTINUS, E. y C.H.W.LEEKSMASMA (1985): Hot bands: a simple G-banding method for leukaemic metaphases. *Cancer Genet.Cytogenet.*, **15**:373-374.
- DENNIS, N.R., COLLINS, A.L., CROLLA, J.A., COCKWELL, A.E., FISHER, A.M. y P.A. JACOBS (1993): Three patients with ring (X) chromosomes and a severe phenotype. *J.Med.Genet.*, **30**:482-486.
- DEWHURST, J. y H.P.FERREIRA (1982): Gonadoblastoma in a patient with gonadal dysgenesis without a Y chromosome. *Obstet.Gynecol.*, **59**:247-249.
- DISTECHE, C.M. (1995): Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends.Genet.*, **11**(1):17-22.
- DUTRILLAUX, B. y J.LEJEUNE (1971): Sur un nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C.R.Acad.Sci.[D]*., **272**:2638-2649.
- DUTRILLAUX, B. (1975): Traitment discontinues par le BrdU et coloration par l'acridine orange obtention de marquages R, Q et intermédiaires. *Chromosoma*, **52**:261-273.
- ENDO, A. y T.WATANABE (1988): Interlitter variability in fetal body weight in mouse offspring from continuous overnight, and short-period matings. *Teratology*, **37**:63-67.
- EPSTEIN, C.J.(1986): The consequences of chromosome imbalance: principles, mechanisms and models. New York. Cambridge University Press. 324-343
- EPSTEIN, C.J.(1988): Specificity versus non specificity in the pathogenesis of aneuploid phenotypes. *Am.J.Med.Genet.*, **29**:161-165.



- EPSTEIN,C.J. (1990): Mechanisms leading to the phenotype of Turner Syndrome. En *Turner Syndrome*. New York. Rosenfeld R.G., Grumbach M.M. (ed). 13-25.
- ERICKSON,R.P., ZWINGMAN,T. y A.AO (1993): Gene expression, X-inactivation, and methylation during spermatogenesis: the case of Zfa, Zfx, and Zfy in mice. *Mol.Reprod.Dev.*, **35**(2):114-120.
- ERICKSON,R.P., HUDGINS,L., STONE,J.F., SCHMIDT,S., WILKE,C. y T.W. GLOVER (1995): 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**:163-167.
- EVANS,J.E., HAMERTON,J.L. y A.ROBINSON (1990): *Children and young adults with sex chromosome Aneuploidy*. New York. March of Dimes. Birth Defects Foundation. Original Article Series. **26**(4).
- FISHER,E.M.C., BEER-ROMERO,P., BROWN,L.G., RIDLEY,A., McNEIL,J.A., LAWRENCE,J.B., WILLARD,H.F., BIEBER,F.R. y D.C.PAGE (1990): Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosome: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell*, **61**:1205-1218.
- FITZGERALD,P.H. (1975): A mechanism of X chromosomes aneuploidy in lymphocytes of aging women. *Humangenetik*, **28**: 153-158.
- FITZGERALD,P.H. y M.McEWAN (1977): Total aneuploidy and age-related sex chromosome aneuploidy in cultured lymphocytes of normal men and women. *Humangenetik*, **39**:329-337.
- FITZSIMMONS,J., FANTEL,A. y T.H.SHEPARD (1994): Growth parameters in mid-trimester fetal Turner syndrome. *Early.Hum.Dev.*, **38**(2):121-129.
- FORD,C., JONES,W., POLANI,P.E., DeALMEIDA,J.C. y J.H.BRIGGS (1959): A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*, **1**:711-713
- FORD,C. y S.ROBERT (1983): Displacement of chromosomes in mitosis: A technique for assessing differential chromosome error. *Cytoget.Cell Genet.*, **36**:537,
- FRANCKE,U. y N.OLIVER (1978): Quantitative analysis of high-resolution trypsin-Giemsa bands on human prometaphase chromosomes. *Hum.Genet.*, **45**:137-165.
- FRYNS,J.P., KLECZKOWSKA,A. y H.Van Den BERGHE (1993): Isochromosome Xq in mosaicism with a cell line with two normal X-chromosomes: association with psychomotor retardation and neurological deficit. *Ann.Genet.*, **36**(3):173-175.
- GARTLER,S.M., ANDINA,R.T. y N.GANT (1975): Ontogeny of X chromosome inactivation in the female germ line. *Exp.Cell Res.*, **91**:454-457.
- GEMMILL,R.M., PEARCE-BIRGE,L., BIXENMAN,H., HECHT,B.K. y J.E.ALLANSON (1987): Y chromosome-specific DNA sequences in Turner syndrome mosaicism. *Am.J.Hum.Genet.*, **41**:157-167.
- GIACALONE,J., FRIEDES,J. y U.FRANCKE (1992): A novel GC-rich human macrosatellite VNRT in Xq24 is differentially methylated on active and inactive X chromosomes. *Nat.Genet.*, **1**:137-142.



- GOLDMAN, M.A. (1992): The silence of the X. *Nat. Genet.*, **2**(3):169-170.
- GOTZSCHE, C.O., KRAG-OLSEN, B., NIELSEN, J., SORENSEN, K.E. y B.O. KRISTENSEN (1994): Prevalence of cardiovascular malformations and association with karyotypes in Turner's syndrome. *Arch. Dis. Child.*, **71**(5):433-436.
- GOYANES, V.J. y J.MENDEZ (1981): Karyotyping chromosomes by electron microscopy. Condensation-inhibition of G bands in human and chinese hamster chromosomes by BrdU-Hoechst 33258 treatment. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **4**:45-51.
- GREENLEE, R., HOYME, H., WITTE, M., CROWE, P. y C.WITTE (1993): Developmental disorders of the lymphatic system. *Lymphology*, **26**(4):156-168.
- GROMPE, M., RAO, N., ELDER, F.F.B., CASKEY, C.T. y F.GREENBERG (1992): 45,X/46,X,+r(X) can have a distinct phenotype different from Ullrich-Turner syndrome. *Am.J.Med.Genet.*, **42**:39-34.
- GROPP, A. (1982): Value of an animal model for trisomy. *Virchows Arch [Pathol Anat]*, **395**:117-131.
- GUERQUIN, B. (1993): Syndrome de Turner et grossesse. A propos d'un cas. *Rev.Fr.Gynecol.Obstet.*, **88**(5):342-344.
- GUTTENBACH, M., KOHLER, L. y M.SCHMID (1991): Cytogenetic and molecular characterization of a small ring chromosome in the complex karyotype of a girl with Turner syndrome. *Hum.Genet.* **87**:680-684.
- HAAF, T. y M.SCHMID (1990): Y isochromosome associated with a mosaic karyotype and inactivation of the centromere. *Hum.Genet.*, **85**:486-490.
- HALL, J.G., SYBERT, V.P., WILLIAMSON, R.A., FISHER, N.L. y S.D. REED. (1982): Turner syndrome. *West.J.Med.*, **137**:32-44.
- HAMERTON, J.L., CANNING, N., RAY, M. y S.SMITH (1975): A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. *Clin.Genet.*, **8**:223-243.
- HAMVAS, R., ZINN, A., KEER, J., FISHER, E., BEER-ROMERO, P., BROWN, S. y PAGE, D. (1992): Rps4 maps near the inactivation center on the mouse X chromosome. *Genomics*, **12**(2):363-367.
- HANSMANN, I. (1983): Factors and mechanisms involved in nondisjunction and X-chromosome loss. En: *Cytogenetics of the Mammalian X Chromosome, Part A: Basic Mechanisms of X chromosome Behavior*. New York. Sandberg A.A. Alan R. Liss Inc. (ed).
- HASSOLD, T.J. y P.JACOBS (1984): Trisomy in man. *Annu.Rev.Genet.*, **18**:69-97.
- HASSOLD, T.J., KUMLIN, E., TAKAESU, N. y M.LEPPERT (1985): Determination of the parental origin of sex-chromosome monosomy using restriction fragment length polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet.*, **37**:965-972.
- HASSOLD, T.J., BENHAM, F. y M.LEPPERT (1988): Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am.J.Hum.Genet.*, **42**:534-541.

- HASSOLD, T.J., PETTAY, D., FREEMAN, S.B., GRANTHAM, M. y N.TAKAESU (1991): Molecular studies of nondisjunction in trisomy 16. *J.med.Genet.*, **28**:159-162.
- HASSOLD, T.J., HUNT, P.A. y S.SHERMAN (1993): Trisomy in humans: incidence, origin and etiology. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **3**(3):398-403.
- HEARD, E. y P.AVNER (1994): Role play in X-inactivation. *Hum.Mol.Genet.*, **3**:1481-1485.
- HECHT, F. y B.K.HECHT (1987): Aneuploidy in Humans: Dimensions, Demography, and Dangers of Abnormal Numbers of Chromosomes. En *Aneuploidy, Part A: Incidence and Etiology*. Alan R. Liss, Inc. 9-51.
- HELD, K.R., KERBER, S., KAMINSKY, E., QIAO, H.Z., SINGH, S., GOETZ, P., SEEMANOVA, E. y H.W.GOEDDE (1991): Hypothesis: 45,X Turner Syndrome does not exist. All surviving patients have sex-chromosomal mosaicism. En: *Turner Syndrome: Growth promoting therapies*. Amsterdam. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division). M.B. Ranke, R.G. Rosenfeld (eds).
- HELD, K.R., KERBER, S., KAMINSKY, E., SINGH, S., GOETZ, P., SEEMANOVA, E. y H.W.GOEDDE (1992): Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes?. *Hum.Genet.*, **88**:288-294.
- HELD, K.R. (1993): Turner's syndrome and chromosome Y (comment). *Lancet*, **342**:128-129.
- HENDRICH, B.D., BROWN, C.J. y H.F.WILLARD (1993): Evolutionary conservation of possible functional domains of the human and murine XIST genes. *Hum.Mol.Genet.*, **2**(6):663-672.
- HOOK, E.B. (1977): Exclusion of chromosome mosaicism: tables of 90%, 95%, and 99% confidence limits and comments on use. *Am.J.Hum.Genet.*, **29**:94-97.
- HOOK, E.B. (1983): Perspectives in mutation epidemiology: 3. Contribution of chromosome abnormalities to human morbidity and mortality and some comments upon surveillance of chromosome mutation rates. *Mutat.Res.*, **114**:389-423.
- HOOK, E.B. y D.WARBURTON (1983): The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum.Genet.*, **64**:24-27.
- HOOK, E.B. (1985a): The impact of Aneuploidy upon public health: Mortality and Morbidity associated with human chromosome abnormalities. En *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*, New York. Dellarco VL, Voytek PE, Hollaender A (eds). 7-35.
- HOOK, E.B. (1985b): Maternal age, paternal age, and human chromosome abnormality: Nature, magnitude, etiology and mechanisms of effects. En *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*. New York. Dellarco VL, Voytek PE, Hollaender A (eds). 117-132.
- HOU, J.W., HWU, W.L., TSAI, W.Y., LEE, J.S., WANG, T.R. y H.C.LUE (1993): Cardiovascular disorders in Turner's syndrome and its correlation to karyotype. *J.Formos.Med.Assoc.*, **92**(2):188-189.



HSU, L. Y. F., PACIUC, S., DAVID, K., CRISTIAN, S., MOLOSHOK, R. y K. HIRSCHORN (1978): Number of C-bands of human isochromosome Xq<sub>1</sub> and relation to 45,X mosaicism. *J. med. Gen.*, **15**:222-226.

ISHIKIRIYAMA, S., IAI, M. y Y. TANABE (1993): Lack of X inactivation: loss of one X inactivation center in a case with mos45,X,-21, +der(21)t(X;21)(p21.3;p11.2)/46,X,t(X;21)(p21.3;p11.2). *Am. J. Med. Genet.*, **47**(1):41-44.

JACOBS, P. A., BRITAIN, R. P. y W. F. McCLERMONT (1965): Aggressive behaviour, mental subnormality and the XXY male. *Nature*, **208**:1351.

JACOBS, P. A., MELVILLE, M., RATCLIFFE, S., KEAY, A. J. y J. SYME (1974): A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann. Hum. Genet.*, **37**:359-376.

JACOBS, P. A., BETTS, P. R., COCKWELL, A. E., CROLLA, J. A., MACKENZIE, M. J., ROBINSON, D. O. y S. A. YOUNGS (1990): A cytogenetic and molecular reappraisal of a series of patients with Turner's syndrome. *Ann. J. Genet.*, **54**:209-223.

JOHNSON, V. P., McDONOUGH, P. G., CHEUNG, S. W. y L. SUN (1991): Sex chromosome marker: clinical significance and DNA characterization. *Am. J. Med. Genet.*, **39**:97-101.

JOHNSTON, A. W., FERGUSON-SMITH, M. A., HANDMAKER, S. D., JONES, H. W. y G. S. JONES (1961): The triple-X syndrome. *Br. Med. J.*, **2**:1046-1052.

JOHNSTON, P. G. y B. M. CATTANACH (1981): Controlling elements in the mouse. IV. Evidence of non-random X-inactivation. *Genet. Res.*, **37**:151-160.

JONES, K. L. (1990): *Atlas de Malformaciones Congénitas*. México. Interamericana. McGraw. Hill (ed).

JOSIFEK, K., HAESSING, C. y T. PANTZAR (1991): Evaluation of chromosome banding resolution: a simple guide for laboratory quality assurance. *Appl. Cytogenet.*, **17**:101-104.

JUBERG, R. C. y P. N. MOWREY (1983): Origin of nondisjunction in trisomy 21 syndrome: All studies compiled, parental age analysis, and international comparisons. *Am. J. Med. Genet.*, **16**:111-116.

KAFFE, S., HSU, L. Y. F. y K. HIRSCHHORN (1983): Structural abnormalities of the human X chromosome and their clinical features. En: *Cytogenetics of the mammalian X chromosome. Part B*. New York. Sandberg A. A. Liss (ed). 341-358.

KALOUSEK, D. K. y F. J. DILL (1983): Chromosome mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science*, **221**:661-667.

KALOUSEK, D. K., DILL, F. J., PANTZAR, T. y B. C. MCGILLIVRAY (1987): Confined chromosomal mosaicism in prenatal diagnosis. *Hum. Genet.*, **77**:163-167.

KALOUSEK, D. K., BARRET, J. J. y B. C. MCGILLIVRAY (1989): Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. *Am. J. Genet.*, **44**:338-343.



- KALOUSEK,D.K. (1993): The effect of confined placental mosaicism on development of the human aneuploid conceptus. *Birth.Defects.*, **29**(1):39-51.
- KALOUSEK,D.K. (1994a): Confined placental mosaicism and uniparental disomy. *Funct.Dev.Morphol.*, **4**(2):93-98.
- KALOUSEK,D.K. (1994b): Current topic: confined placental mosaicism and intrauterine fetal development. *Placenta*, **15**(3):219-230.
- KALOUSEK,D.K. y I.BARRETT (1994): Confined placental mosaicism and stillbirth. *Pediatr.Pathol.*, **14**(1):151-159.
- KAY,G.F., PENNY,G.D., PATEL,D., ASHWORTH,A., BROCKDORFF,N. y S.RASTAN (1993): Expression of Xist during mouse development suggest a role in the initiation of X chromosome inactivation. *Cell*, **72**:171-182.
- KEARNS,W.G. y P.L.PEARSON (1994): Detection of chromosomal aberrations in interphase and metaphase cells in prenatal and postnatal studies. *Methods.Mol.Biol.*, **33**:459-476.
- KELLY,T.E., FERGUSON,J.E. y W.GOLDEN (1992): Survival of fetuses with 45,X: An instructive case and an hypothesis. *Am.J.Med.Genet.*, **42**:825-826.
- KENDALL,M.G. y A.STUART (1979): *The advanced Theory of Statistics*, vol 2, 4th ed.
- KHER,A.S., CHATTOPADHYAY,A., DATTA,S., KANADE,S., SREENIVASAN,V.K. y B.A.BHARUCHA (1994): Familial mosaic Turner syndrome [letter]. *Clin.Genet.*, **46**(5):382-383.
- KLINE,J. y Z.STEIN (1985): Environmental causes of aneuploidy: Why so elusive?. En: *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*. New York. Dellarco VL, Voytek PE, Hollaender A (eds).
- KLINEFELTER,H.F., REIFENSTEIN,E.C. y F.ALBRIGHT (1942): Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without aleydigism, and increased secretion of follicle-stimulating hormone (gynecomastia). *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **2**:615-627.
- KOCOVA,M., SIEGEL,S.F., WENGER,S.L., LEE,P.A. y M.TRUCCO (1993): Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA (comment). *Lancet*, **342**:140-143.
- KOCOVA,M., SIEGEL,S.F., NALESNICK,M. y M.TRUCCO (1994): Detection of Y-chromosome sequences in gonadal tissue of patients with Turner's syndrome (45,X) [letter]. *N.Engl.J.Med.*, **331**(10):682-683.
- KOCOVA,M. y M.TRUCCO (1994): Centromere of Y chromosome in Turner's syndrome [letter]. *Lancet*, **343**:925-926.
- KOOPMAN,P., AHSWORTH,A. y R.LOVELL-BADGE (1991): The ZFY gene family in human and mice. *Trends.Genet.*, **7**:132-136.

- KRATZER,P.G. y V.M. CHAPMAN (1981): X chromosome reactivation in oocytes of *Mus caroli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **78**:3093-3097.
- KRAUSS,M.C., TURKSOV,R.N., ATKINS,L., McLAUFGLIN,C., BROWN,L.G. y D.C.PAGE (1987): Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arms of the X chromosome. *N. Engl.J.Med.*, **317**:125-131.
- KUSHNICK,T., IRONS,T.G., WILEY,J.E., GETTING,E.A. y K.W.RAO (1987): 45,X/46,X,r(X) with syndactyly and severe mental retardation. *Am.J.Med.Genet.*, **28**:567-574.
- KUZNETZOVA,T., BARANOV,A., IVASCHENKO,T., SAVITSKY,G.A., LANCEVA,O.E., WANG,M.R., GIOILLANT,M., MALET,P., KASCHEEVA,T., VAKHARLOVSKY,V. y col. (1994): X;Y translocation in a girl with short stature and some features of Turner's syndrome: cytogenetic and molecular studies. *J.Med.Genet.*, **31**(8):649-651.
- LAFRENIERE,R.G. y H.F.WILLARD (1993): Pulsed-field map of Xq13 in the region of the human X inactivation center. *Genomics*, **17**(2):502-506.
- LAFRENIERE,R.G., BROWN,C.J., RIDER,S., CHELLY,J., TAILLON-MILLER,P., CHINAULT,A.C., MONACO,A.P. y H.F. WILLARD (1993): 2.6 Mb YAC contig of the human X inactivation center region in Xq13: physical linkage of the RPS4X, PHKA1, XIST and DXS128E genes. *Hum.Mol.Genet.*, **2**(8):1105-1115.
- LAMBERT, J.L. y J.A.RONDAL (1989): *El mongolismo. El Síndrome de Down*. Barcelona. Biblioteca de Psicología. Editorial Herder.
- LATT,S.A. (1973): Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci. Usa.*, **70**:3395-3399.
- LEJEUNE,J., GAUTIER,M. y R.TURPIN (1959): Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Compt. Rend*, **248**:1721-1722.
- LEPPIG,K.A., BROWN,C.J., BRESSLER,S.L., GUSTASHAW,K., PAGON,R.A., WILLARD,H.F. y C.M.DISTECHE (1993): Mapping of the distal boundary of the X-inactivation center in a rearranged X chromosome from a female expressing XIST. *Hum.Mol.Genet.*, **2**(7):883-887.
- LEWIN,B. (1993): *Genes IV*. Oxford University Press, Reverté, S.A. (ed).
- LIN,C.C., GEDEON,M.M., GRIFFITH,P., SMINK,W.K., NEWTON,D.R., WILKIE,L. y L.M. SEWELL (1976): Chromosome analysis on 930 consecutive newborn children using quinacrine fluorescent banding technique. *Hum.Genet.*, **31**:315-328.
- LIN,C.C., MEYNE,J., SASI,R., BOWEN,P., UNGER,T., TAINAKA,T., HADRO,T.A. y J.J. HOO (1990): Determining the origins and the structural aberrations of small marker chromosomes in two cases of 45,X/46,X,+ mar by use of chromosome specific DNA probes. *A.J.Med.Genet.*, **37**:71-78.
- LINDGREN,V., CHEN,C., BRYKE,C.R., LICHTER,P., PAGE,D.C. y T.YANG-FENG (1992): Cytogenetic Karyotypes. *Hum.Genet.*, **88**:393-398.



- LIPPE, B.M. (1987): Síndrome de Turner. En: *Trastornos del crecimiento*. Barcelona. Hintz R.L., Rosenfeld R.G. Ancora. S.A. (ed)
- LIPPE, B.M. (1991): Turner Syndrome. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **20**(1):121-152.
- LOBACCARO, J.M., LUMBROSO, S., BELON, C., MEDLEJ, R., BERTA, P. y C. SULTAN (1994): Genes du chromosome Y et syndrome de Turner. *Ann. Endocrinol. Paris.*, **54**(5):323-329.
- LOPEZ, L.M., TORRES M.L.C., PABLO, M.J., CERVANTES, P.A., CANTO, C.P., PEREZ, P.G. y A.S. KOFMAN (1993): Detección molecular de secuencias de ADN derivadas del cromosoma Y en pacientes con síndrome de Turner. *Rev. Invest. Clin.*, **45**(3):233-239.
- LUBS, H.A. y F.H. RUDDLE (1970): Chromosomal abnormalities in the human population: Estimation of rates based on New Haven newborn study. *Science (NY)*, **169**:495-497.
- LYON, M.F. (1961): Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus L.*). *Nature*, **190**:372-373.
- LYON, M.F. (1992): Some milestones in the history of X-chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.*, **26**:17-28.
- MACERA, M.J., SHERMAN, J., SHAH, H.O., BLUMBERG, D.L., BUTTICE, L.S., LIN, J.H. y R.S. VERMA (1994): Identification of a non-fluorescent isodicentric Y chromosome by molecular cytogenetic techniques. *Clin. Genet.*, **46**(5):364-367.
- MADLENA, M., SZILAGYI, Z. y G. KESZTHELYI (1994): Turner's syndrome: review of the literature and report of a case. *ASDC. J. Dent. Child.*, **61**(5-6):394-396.
- MAILHES, J.B. y F. MARCHETTI (1994): Chemically-induced aneuploidy in mammalian oocytes. *Mutat. Res.*, **320**(1-2):87-111.
- MANESS, K., HANNING, V., SUMMAR, M., DEV, V.G., PHILLIPS, J.A., BIANCHI, D.W. y U. MULLER (1989): Detection of Y chromosome specific fragments in Turner syndrome subjects using polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Hum. Genet.*, **45**:A82.
- MANGE, E. y A. MANGE (1994): *Basic Human Genetics*. Massachusetts. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, (ed).
- MATTEI, M.G., MATTEI, J.F., VIDAL, I. y col. (1981): Structural anomalies of the X chromosome and inactivation center. *Hum. Genet.* **56**:401-408.
- MAY, K.K., JACOBS, P.A., LEE, M., RADCLIFFE, S., ROBINSON, A., y col., (1990): The parental origin of the extra X chromosome in XXX females. *Am. J. Genet.*, **46**:754-761.
- MAZZANTI, L., NIZZOLI, G., TASSINARI, D., BERGAMASCHI, R., MAGNANI, C., CHIUMELLO, G. y E. CACCIARI (1994): Spontaneous growth and pubertal development in Turner's syndrome with different karyotypes. *Acta. Paediatr.*, **83**(3):299-304.



- McKUSICK, V. A. (1993): *Mendelian inheritance in man*. Baltimore. University Press. The Johns Hopkins University Press.
- McMAHON, A., FOSTEN, M., y M. MONK (1981): Random X chromosome inactivation in female primordial germ cells in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **64**: 251-258.
- MIDRO, A. T., KULIKOWSKI, M., SAWICKA, A., PANASIUK, B. y E. KORSAK (1988): Familial occurrence of isodicentric X chromosomes with different breakpoints. *Clin. Genet.*, **34**:153-160.
- MIGEON, B. R., SHAPIRO, L. J., NORUM, R. A., MOHANDAS, T., AXELMAN, J. y R. L. DABORA (1982): Differential expression of steroid sulphatase locus on active and inactive human X chromosome. *Nature*, **299**:838-840.
- MIGEON, B. R., LUO, S., STASIOWSKI, B. A., JANI, M., AXELMAN, J., VAN-DYKE, D. L., WEISS, L., JACOBS, P. A., YANG-FENG, T. L. y J. E. WILEY (1993): Deficient transcription of XIST from tiny ring X chromosomes in females with severe phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, **90**(24):12025-12029.
- MIGEON, M. R. (1994): X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. *Trends. Genet.*, **10**(7):230-235.
- MIGEON, B. R., LUO, S., JANI, M. y P. JEPPESEN (1994): The severe phenotype of females with tiny ring X chromosomes is associated with inability of these chromosomes to undergo X inactivation. *Am. J. Hum. Genet.*, **55**(3):497-504.
- MIGEON, B. R., DUNN, M. A., THOMAS, G., SCHMECKPEPER, B. J. y S. NAIDU (1995): Studies of X inactivation and isodisomy in twins provide further evidence that the X chromosome is not involved in Rett syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **56**(3):647-653.
- MONEY, J. (1963): Cytogenetic and psychosexual incongruities with a note on space form blindness. *Am. J. Psychiatry*, **119**:820-827.
- MONEY, J. (1968): Cognitive deficits in Turner's Syndrome. En: *Progress in Human Behavior Genetics*. Baltimore, Johns Hopkins Press S.G. Vandenberg (ed).
- MONEY, J. (1973): Turner's Syndrome and parietal lobe functions. *Cortex*, **9**: 385-392.
- MONEY, J. (1993): Specific neuro-cognitive impairments associated with Turner (45,X) and Klinefelter (47,XXY) syndromes: a review. *Soc. Biol.*, Spring-Summer; **40**(1-2):147-151.
- MONK, M. y M. I. HARPER (1979): Sequential x chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. *Nature*, **281**, 311-313.
- MONK, M. y A. McLAREN (1981): X chromosome activity in fetal germ cells of the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **63**:75-84.
- MOORHEAD, P. S., NOWELL, P. C., MELLMAN, W. J., BATTIPS, D. M. y D. A. HUNGERFORD (1960): Chromosome preparations of leukocytes from human peripheral blood. *Exp. Cell Res*, **20**:613-616.

- MUHS, A. y K.LIEBERZ (1993): Anorexia nervosa and Turner's syndrome. *Psychopathology*, **26**(1):29-40.
- MULLIS, K.B. y F.FALOONA. (1987): *Med.Enzymol.*, **155**:335.
- MULLIS, K.B., FALOONA, F., SCHARF, S.J., SAIKI, R.K., HORN, G.T. y H.A. ERLICH. (1986): *Cold.Spring.Harbor.Symp.Quant.Biol.*, **51**:263-273
- MURPHY, D.G., ALLEN, G., HAXBY, J.V., LARGAY, K.A., DALY, E., WHITE, B.J., POWELL, C.M. y M.B.SCHAPIRO (1994): The effects of sex steroids, and the X chromosome, on female brain function: a study of the neuropsychology of adult Turner syndrome. *Neuropsychologia*, **32**(11):1309-1323.
- NAGAFUCHI, S., TAMURA, T., NAKAHORI, Y., TAKANO, K., NIHI, Y., IWATANI, N., KITAO, M., HORI, Y., KONDA, S., HASEGWA, T., NUMABE, H., FUJIEDA, K., TANAKA, T., HIBI, I. y Y.NAKAGOME (1992): The majority of the marker chromosomes in Japanese patients with stigmata of Turner syndrome are derived from Y chromosomes. *Hum.Genet.*, **89**:590-592.
- NAGEL, T., CAMARGO, M., TAGATZ, G., OKAGAKI, T., CERVENKA, J., CAHILL, L., WACHTEL, S., KING, R. y L.B.TWIGGS (1984): Gonadal tumors in patients with gonadal dysgenesis and sex chromosomal rings and fragments. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, **150**:76-82.
- NAVSARIA, D., MATHEWS, T., CONTE, R.A. y R.S.VERMA (1993): Chromosomal anomalies in 1,000 children referred with suspected genetic disorders. *Hum.Hered.*, **43**(3):137-140.
- NIELSEN, J. y I.SILLENSEN (1975): Incidence of chromosome aberrations among 11,148 newborn children. *Humangenetik*, **30**:1-12.
- NIELSEN, J. y M.WOHLERT (1991): Chromosomal abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum.Genet.*, **87**(1): 81-83.
- NOVAK, A.Z., KOKAI, G.K., POPOVIC, V.P., LUDOSKI, M.D. y V.A.JURUKOVSKI (1995): Interphase cytogenetics on paraffin-embedded sections of ovary for detection of genomic constitution in a patient with Turner's syndrome and chromosomal mosaicism. *Hum.Genet.*, **95**(3):293-298.
- OGATA, T., TYLER-SMITH, C., PURVIS-SMITH, S. y G.TURNER (1993): Chromosomal localization of a gene(s) for Turner stigmata on Yp. *J.med.Genet.*, **30**:918-922.
- OMOE, K. y A.ENDO (1993): Growth and development of 39,X mouse embryos at mid-gestation. *Cytogenet.Cell Genet.*, **63**:50-53.
- PAGE, D.C., MOSHER, R., SIMPSON, E.M., FISHER, M.C., MARDON, G. y J.POLLACK (1987): The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*, **51**:1091-1104.
- PAGE, D.C. (1988): Hypothesis: A Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development (supp.)*, **101**:151-155.
- PAGE, D.C. (1994): Y chromosome sequences in Turner's syndrome and risk of gonadoblastoma or virilisation. *Lancet*, **343**:240.



- PAI, G.S. y G.H. THOMAS (1980): A new R-banding technique in clinical cytogenetics. *Hum. Genet.*, **54**:41-45.
- PALMER, C.G. y A. REICHMANN (1976): Chromosomal and clinical findings in 110 females with Turner syndrome. *Hum. Genet.*, **35**:35-49.
- PARK, W.W. (1957): The occurrence of sex chromatin in early human and macaque embryos, *J. Anat.*, **91**:369.
- PARK, E., BAILEY, J.D. y C.A. COWELL (1983): Growth and maturation of patients with Turner syndrome. *Pediatr. Res.*, **17**:1-7.
- PARTSCH, C.J., PANKAU, R., SIPPELL, W.G. y M. TOLKSDORF (1994): Normal growth and normalization of hypergonadotropic hypogonadism in atypical Turner syndrome (45,X/46,XX/47,XXX). Correlation of body height with distribution of cell lines. *Eur. J. Pediatr.*, **153**(6):451-455.
- PERETTI, D., MARASCHIO, P., LAMBIASE, S., LO CURTO, F. y O. ZUFFARDI (1986): Indirect immunofluorescence of inactive centromeres as indicator of centromeric function. *Hum. Genet.*, **73**:12-16.
- PETROVIC, V., NASIOULAS, S., CHOW, C.W., VOULLAIRE, L., SCHIMD, M. y H. DAHL (1992): Minute Y chromosome-derived marker in a child with gonadoblastoma: cytogenetic and DNA studies. *J. Med. Genet.*, **29**:542-546.
- PETTIGREW, A.L., McCABE, E.R., ELDER, F.F.B. y D.H. LEDBETTER (1991): Isocentric X chromosome in a patient with Turner syndrome implications for localization of the X-inactivation center. *Hum. Genet.*, **87**:498-502.
- PIERGA, J.Y., GIACCHETTI, S., VILAIN, E., EXTRA, J.M., BRICE, P., ESPIE, M., MARAGI, J.A., FELLOUS, M. y M. MARTY (1994): Dysgerminoma in a pure 45,X Turner syndrome: report of a case and review of the literature. *Gynecol. Oncol.*, **55**(3 Pt 1):459-464.
- PINKEL, D., STRAUME, T. y J.W. GRAY (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, **83**:2934-2938.
- PODDIGHE, P.J., MOESKER, O., SMEETS, D., AWWAD, B.H., RAMAEKERS, C.S. y A.H.N. HOPMAN (1991): Interphase cytogenetics of hemotological cancer: comparison of classical karyotyping and in situ hybridization using a panel of eleven chromosome specific DNA probes. *Cancer. Res.*, **88**:457-462.
- POLANI, P.E. (1981): Chiasmata, Down syndrome, and nondisjunction. En: *Trisomy 21 (Down syndrome) Research Perspectives*. De la Cruz, Gerald P.S. (eds). University Park Press.
- PRIEUR, M., DUTRILLAUX, B. y J. LEJEUNE (1973): Planches descriptives des chromosomes humains. *Ann. Genet.*, **16**:39-46.
- PROCTER, S.E., WATT, J.L., LLOYD, D.J. y P. DUFFTY (1984): Problems of detecting mosaicism in skin. A case of trisomy 8 mosaicism illustrating the advantages of in situ tissue culture. *Clin. Genet.*, **25**:273-277.



- RACK, K.A., CHELLY, J., GIBBONS, R.J., RIDER, S., BENJAMIN, D., LAFRENIERE, R.G., OSCIER, D., HENDRIKS, R.W., CRAIG, I.W., WILLARD, H.F. y col. (1994): Absence of the XIST gene from late-replicating isodicentric X chromosomes in leukaemia. *Hum.Mol.Genet.*, **3**(7):1053-1059.
- RAJANGAM, S., LINCOLN, S., HEGDE, S., JAYASHREE, MANJUNATH, N.A. y I.M.THOMAS (1993): FISH techniques in a Turner mosaic with ring X chromosome. *Indian.Pediatr.*, **30**(12):1451-1454.
- RANKE, M.B., PFLÜGER, H., ROSENDAHL, W., STUBBE, H., BIERICH, J.R. y F.MAJEWSKI (1983): Turner syndrome: spontaneous growth in 150 cases and review of the literature. *Eur.J.Pediatr.*, **141**:81-88.
- RAPPOLD, G.A. (1993): The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum.Genet.*, **92**(4):315-324.
- RASTAN, S. (1983): Non-random X-chromosome inactivation in mouse X-autosome translocation embryos- location of the inactivation centre. *Embryol.Exp.Morph.*, **78**:1-22.
- RASTAN, S. y E.J.ROBERTSON (1985): X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *Embryol.Exp.Morph.*, **90**:379-388.
- REISS, A.L., FREUND, L., PLOTNICK, L., BAUMGAR DNER, T., GREEN, K., SOZER, A.C., READER, M., BOEHM, C. y M.B.DENCKLA (1993): The effects of X monosomy on brain development: monozygotic twins discordant for Turner's syndrome. *Ann.Neurol.*, **34**(1):95-107.
- REW, D.A. (1994): Significance of aneuploidy. *Br.J.Surg.*, **81**(10):1416-1422.
- RIVERA, H., DOMINGUEZ, M.G., VASQUEZ, A.I., RAMOS, A.L. y R.FRAGOSO (1993): Centromeric association of a microchromosome in a Turner syndrome patient with a pseudodicentric Y. *Hum.Genet.*, **92**(5):522-524.
- ROBINSON, A. (1990): Demography and prevalence of Turner syndrome. En: *Turner Syndrome*. New York. Rosenfeld R.G., Grumbach M.M. Marcel Decker Inc., (ed). 93-100.
- ROBINSON, W.P., BINKERT, F., BERNASCONI, F., LORDA-SANCHEZ, I., WERDER, E.A. y A.A.SCHINZEL (1995): Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gain or loss and possible role of cell selection. *Am.J.Hum.Genet.*, **56**(2):444-451.
- ROBSON, L., JACKSON, J., COWELL, C., SILLENCE, D. y A.SMITH (1994): Novel karyotype in the Ullrich-Turner syndrome--45,X/46,X,r(X)/46,X, dic(X) investigated with fluorescence in situ hybridization. *Am.J.Med.Genet.*, **50**(3):251-254.
- ROPERS, H.H., MIGL, B., ZIMMER, J., FRACCARO, M. y P.P.MARASCHIO (1981): Activity of steroid sulfatase in fibroblasts with numerical and structural X chromosome aberrations. *Hum.Genet.*, **57**:354-356.
- ROSS, J.L., REISS, A.L., FREUND, L., ROELTGEN, D. y G.B.J.R.CUTLER (1993): Neurocognitive function and brain imaging in Turner syndrome-preliminary results. *Horm.Res.*, Suppl **2**:65-69.
- ROVET, J. y L.IRELAND (1994): Behavioral phenotype in children with Turner syndrome. *J.Pediatr.Psychol.*, **19**(6):779-790.

- ROVET, J., SZEKELY, C. y M.N. HOCKENBERRY (1994): Specific arithmetic calculation deficits in children with Turner syndrome. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.*, **16**(6):820-839.
- RUBIN, C.H., WILLIAMS, J.D. y B.B. WANG (1993): Discrepancy in mosaic findings between chorionic villi and amniocytes: a diagnostic dilemma involving 45,X, 46,XY, and 47,XYY cell lines. *Am. J. Med. Genet.*, **46**(4):457-459.
- RUSSELL, L. (1963): *Science*, **140**:976-978.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. y T. MANIATIS (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press (ed).
- SANDLER, L. y F. HECHT (1973): Genetic effects of aneuploidy. *Am. J. Hum. Genet.*, **25**:332-339.
- SCULLY, R.E. (1970): Gonadoblastoma. A review of 74 cases. *Cancer*, **25**:1340-1356.
- SCHIEBEL, K., WEISS, B., WOHRLE, D. y G. RAPPOLD (1993): A human pseudoautosomal gene, ADP/ATP translocase, escapes X-inactivation whereas a homologue on Xq is subject to X-inactivation. *Nat. Genet.*, **3**(1):82-87.
- SCHMID, W., NAEF, E., MÜRSET, G. y A. PRADER (1974): Cytogenetic findings in 89 cases of Turner's syndrome with abnormal karyotypes. *Hum. Genet.*, **24**:93-104.
- SCHNEIDER-GADICKE, A., BEER-ROMERO, P., BROWN, L.G., NUSSBAUM, R. y D.C. PAGE (1989): ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*, **57**:1247-1258.
- SEABRIGHT, M. (1971): A rapid technique for human chromosomes. *Lancet*, **II**:971-972.
- SEASHORE, M.R. (1993): Chromosomal abnormalities in the newborn period. *Semin. Perinatol.*, **17**(5):312-317.
- SERGOVICH, F., VALENTINE, G.H., CHEN, A.T.L., KINCH, R.A.H. y M.S. SMOUT (1969): Chromosome aberrations in 2159 consecutive newborn babies. *N. Engl. J. Med.*, **280**:851-855.
- SHERMAN, S.L., TAKAESU, N., FREEMAN, S.B., GRANTHAM, M., PHILLIPS, C., y col., (1991): Association between reduced recombination and nondisjunction. *Am. J. hum. Genet.*, **49**:608-620.
- SHIMMIN, L.C., CHANG, B.H. y W.H. LI (1994): Contrasting rates of nucleotide substitution in the X-linked and Y-linked zinc finger genes. *J. Mol. Evol.*, **39**(6):569-578.
- SIMONI, G. y M. SIRCHIA (1994): Confined placental mosaicism. *Prenatal Diagnosis*, **14**:1185-1189.
- SINCLAIR, A., BERTA, P., PALMER, M., HAWKINS, J., GRIFFITHS, B., SMITH, M., FOSTER, J., FRISCHAUF, A., LOVELL BADGE, R. y P. GOODFELLOW (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**:240-244.



SINGH,R.P. y D.H.CARR (1966): The anatomy and histology of OX human embryos and fetuses. *Anat.Rec.*, **155**:369-383.

SLIM,R., LEVILLIERS,J., LUDECKE,H., CLAUSSEN,U., NGUYEN,V.C., GOUGH,N.M., HORSTHEMKE,B. y C.PETIT (1993): A human pseudoautosomal gene encodes the ANT3 ADP/ATP translocase and escapes X-inactivation. *Genomics*, **16**(1):26-33.

SOLARI,A. (1994): *Sex chromosomes and Sex Determination in vertebrates*. Florida. C.R.C. Press Inc. (ed).

STAYTON,C.L., DABOVIC,B., GULISANO,M., GECZ,J., BROCCOLI,V., GIOVANAZZI,S., BOSSOLASCO,M., MONACO,L., RASTAN,S., BONCINELLI,E. y col. (1994): Cloning and characterization of a new human Xq13 gene, encoding a putative helicase. *Hum.Mol.Genet.*, **3**(11):1957-1964.

STEWART,J.S.S. y A.R.SANDERSON (1960): Fertility and oligophrenia in an apparent triple-X female. *Lancet*, **2**:21-23.

STRATAKIS,C.A. y O.M.RENNERT (1994): Turner Syndrome: Molecular and Cytogenetics, Dysmorphology, Endocrine, and Other Clinical Manifestations and their Management. *Endocrinologist*, **4**(6):442-453.

SUMNER,A.T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterocromating. *Exp.Cell Res.*, **75**:304-306.

SWANSON,C.P., MERZ,T. y W.J.YOUNG (1981): Variation: Nature and consequences of altered chromosomal structure. En: *Cytogenetics, the chromosome in division, inheritance and evolution*. USA. Prentice-Hall,Inc Englewood Cliff (eds).

SWILLEN,A., FRYNS,J.P., KLECZKOWSKA,A., MASSA,G., VANDERSCHUEREN-LODEWEYCKX,M. y H.VAN DEN BERGHE (1993): Intelligence, behaviour and psychosocial development in Turner syndrome. A cross-sectional study of 50 pre-adolescent and adolescent girls (4-20 years). *Genet.Couns.*, **4**(1):7-18.

SYLVEN,L., MAGNUSSON,C., HAGENFELDT,K. y B.VON SCHOULTZ (1993): Life with Turner's syndrome. A psychosocial report from 22 middle-aged women [comment]. *Acta.Endocrinol.Copenh.*, **129**(3):201-206.

TANAKA,Y., SASAKI,Y., TACHIBANA,K., MAESAKA,H., IMAIZUMI,K., NISHIHIRA,H. y NISHI,T. (1994): Gonadal mixed germ cell tumor combined with a large hemangiomatous lesion in a patient with Turner's syndrome and 45,X/46,X, +mar karyotype. *Arch.Pathol.Lab.Med.*, **118**(11):1135-1138.

TAN,S.S., WILLIAMS,E.A. y P.P.L.TAN (1993): X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo. *Nat.Genet.*, **3**,170-174.

TEMPLE,C.M y R.A.CARNEY (1993): Intellectual functioning of children with Turner syndrome: a comparison of behavioural phenotypes. *Dev.Med.Child.Neurol.*, **35**(8):691-698.



THADDEUS,E., FERGUSON,J. y W.GOLDEN (1992): Survival of fetuses with 45,X. *Am.J.Med.Genetics.*, **42**:825-826.

THERMAN,E. y K.PATAU (1974) Abnormal X chromosomes in man: origin, behavior and effects. *Human.Genetic.*, **25**:1-16.

THERMAN,E., SARTO,G. y K.PATAU (1974): Center for Barr body condensation on the proximal part of the human Xq: a hypothesis. *Chromosoma*, **44**:361-366.

THERMAN,E., SARTO,G.E., DISTECHE,C. y C.DENNISTON (1976): A possible active segment on the inactive human X chromosome. *Chromosoma*, **59**:137-145.

THERMAN,E., SARTO,G.E., PALMER,C.G., KALLIO,H. y C.DENNISTON (1979): Position of the human X inactivation center on Xq. *Hum.Genet.*, **50**:59-64.

THERMAN,E. (1983): Mechanisms through which abnormal X-chromosome constitutions affect the phenotype. En: *Cytogenetics of the mammalian X chromosome, part B: Chromosome anomalies and their clinical manifestations*. New York. Sanberg A.A. Liss (ed). 159-173.

THERMAN,E. y G.E.SARTO (1983): Inactivation center on the human X chromosome. En: *Cytogenetics of the mammalian X chromosome, part A: Basic mechanisms of X chromosome behavior*. New York. Sandberg A.A. Liss (ed).

THERMAN,E. y B.SUSMAN (1990): The similarity of the phenotypic effects caused by Xp and Xq deletions in the human female: A hypothesis. *Hum.Genet.*, **85**:175-183.

THERMAN,E., LAXOVA,R. y B.SUSMAN (1990): The critical region on the human Xq. *Hum.Genet.*, **85**,455-461.

THERMAN,E. y M.SUSMAN (1993): *Human Chromosomes Structure, Behavior, and Effects*. New York. Springer-Verlag (ed).

THOMPSON,H., MELNYK,J. y F.HECHT (1967): Reproduction and meiosis in XYY. *Lancet*, **2**:831,

TURNER,H.H. (1938): A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology*, **23**:566-574.

VAN DYKE,D.L., WIKTOR,A., ROBERTSON,J.R. y L.WEISS (1991): Mental retardation in Turner syndrome. *J.Pediatr.*, **118**:415-417.

VAN DYKE,D.L., WIKTOR,A., PALMER,C.G., MILLER,D.A., WITT,M., BABU,V.R., WORSHAN,M.J. y col.,(1992): Ullrich-Turner syndrome with a small ring X chromosome and presence of mental retardation. *Am.Med.Genet.*, **43**:996-1005.

VERMA,R.S. y H.A.LUBS (1975): A simple R banding technic. *Am.J.Hum. Genet*, **27**:110-117.

VERMA,R. y A.BABU (1994): *Human Chromosomes. Manual of basic techniques*. New York. Northeastern Graphic Services Inc. Pennington y Sheinis (ed).

- VERP, M.S y J.L.SIMPSON (1987): Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **25**:191-218.
- VIEGAS PEQUIROT, E. y B.DUTRILLAUX (1978): Une méthode simple pour obtenir des prophases et des prometaphases. *Ann. Genet.*, **21**:122-125.
- VILAIN, E., LeFIBLEC, B., MORICHON DELVALLEZ, N., BRAUNER, R., DOMMERGUES, M., DUMEZ, Y., JAUBERT, F., BOUCEKINE, C., McELREAVEY, K., VEKEMANS, M. y M.FELLOUS (1994): SRY-negative XX fetus with complete male phenotype. *Lancet*, **343**(22):240-241.
- WABER, D.P. (1979): Neuropsychological aspects of Turner's syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.*, **21**:58-70.
- WALZER, S. y P.S.GERALD (1977): Population cytogenetics. En: *Studies in Humans*. London. Hook E.B. Porter I.H. (eds). Academic Press, 45-61.
- WANDALL, A. (1995): Clonal origin of partially inactivated centromeres in a stable dicentric chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.*, **69**:193-195.
- WARBURTON, D. (1985): Genetic factors influencing aneuploidy frequency. En: *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*. New York. Dellarco VL, Voytek PE, Hollaender A (ed).
- WARBURTON, P.E., GREIG, G.M., HAAF, T. y H.F.WILLARD (1991): PCR Amplification of chromosome specific Alpha Satellite DNA: Definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis. *Hum. Genet.*, **11**(2): 324-333.
- WATANABE, M., ZINN, A.R., PAGE, D.C. y T.NISHIMOTO (1993): Functional equivalence of human X- and Y-encoded isoforms of ribosomal protein S4 consistent with a role in Turner syndrome. *Nat. Genet.*, **4**(3):268-271.
- WAYE, J. y H.F.WILLARD (1985): Chromosome-specific  $\alpha$ satellite DNA: nucleotide sequences of the 2.0kb repeat from the human X chromosome. *Nucleic Acids Res.*, **13**:2731-2743.
- WEIL, D., PORTNOI, M.F., LEVILLIERS, J., WANG, I., MATHIEU, M., TAILLEMITE, J.L., MEIER, M., BOUDAILLIEZ, B. y C.PETIT (1993): A 45,X male with an X;Y translocation: implications for the mapping of the genes responsible for Turner syndrome and X-linked chondrodysplasia punctata. *Hum. Mol. Genet.*, **2**(11):1853-1856.
- WELBORN, J.L. y R.WELBORN (1993a): Quantitative determination of banding resolution for G-banded chromosomes. *Appl. Cytogenet.*, **19**:57-59.
- WELBORN, J.L. y R.WELBORN (1993b): Banding resolution of human chromosomes: A method of accuracy and simplicity. *Am. J. Med. Genet.*, **47**:1180-1183.
- WEVRICK, R. y H.F. WILLARD (1989): Long-range organization of tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromeres of human chromosomes: high frequency array. Length polymorphism and meiotic stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, **86**:9394-9398.



- WILLARD,H.F. y J.S. WAYE (1987a): Chromosome specific subsets of human satellite DNA: Analysis of sequence divergence within an ascantal pentameric repeat. *J.Mol.Evol.*, **25**:207-214.
- WILLARD,H.F. y J.S. WAYE (1987b): Hierarchical orden in chromosome specific human alpha satellite DNA. *Trend.Genet.*, **3**:192-198.
- WILLIAMS,J.K. (1994): Behavioral characteristics of children with Turner syndrome and children with learning disabilities. *West.J.Nurs.Res.*, **16**(1):26-39.
- WITT,M. y R.ERICKSON (1989): A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Hum.Genet.*, **82**:271-274.
- WITT,M. y R.ERICKSON (1991): A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction (erratum). *Hum.Genet.*, **86**:540.
- WITT,M., MICHALCZAK,K., LATOS BIELENSKA,A., JARUZELSKA,J., KUCZORA,I. y M.LOPEZ (1993): An improved, non isotopic method of screening cell from patients with abnormalities of sexual differentiation for Y chromosomal DNA content. *J.Med.Genet.*, **30**:304-307.
- WOLFE,J., DARLING,S.M., ERICKSON,R.P., CRAIG,I.W., BUCKLE,V.J., RIGBY,P., WILLARD,H.F. y P.N.GOODFELLOW (1985): Isolation and characterization of an aliphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome. *J.Mol.Biol.*, **182**:477-485.
- WOLFF,D.J., BROWN,C.J., SCHWARTZ,S., DUNCAN,A.M., SURTI,U. y H.F.WILLARD (1994): Small marker X chromosomes lack the X inactivation center: implications for karyotype/phenotype correlations. *Am.J.Hum.Genet.*, **55**(1):87-95.
- WOLMAN,S.R., DAVID,R. y G.KOO (1985): The "Y" chromosome in the female phenotype. En *The Y chromosome, Part A: basic characteristics of the Y chromosome*. New York. Sandberg A.A. Alan R. Liss,Inc (ed).
- WU,J., SALIDO,E.C., YEN,P.H., MOHANDAS,T.K., HENG,H.H., TSUI,L.C., PARK,J., CHAPMAN,V.M. y L.J.SHAPIRO (1994a): The murine Xe169 gene escapes X-inactivation like its human homologue. *Nat.Genet.*, **7**(4):491-496.
- WU,J., ELLISON,J., SALIDO,E.C., YEN,P.H., MOHANDAS,T.K. y L.J.SHAPIRO (1994b): Isolation and characterization of XE169, a novel human gene that escapes X-inactivation. *Hum.Mol.Genet.*, **3**(1):153-160.
- YING,K.L. y E.J.IVES (1971): Mitotic behavior of a human dicentric Y chromosome. *Cytogenetics*, **10**:208-218.
- YUNIS,J.J. (1976): High resolution of human chromosomes. *Science*, **191**:1268-1270.
- ZAKHAROV,A.F. y N.A.EGOLINA (1972): Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed diffentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*, **38**:341-365.



ZENGER HAIN, J.L., WIKTOR, A., GOLDMAN, J., VAN DYKE, D.L. y L. WEISS (1993): X-inactivation pattern in an Ullrich-Turner syndrome patient with a small ring X and normal intelligence. *Am. J. Med. Genet.*, **47**(4):490-493.

ZINN, A., PAGE, D.C. y E.M.C. FISHER (1993): Turner syndrome: The case of missing sex chromosome. *Trends. Genet.*, **9**(3):90-93.

**ANEXOS**

## ILUSTRACIONES, TABLAS Y FOTOGRAFÍAS.

### INTRODUCCIÓN:

**Ilustr. 1.-** Modelo de desplazamiento cromosómico de Ford y Roberts (1983).

**Ilustr. 2.-** Rasgos fenotípicos más comunes en el ST según Stratakis y Rennert (1994).

**Ilustr. 3.-** Gametogénesis en el ST y en una mujer 46,XX, tomando como base los datos aportados por Carlson (1990).

**Ilustr. 4.-** Esquema del cromosoma Y donde se indica la posible localización de los genes que predisponen al gonadoblastoma y la localización de los genes SRY y RPS4Y.

**Ilustr. 5.-** Esquema que ilustra los linajes celulares en el embrión temprano de ratón (Carlson, 1990).

**Ilustr. 6.-** Genes que escapan a la inactivación del cromosoma X según Disteche (1995).

**Tabla. 1.-** Aneuploidía en recién nacidos.

**Tabla. 2.-** Incidencia de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en recién nacidos.

### MÉTODO

**Ilustr. 7.-** Genes ligados al cromosoma X que tienen su homólogo en el cromosoma Y.

**Ilustr. 8.-** Esquema general de FISH indicando las sondas aplicadas y su localización en el cromosoma X.

**Ilustr. 9.-** Esquema de los diferentes tipos de alteraciones estructurales del cromosoma X y su correspondiente localización de las señales fluorescentes en la Hibridación *in situ*.

**Ilustr. 10.-** Esquema general de PCR.

**Tabla 3.** Variaciones de la forma común del ST según la sonda aplicada. Cada asterisco representa una señal.

**Tabla 4.-** Esquema general de Hibridación *in situ*.

**Tabla 5.-** Incubaciones según el tipo de marcaje de la sonda.

### RESULTADOS

**Tabla 6.-** Cariotipo inicial de cada paciente y cariotipo final por Hibridación *in situ*. Número de metafases analizadas y porcentaje de cada una de las líneas celulares.

**Tabla 7.-** Cariotipo y rasgos fenotípicos de los sujetos estudiados, agrupados según el cariotipo por FISH.



**Tabla 8.-** Clasificación de los cariotipos según las técnicas empleadas.

**Tabla 9.-** Comparación de la constitución cromosómica de la muestra estudiada con los cinco principales estudios citogenéticos realizados.

**Tabla 10.-** Constitución cromosómica de la muestra estudiada comparada con el estudio molecular realizado por Connor y Loughlin en 1991

**Tabla 11.-** Estudio metafásico en individuos control y en la paciente 22 mediante la sonda D1Z5

## DISCUSIÓN

**Ilustr. 11.-** Mosaicismo cromosómico de origen mitótico por pérdida anafásica del cromosoma X.

**Ilustr. 12.-** Mosaicismo por no disyunción cromosómica en la primera división mitótica.

**Ilustr. 13.-** Mosaicismo por no disyunción cromosómica en la segunda división mitótica.

**Ilustr. 14.-** Formación del cromosoma pseu-idicYp.

**Ilustr. 15.-** Formación de isocromosomas por división centromérica transversal.

**Ilustr. 16.-** Diferentes derivados del cromosoma X en el Síndrome de Turner.

**Ilustr. 17.-** Formación del mosaico 45,X/46,XX/47,XXX por no disyunción en la segunda división mitótica.

**Ilustr. 18.-** Formación del mosaico 45,X/47,XXX/47,XX,del(X)(p?) por no disyunción y posterior delección del brazo corto del cromosoma X.

**Ilustr. 19.-** Formación del pseudic(Xp) por rotura y ensamblaje de cromátides hermanas.

**Ilustr. 20.-** Mosaico de tres líneas celulares en la paciente 12 por formación de un cromosoma pseudic (Xp) y pérdida de fragmentos acéntricos.

**Ilustr. 21.-** Ejemplo de formación del mosaico complejo en la paciente 24.

**Ilustr. 22.-** Ejemplo de formación del mosaico complejo en la paciente 22.

**Foto 1:** Hibridación de la sonda DXZ1 mediante FISH que indica la presencia de un sólo cromosoma X.

**Foto 2:** a) Metafase 47,XXX de la paciente 4 obtenida mediante bandas G. b) Cariotipo de la misma célula.

**Foto 3:** a) Hibridación con la sonda DZX1 mediante FISH que indica la presencia de tres cromosomas X en una de las metafases de la paciente 4. b) Presencia de una y tres señales en núcleos, que indican un mosaico 45,X/47,XXX en la misma paciente.

**Foto 4:** a) Metafase obtenida mediante bandas G que indica la presencia de un fragmento cromosómico. b) Cariotipo de la misma célula.

**Foto 5:** a) Hibridación de la sonda DZX1 mediante FISH que indica el origen del fragmento cromosómico (46,X + frag(X)). b) La misma metafase.

**Foto 6:** a) Hibridación de la sonda DZX1 mediante FISH que indica el origen del fragmento cromosómico (46,X + frag(X)). b) La misma metafase.

## TÉRMINOS CLÍNICOS

**Acromicria:** Estado que se caracteriza por hipoplasia de las extremidades del esqueleto: nariz, maxilares, dedos de las manos y de los pies.

**Azoospermia:** Falta o deficiencia de formación de espermatozoides en el semen.

**Clinodactilia:** Desviación o curvatura lateral o medial permanente, de uno o más dedos.

**Coartación:** Estado de estrechez o contracción. **de aorta** Malformación localizada, caracterizada por deformidad de la túnica media de la aorta, que causa estenosis, generalmente grave, de la luz del vaso.

**Coxa vara:** Alteración de la cadera por deformidad de la cabeza del fémur.

**Cripto-:** (*Krypto*). Prefijo que significa oculto, encubierto.

**Cubitus valgus:** Deformidad del codo, en la cual se desvía la línea media del cuerpo en la extensión.

**Disgenesia:** Desarrollo defectuoso.

**Displasia:** Anomalía del desarrollo; alteración de la forma, dimensiones y organización de las células adultas.

**Epicanto:** Pliegue vertical de la piel a cada lado de la nariz, que a veces cubre el ángulo interno del ojo.

**Escoliosis:** Apreciable desviación lateral de la línea vertical, normalmente recta, del raquis.

**Eunucoide:** Deficiencia de los testículos o de la secreción testicular.

**Genu valgum:** Deformidad de la rodilla. Pierna en forma de X.

**Gingival:** Perteneciente o relativo a las encías.

**Gonadoblastoma:** Neoplasia gonadal. Crecimiento tisular incontrolado y progresivo.

**Hipertelorismo:** Aumento excesivo de la distancia entre dos órganos o partes.

**Hipogonadismo:** Los ovarios no funcionan en la pubertad.

**Hipotesterismo:** Falta o deficiencia de formación de la hormona testosterona.

**Hipoplasia:** Desarrollo incompleto o defectuoso de un órgano o tejido.

**Linfedema:** Edema crónico, unilateral o bilateral, de las extremidades, causado por acumulación de líquido intestinal como resultado de estasis de la linfa, secundaria a obstrucción de los vasos linfáticos o a trastornos de los ganglios linfáticos.

**Megacolon:** Colon anormalmente grande o dilatado.

**Micrognatia:** Disminución anormal o indebida del tamaño de las mandíbulas.

**Nevus:** Malformación circunscrita estable de la piel y ocasionalmente de la mucosa oral, que no se debe a causas externas.

**Oligospermia:** Deficiencia del número de espermatozoides en el semen.

**Osteoporosis:** Reducción en la cantidad de masa ósea, que lleva a fracturas fácilmente tras un pequeño trauma.

**Palpebral:** Perteneciente o relativo al párpado.

**Prolapso:** Caída o acción de colgar de una parte o una víscera.

***Pterygium colli:*** Estructura en forma de ala. Alteración congénita en la que un pliegue grueso de piel se extiende desde la región mastoidea hacia el acromion sobre la superficie lateral del cuello.

**Ptosis:** Prolapso de un órgano o de una parte. 2. Caída del párpado superior por parálisis del tercer nervio o de la inervación simpática.

**Retrognatía:** Retrusión del maxilar inferior.



TABLA DE EXCLUSIÓN DE MOSAICISMO SEGÚN HOOK, 1977

Porcentaje de mosaicismo excluido con un grado de confianza del 0,90 0,95 y 0,99 según el número de células analizadas y si tienen el mismo cariotipo.

(n)	Grado de confianza			(n)	Grado de confianza		
	0,90	0,95	0,99		0,90	0,95	0,99
< 4	....	....	....	36	7%	8%	13%
5	38%	....	....	37	7%	8%	12%
6	32%	41%	....	38	6%	8%	12%
7	29%	35%	....	39	6%	8%	12%
8	26%	32%	46%	40	6%	8%	11%
9	23%	29%	41%	41	6%	8%	11%
10	21%	26%	37%	42	6%	7%	11%
11	19%	24%	35%	43	6%	7%	11%
12	18%	23%	32%	44	6%	7%	10%
13	17%	21%	30%	45	5%	7%	10%
14	16%	20%	29%	46	5%	7%	10%
15	15%	19%	27%	47	5%	7%	10%
16	14%	18%	26%	48	5%	7%	10%
17	13%	17%	24%	49	5%	6%	9%
18	13%	16%	23%	50-55	5%	6%	9%
19	12%	15%	22%	56	5%	6%	8%
20	11%	14%	21%	57-58	4%	6%	8%
21	11%	14%	20%	59-63	4%	5%	8%
22	10%	13%	19%	64-73	4%	5%	7%
23	10%	13%	19%	74	4%	4%	7%
24	10%	12%	18%	75	4%	4%	6%
25	9%	12%	17%	76-89	3%	4%	6%
26	9%	11%	17%	90-98	3%	4%	5%
27	9%	11%	16%	99-112	3%	3%	5%
28	8%	11%	16%	113	3%	3%	4%
29	8%	10%	15%	114-148	2%	3%	4%
30	8%	10%	15%	149-151	2%	2%	4%
31	8%	10%	14%	152-227	2%	2%	3%
32	7%	9%	14%	228-229	2%	2%	2%
33	7%	9%	14%	230-298	1%	2%	2%
34	7%	9%	13%	299-458	1%	1%	2%
35	7%	9%	13%	> 459	1%	1%	1%

**Nota:** Si n=número de metafases analizadas, el grado de mosaicismo que podemos considerar excluido, dado un grado de confianza límite, se encuentra en la columna correspondiente. Por ejemplo, si el número de metafases contadas es de 52, el grado de mosaicismo excluido, con un nivel de confianza del 95%, es del 6%.

Concentración de ADN de dos sujetos control para determinar el grado de mosaicismo oculto que se puede detectar mediante PCR

	ADN varón	ADN mujer	TOTAL
100%	100 ng	--	100 ng
90%	90 ng	10 ng	"
80%	80 ng	20 ng	"
70%	70 ng	30 ng	"
60%	60 ng	40 ng	"
50%	50 ng	50 ng	100 ng
40%	40 ng	60 ng	"
30%	30 ng	70 ng	"
20%	20 ng	80 ng	"
10%	10 ng	90 ng	100 ng
9%	9 ng	91 ng	"
8%	8 ng	92 ng	"
7%	7 ng	93 ng	"
6%	6 ng	94 ng	"
5%	5 ng	95 ng	100 ng
4%	4 ng	96 ng	"
3%	3 ng	97 ng	"
2%	2 ng	98 ng	"
1%	1 ng	99 ng	100 ng
0,9%	0,9 ng	99,1 ng	"
0,8%	0,8 ng	99,2 ng	"
0,7%	0,7 ng	99,3 ng	"
0,6%	0,6 ng	99,4 ng	"
0,5%	0,5 ng	99,5 ng	100 ng
0,4%	0,4 ng	99,6 ng	"
0,3%	0,3 ng	99,7 ng	"
0,2%	0,2 ng	99,8 ng	"
0,1%	0,1 ng	99,9 ng	100 ng
0,01%	0,01 ng	99,99 ng	100 ng



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Servicio de Bibliotecas



1700744345