



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**CORRELACIÓN FENOTIPO-CARIOTIPO Y
DETERMINACIÓN DEL RIESGO REPRODUCTIVO EN
MUJERES CON MOSAICISMO DEL CROMOSOMA "X"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS**

P R E S E N T A:

MARÍA DEL ROCÍO BÁEZ REYES

DIRECTORES:

**DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAIAR
DRA. ROSA ISELA ÁLVAREZ GONZÁLEZ**



MEXICO, D.F.

JUNIO 2011.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 12:00 horas del día 20 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Correlación fenotipo-cariotipo y determinación del riesgo reproductivo en mujeres con mosaicismos del cromosoma X

Presentada por el alumno:

<u>Báez</u>	<u>Reyes</u>	<u>María del Rocío</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	0	9	9	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis



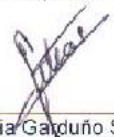
Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar



Dra. Rosa Isela Alvarez González



Dra. Ethel Awilda García Latorre



Dra. Leticia Galdano Siciliano



Dr. Adán Valadares Salgado



Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Manuel Jesús Piñón López





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 14 del mes junio del año 2011, el (la) que suscribe Ma. del Rocío Báez Reyes alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B070995, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar y de la Dra. Rosa Isela Álvarez González y ceden los derechos del trabajo intitulado “Correlación fenotipo-cariotipo y determinación del riesgo reproductivo en mujeres con mosaicismo del cromosoma X”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: eduardo.madrigal@lycos.com isela.alvarez@gmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



María del Rocío Báez Reyes



Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar
Director de tesis



Dra. Rosa Isela Álvarez González
Directora de tesis

Micronuclei Induced by Imipramine and Desipramine in Mice: A Subchronic Study

Eduardo Madrigal-Bujaidar¹, Eduardo Osiris Madrigal-Santillán^{1,2}, Isela Alvarez-Gonzalez¹, Rocío Baez¹ and Pilar Marquez¹

¹Genetics Laboratory, National School of Biological Sciences, I.P.N., ²Pharmacology Laboratory, School of Medicine, ICSA-UAEH, and ³National Institute of Perinatology, Mexico

(Received April 24, 2008; Accepted June 4, 2008)

Abstract. Depression is a common disease that may cause severe damage to human health. Imipramine (IMI) and desipramine (DES) are medicaments used for treatment, yet studies on their genotoxic potential have given controversial results. Therefore, we designed the present assay to determine their effect as inducers of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPE) and micronucleated normochromatic erythrocytes (MNNE) in mice. The study was carried out in animals administered daily with the compounds for 4 weeks, and the determination of micronuclei was done each week. We also evaluated the bone marrow cytotoxicity induced by the chemicals. Besides, the same determinations were carried out in the following 4 consecutive weeks, but in this period the animals were not treated with the tested compounds. Our results showed a significant increase in both MNPE and MNNE induced by both compounds from the first week of administration. At the fourth week, IMI increased three times the control level, while the effect of DES was about seven times such level. In the second, 4-week phase, we observed a reduction in the rate of micronuclei approaching the control level. We also detected a bone marrow-mitotic division decrease by the evaluated chemicals. Our results point to the need for cautiousness in the clinical use of the compounds as well as for testing the effect in patients under treatment.

Depression is a common disorder which may affect 1 out of 10 individuals during their life-time, giving rise to serious health and socio-economic problems [1,2]. The disease can be caused by various endogenous and exogenous factors, and it is characterized by irritability, insomnia, fatigue, psychomotor and concentration alterations in addition to a suicidal tendency [3]. The extent of clinical damage as well as its socio-economic importance has favoured the use of a number of drugs such as the tricyclic antidepressants which are agents that, besides acting against depression, have shown pharmacological effects in the treatment of enuresis, anxiety, bulimia, anorexia, alcoholism, attention-deficit hyperactive disorder and neuralgia [3–5].

Tricyclic drugs are secondary or tertiary amines with a common core consisting of two aromatic rings fused with a seven-atom ring which may include a nitrogen heteroatom. Imipramine (IMI) is a tertiary amine that is readily demethylated *in vivo* to the corresponding secondary amine, desipramine (DES), which is also pharmacologically active [6] (fig. 1). These two medicaments have been used for more than 40 years, and, thus, their therapeutic efficacy and secondary effects are well known.

With respect to the genotoxic potential of IMI, several *in vitro* studies have been published as have a few others using *in vivo* models [1,7–12]. The authors have evaluated genetic, chromosomal and DNA breaking parameters and they have reported controversial results. In regard to DES, a

conclusion about its genotoxicity is even more difficult because studies on the matter have been far more limited [1]. In a previous report, we determined a significant, dose-dependent increase in the rate of sister chromatid exchanges in mice administered orally with 7–60 mg/kg of IMI, and with 2–60 mg/kg of DES [4]. Moreover, a study in mouse bone marrow using the above-mentioned doses showed a significant increase in the frequency of structural chromosomal aberrations when the animals were administered orally with both compounds [13]. Interestingly, most studies published to date on the genotoxic capacity of both drugs have been made using an acute approach; however, pharmacological treatments may take various months. In light of this information and of the heterogeneous results obtained so far, we designed the present investigation to determine whether a daily administration of the drugs in mice for 4 weeks produces an increase in the rate of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPE) and/or of micronucleated normochromatic erythrocytes (MNNE), and also to verify if such treatment may induce bone marrow cytotoxicity. Moreover, we investigated whether elimination of the chemicals in the 4 subsequent weeks induces a genotoxic recovery.

Materials and Methods

Chemicals and animals. The following compounds were purchased from Sigma Chemicals (Mexico City, Mexico): IMI, DES (with a purity of 98%), methyl methanesulfonate (MMS), methanol and Giemsa stain. Sodium chloride, potassium chloride and sodium hydroxide were purchased from J.T. Baker (Mexico City, Mexico).

The experiment was made in 2-month-old male mice (CD-1), weighing 25 ± 1 g, obtained from CENID-Microbiology, Department

Author for correspondence: Eduardo Madrigal-Bujaidar, Genetics Laboratory, National School of Biological Sciences, I.P.N., Carpio y Plan de Ayala, Sta. Tomás México D.F. cp 11340, México (fax +55 53 96 35 03, e-mail eduardo.madrigal@lycos.com).

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Genética del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y en el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Perinatología, bajo la dirección del Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar y de la Dra. Rosa Isela Álvarez González

Dedicatoria:

A todos aquellos que de una forma desinteresada
me han apoyado en este momento de mi vida.

Agradecimientos:

Al Instituto Politécnico Nacional, formador de investigadores al servicio de la ciencia.

A la Dra. Ethel A. García Latorre, por su apoyo inestimable.

Al Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar y Dra. Rosa Isela Álvarez González, directores del presente trabajo.

A Guadalupe Razo Aguilera, no sólo por su apoyo y colaboración durante la realización de este trabajo, sino también por su amistad.

A mi madre por su tolerancia y cariño.

A mi padre[†] que no deja de mostrarme su presencia.

A Carlos Antonio y “Nala” al mostrarme su afecto y comprensión.

A mi hermano Juan Carlos por su colaboración y estímulo.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE	8
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 DESARROLLO DE LAS GÓNADAS	16
1.1.1 Migración de las células germinales hacia las gónadas	17
1.1.2 Determinación genética del sexo	19
1.1.3 Diferenciación gonadal	19
1.1.4 Diferenciación del ovario	21
1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS	23
1.2.1 Cromosomas	23
1.2.2 Mitosis	25
1.2.3 Meiosis	27
1.3 CROMOSOMA “X”	30
1.3.1 Biología del cromosoma X	30
1.3.2 Cromatina X y regulación de la inactivación del cromosoma X	30
1.4 ABERRACIONES CROMOSÓMICAS	40
1.4.1 Cariotipo	40
1.4.2 Tipos de bandas cromosómicas para análisis	41
1.5 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS	42
1.5.1 Aneuploidias	43
1.5.2 Mosaicismo del cromosoma X	44
1.6 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES	45
1.7 REPERCUSIONES CLÍNICAS	47
1.8 JUSTIFICACIÓN	50
1.9 HIPÓTESIS	52
1.10 OBJETIVO GENERAL	54
1.11 OBJETIVOS PARTICULARES	54
2. MATERIAL Y MÉTODOS	55
2.1 VALORACIÓN CLÍNICA	56
2.2 PROCEDIMIENTO DE AMNIOCENTESIS GENÉTICA	56

	Página
2.3 CULTIVO DE AMNIOCITOS	58
2.4 COSECHA <i>IN SITU</i> PARA OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS	58
2.5 TÉCNICA DE TINCIÓN Y ANÁLISIS DE BANDAS G	59
2.6 HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> POR FLUORESCENCIA	59
2.7 CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	60
2.8 MOSAICOS A ESTUDIAR	62
2.9 PROTOCOLO DE ESTUDIO PARA LAS PACIENTES	63
2.10 CRITERIOS	64
2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
3. RESULTADOS	65
4. DISCUSIÓN	90
5. CONCLUSIONES	93
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS.

		Página.
Figura 1	Diferenciación Gonadal	20
Figura 2	Migración al Ovario	23
Figura 3	Ciclos de cromosomas en mitosis y meiosis	29
Figura 4	Resumen de la expresión de genes desde el cromosoma X inactivo	40
Figura 5	Esquema de no disyunción y afectación de las líneas celulares	45
Figura 6	Realización de la amniocentesis citogenética	57
Figura 7	Hibridación in situ por Fluorecencia	60
Figura 8	Causas más frecuentes de consulta de las mujeres con mosaico del X	69
Figura 9	Frecuencia de mosaicismos de cromosoma X	69
Figura 10	Imagen de FISH de linfocitos en interfase para una señal	70
Figura 11	Imagen de FISH de linfocitos en interfase para dos señales	70
Figura 12	Imagen de FISH de linfocitos en interfase para tres señales	71
Figura 13	Imagen de FISH de linfocitos en interfase para cuatro señales	71
Figura 14	Presentación del mosaicismo de cromosoma X por edad	75
Figura 15	Ultrasonido de útero hipoplásico	77
Figura 16	Rayos X con medio de contraste que muestra obstrucción de tubas uterinas	77
Figura 17	Ultrasonido de riñón con nefritis	78
Figura 18	Imagen por ureterografía renal de un doble sistema colector	78
Figura 19	Asimetría dental	79
Figura 20	Densitometría ósea alterada a nivel de trocantes de ambos fémures	80
Figura 21	Óbito con defecto del tubo neural	84
Figura 22	Óbito con defecto del tubo neural	84
Figura 23	Recién nacido con microtia atresia	85
Figura 24	Recién nacido con microtia atresia	85
Figura 25	Recién nacido con Síndrome de Down	86
Figura 26	Propuesta de flujograma de atención a pacientes con mosaicismo	95

ÍNDICE DE TABLAS.

		Página
Tabla 1	Datos generales de pacientes con mosaicismo. Parte 1 de 3	66
Tabla 1 con.	Datos generales de pacientes con mosaicismo. Parte 2 de 3	67
Tabla 1 con.	Datos generales de pacientes con mosaicismo. Parte 3 de 3	68
Tabla 2	Pacientes con mosaicismo 45,X/46,XX	72
Tabla 3	Pacientes con mosaicismo 46,XX/47,XXX	73
Tabla 4	Pacientes con mosaicismo 45,XX/46,XX/47,XXX	74
Tabla 5	Pacientes con mosaicismos poco frecuentes	75
Tabla 6	Pacientes con mosaicismo del X detectadas por amenorrea	79
Tabla 7	Resultados de las valoraciones por diferentes servicios	80
Tabla 8	Evolución de las pacientes con mosaicismo del X que tomaron la decisión de embarazarse nuevamente	81
Tabla 9	Pacientes con mosaicismo del X detectadas por esterilidad	82
Tabla 10	Casos con antecedentes de Defecto Congénito	83
Tabla 11	Análisis estadístico por motivo de consulta: Aborto	86
Tabla 12	Análisis estadístico por motivo de consulta: Amenorrea	87
Tabla 13	Análisis estadístico por motivo de consulta: Esterilidad	87
Tabla 14	Análisis estadístico de mujeres de hijos con alteraciones cromosómicas	88
Tabla 15	Análisis estadístico de mujeres de hijos con defecto congénito	88
Tabla 16	Análisis estadístico por motivo de consulta: Abortos e hijos con defectos	89
Tabla 17	Análisis estadístico por motivo de consulta: Todos los casos	89

ABREVIATURAS.

AG	Amniocentesis genética.
CC	Cardiopatía congénita.
Cxs	Complicaciones.
DC	Defecto congénito.
DS	Desviación estándar.
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
GTG	Bandas G, con tripsina y Giemsa.
HAEC	Células epiteliales amnióticas humanas.
LA	Líquido amniótico.
RCIU	Restricción del crecimiento intrauterino.
SD	Síndrome de Down.
VACTER	Asociación entre vertebras, ano imperforado, atresia esofágica y alteración renal o radial.

RESUMEN

Se calcula una frecuencia del 11% de anormalidades citogenéticas en los pacientes con problemas de la reproducción, entre los que se incluyen los mosaicos de cromosomas sexuales. En las mujeres, estas alteraciones con 2 o 3 líneas celulares: 45,X/46,XX ó 45,X/46,XX/47,XXX cursan con fenotipos físicos y reproductivos variables, así también las líneas celulares 46,XX/47,XXX ; 46,XX/47,XXX/48,XXXX ó 47,XXX/48,XXXX que hasta el momento no se han estudiado adecuadamente. A todas estas variantes se les puede englobar con el nombre de Mosaicos del cromosoma "X". Este mismo ha sido reportado por algunos autores con desarrollo sexual anormal, pérdidas gestacionales o recién nacidos con cromosopatías o hijos con defectos congénitos.

El objetivo de este trabajo fue conocer en una muestra de mujeres mexicanas la frecuencia del mosaicismo del cromosoma "X" y correlacionarlo con alteraciones de la reproducción. A la vez se consideró: 1) Determinar cual es la principal causa de consulta en los mosaicismos de cromosoma "X"; 2) Conocer cual es el mosaico de cromosoma "X" más frecuente; 3) Establecer la correlación de Bandas GTG con FISH; 4) Descartar la presencia del cromosoma Y por medio de FISH; 5) Establecer la correlación fenotipo-cariotipo en cada caso 6) Analizar las posibilidades de riesgo para su descendencia 7) Establecer un flujograma de estudio para estas pacientes.

Se atendieron a las parejas que acudieron con alteraciones de la reproducción a la consulta de Genética del Instituto Nacional de Perinatología, realizándoles la historia clínica genética, el árbol genealógico y exploración física teniendo como criterios de selección: 1) amenorrea primaria o secundaria 2) esterilidad primaria o secundaria 3) pérdida gestacional recurrente 4) hijo(s) previo(s) con defecto(s) congénito(s) 5) hijo(s) previo(s) con cromosopatía 6) falla ovárica prematura. A las parejas que reunieron los requisitos se les realizó el cariotipo en sangre periférica con Bandas GTG (con Tripsina y Giemsa) con la técnica de Moorhead modificada, para análisis tanto numérico como estructural con una resolución de 450 bandas. Se analizaron 100 células en metafase por bandas GTG y 500 células en interfase por la técnica de FISH (hibridación *in situ* con fluorescencia) con la sonda cen X/cen Y, por cada caso.

Se ingresaron al protocolo de estudio a 87 mujeres que fueron detectadas con el mosaicismo, con edad mínima de 19 años y máxima de 44 años, encontrándose como causa más frecuente para acudir a la consulta: 1) aborto recurrente (56), 2) amenorrea (12), 3) esterilidad (7), 4) hijo con defectos congénitos (7) y 5) aborto e hijo(s) con defectos congénitos, encontrando que el mosaico de cromosoma "X" más frecuente fue: 45,X/46,XX/47,XXX(37); 45,X/46,XX(29) y 46,XX/47,XXX(19); 45,X/46,XX/47,XXX/48,XXXX(1) y 46,XX/47,XXX/48,XXXX(1). No se encontraron secuencias del Y en ninguna las muestras analizadas. Se les dio el resultado y bajo consentimiento informado se inició el protocolo de estudio integral. Les fue realizada valoración por cardiología, oftalmología, estomatología y sicología, así como la realización del perfil hormonal, ultrasonido pélvico y renal y en caso necesario la urografía excretora y la histerosalpingografía.

Las conclusiones fueron: 1) El mosaicismo de cromosoma "X" es una alteración que hasta el momento no se había estudiado en forma integral. 2) La causa más frecuente de consulta de estas pacientes es el aborto recurrente. 3) El mosaico que más se presenta son las líneas: 45,X/46,XX/47,XXX. 4) No se encontraron secuencias del "Y", en ninguna paciente. 5) Estas mujeres pueden presentar alteraciones fenotípicas a nivel reproductivo. 6) El riesgo para la descendencia es variable. 7) Es importante el ingreso de estas pacientes a un protocolo de estudio multidisciplinario e interdisciplinario. 8) En caso de embarazo posterior es de gran importancia el seguimiento hasta su resolución, así como la realización de estudios de diagnóstico prenatal y seguimiento del recién nacido. Además se propone un esquema de flujo para la atención de las pacientes.

ABSTRACT

Is calculated a frequency of 11% of cytogenetic abnormalities in patients with reproductive problems, in which are included the sexual chromosomal mosaics. In women this alterations with 2 or 3 cellular lines: 45, X/46, XX or 45, X/46, XX/47, XXX enrolled with physic phenotypes and variable reproductive, also the cellular lines 46,XX/47,XXX; 46,XX/47,XXX/48,XXXX or 47,XXX/48,XXXX that had not been correctly studied until this moment. All this variants can be named as Mosaics from the "X" chromosome. This one has been reported by some authors with abnormal sexual development, pregnancy loses, newborns with chromosomal diseases or sons with congenital defects.

The objective of this research was to know in a sample of Mexican women the chromosome "X" mosaic frequency and correlation it with other reproductive alterations. At the same time was considered: 1) Determine which is the main cause for query in chromosome "X" mosaics. 2) Know which is the most frequent chromosome "X" mosaic. 3) Establish the correlation of GTG bands with FISH. 4) Discard the presence of "Y" chromosome by FISH. 5) Establish the phenotype-karyotype correlation in each case. 6) Establish a flowchart research for these patients.

The couples with reproductive alterations who went to query in Genetics from the Instituto Nacional de Perinatología were attended, making their clinic genetic history, their family tree and physical examination having as selection criteria: 1) Primary or secondary amenorrhea. 2) Primary or secondary sterility. 3) Recurrent pregnancy loss. 4) Previous son(s) with congenital defects. 5) Previous son(s) with chromosomal disease. 6) Premature ovarian failure. The karyotype in peripheral blood with GTG Bands (with Trypsin and Giemsa) had been made in couples with the requirements, with the Moorhead modified technique, for numerical and structural analysis with a 450 band resolution. We analyzed 100 metaphase by GTG bands and 500 interfase cells by FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) with cen X/cen Y probe, for patient.

87 women with the mosaic detected got into the research protocol, between 19 and 44 years old, finding as the most frequent causes for query: 1) Recurrent abortion(56). 2) Amenorrhea (12). 3) Sterility (7). 4) Son with pregnancy defects (7) and 5) Abortion and son(s) with pregnancy defects, finding that the most frequent chromosome "X" mosaic was: 45,X/46,XX/47,XXX(37); 45,X/46,XX(29) and 46,XX/47,XXX(19); 45,X/46,XX/47,XXX/48;XXXX(1) and 46,XX/47,XXX/48,XXXX(1). Sequences in the chromosome Y were not found in any of the analyzed samples. The results were given to the patients and under informed consent the integral protocol of research started. An evaluation from cardiology, ophthalmology, stomatology and psychology was made to the patients, as the making of a hormonal profile, pelvic and renal ultrasound and in case of being necessary an excretory urography and a hysterosalpingography.

The results were: 1) This alteration has not been integrally studied, 2) The most frequent cause of query is the recurrent abort, 3) The mosaic with most appearance is 45,X/46,XX/47,XXX, 4) Sequences of Y were not found, 5) These women could present phenotypic alterations in a reproductive level, 6) The risk for the offspring is variable, 7) Is important the entry to a multidisciplinary and interdisciplinary research protocol of these patients, 8) In case of posterior pregnancy is of great importance the follow until its resolution, also the making of pregnancy diagnosis studies and follow of the newborn. In addition is proposed a flow scheme for the patients' attention.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

Uno de los eventos de mayor trascendencia biológica es la reproducción humana; sin embargo existen muchas implicaciones psicológicas, sociales y culturales que enfrenta la pareja cuando presenta alguna alteración de dicha función.

Los factores genéticos explican el 33% de los trastornos de la reproducción (amenorrea primaria o secundaria, infertilidad primaria o secundaria y esterilidad primaria o secundaria), de los cuales una tercera parte tienen origen cromosómico. ⁽¹⁾ En México se calcula una frecuencia del 11% de anomalías cromosómicas en los pacientes con trastornos reproductivos, entre los que se incluyen las alteraciones de los cromosomas sexuales. ⁽¹⁶⁾

Los productos de la concepción con aneuploidías como el Síndrome de Turner con cariotipo 45,X terminan en aborto en el 99% de las ocasiones, ⁽²⁾ mientras que algunas de sus variantes en mosaico sobreviven, cursando con fenotipos variables y se asocian posteriormente en su descendencia con aborto recurrente o hijos con defectos o cromosopatías. En el estudio de pacientes que cursan con esterilidad, estas variantes corresponden al 38% de los casos. ⁽³⁾

1.1 DESARROLLO DE LAS GÓNADAS.

El desarrollo del sistema genital es una parte de la diferenciación sexual general de un individuo. La determinación del sexo comienza en la fecundación, cuando un cromosoma Y o un cromosoma X adicional se unen al cromosoma X que ya existe en el óvulo. Aunque el sexo genético del embrión se fija en el momento de la fecundación, el

fenotipo viene a manifestarse hacia la séptima semana del desarrollo. Antes de ese momento, el principal indicador morfológico del sexo del embrión es la presencia o ausencia de la cromatina sexual (corpúsculo de Barr) en la mujer y este corpúsculo es el resultado de la inactivación de uno de los cromosomas X. Durante esta etapa de indiferenciación desde el punto de vista morfológico del desarrollo sexual, los futuros gametos migran hacia los primordios gonadales desde el saco vitelino. ⁽³⁾

Se ha considerado que la diferenciación fenotípica del género comienza con las gónadas; sin embargo, investigaciones recientes han demostrado diferencias sexuales desde la implantación del embrión. Previo a la esta etapa los embriones masculinos y femeninos son distinguibles desde el punto de vista antigénico, esto sugiere diferencias en la expresión de genes y avanza en virtud de las influencias similares en la diferenciación de los genitales externos y por último en el desarrollo de las características sexuales secundarias completan los sucesos que constituyen el proceso general de diferenciación sexual; así también, tiene lugar la diferenciación sexual de cerebro, la cual influye en el comportamiento de cada individuo. ^(7,13)

1.1.1. MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES HACIA LAS GÓNADAS.

Las células germinales primordiales, precursoras de los gametos que son reconocibles más precozmente, tienen su origen fuera de las gónadas y migran hacia ellas durante el desarrollo embrionario temprano. Las células germinales humanas se reconocen fácilmente 24 días después de la fecundación en la hoja endodérmica del saco vitelino gracias a su tamaño y su elevado contenido de la enzima fosfatasa alcalina. Las

células germinales salen del saco vitelino y pasan al epitelio del intestino posterior; desde allí migran a través del mesenterio dorsal hasta alcanzar los primordios de las gónadas, en donde cerca de 4000 células primordiales entran en las gónadas primitivas. Las células germinales primordiales extraviadas que se alojan en localizaciones extragonadales por lo general mueren, pero si sobreviven pueden dar lugar a teratomas.

Se sugiere que las primeras etapas de la migración de las células germinales primordiales hacia las gónadas son posibles gracias a movimientos ameboides activos en las células en respuesta a un sustrato primitivo de la matriz extracelular. También pueden contribuir los desplazamientos tisulares gracias al crecimiento diferencial de la región posterior del embrión. Durante su migración muchas células germinales primordiales están unidas entre sí mediante largas prolongaciones citoplásmicas. Todavía no se ha determinado como estas interconexiones controlan la migración o el asentamiento en las gónadas. Las células germinales migratorias proliferan en respuesta a factores mitogénicos como el factor inhibidor de la leucemia y el factor de crecimiento de los mastocitos (factor de células provenientes de la madre o factor de Steel).^(8,9)

Conforme las células germinales se aproximan a las crestas genitales al final de la quinta semana del desarrollo, pueden ser influenciadas por factores quimiotácticos segregados por las gónadas recién formadas. Las células germinales primordiales del injerto se concentran más cerca de las crestas genitales del huésped o en ocasiones migran desde allí hacia las crestas genitales. Entre mil y dos mil células germinales entran en las crestas genitales y allí se detiene el comportamiento migratorio.⁽⁴⁾

1.1.2. DETERMINACIÓN GENÉTICA DEL SEXO.

En 1959 se estableció que la diferenciación entre los seres humanos masculinos y femeninos depende de la presencia del cromosoma Y; sin embargo, el vínculo entre el cromosoma Y, así como la determinación testicular no se había descubierto. Durante las últimas décadas se han propuesto 3 candidatos para el factor de determinación testicular: 1) el Antígeno H-Y, un antígeno menor de histocompatibilidad presente en las células de los varones pero no en las de las mujeres, localizado en el brazo corto del cromosoma Y humano; 2) un locus del brazo corto del cromosoma Y llamado gen “zing finger” (ZFY) 3) el gen de determinación testicular SRY, localizado en el brazo corto del cromosoma Y en una región de 35 kilobases que codifica una proteína no-histona de 223 aminoácidos que pertenece a la familia de proteínas que contienen una región fijadora de DNA muy conservada de 59 aminoácidos llamada “*high mobility group box*”.^(3,4,5,6,7)

1.1.3. DIFERENCIACIÓN GONADAL.

En humanos, semejante a otros mamíferos, las gónadas, los conductos genitales internos y estructuras genitales externas, todos son desarrollados de tejidos embrionarios bipotenciales. Los fenotipos masculino o femenino se dan a través de una cascada de procesos los cuales se inician con la determinación sexual seguida de la diferenciación sexual. El cariotipo (46,XX o 46,XY) del embrión (sexo genético) determina si la gónada primordial se diferencia en un testículo o en un ovario respectivamente (diferenciación gonadal). Un gen relacionado al Y, el SRY, actúa como señal para la

diferenciación testicular. El proceso de desarrollo testicular involucra varias vías controladas por otros genes no ligados al Y, tales como el gen 1 de tumor de Wilms (WT1), EMX2, LIM1, factor esteroideogénico 1 (SF-1) y el gen 9 relacionado a SRY (SOX 9). Además de otros genes tales como Wnt-4 y DAX-1 (reversión sexual sensitiva a dosis) y DMRT1, que son necesarios para la iniciación de la determinación sexual en la vía femenina. La producción hormonal de gónadas diferenciadas es relevante para la diferenciación de los genitales internos y externos durante la vida fetal, así como para el desarrollo de características sexuales en la pubertad. La hormona Antimülleriana (AMH) secretada por las células de Sertoli inhiben el desarrollo de genitales internos masculinos. La diferenciación de los genitales externos masculinos requiere la transformación de testosterona a dihidrotestosterona 5 alfa reductasa tipo 2 expresada en piel genital y seno urogenital. ^(1,4,5,6)

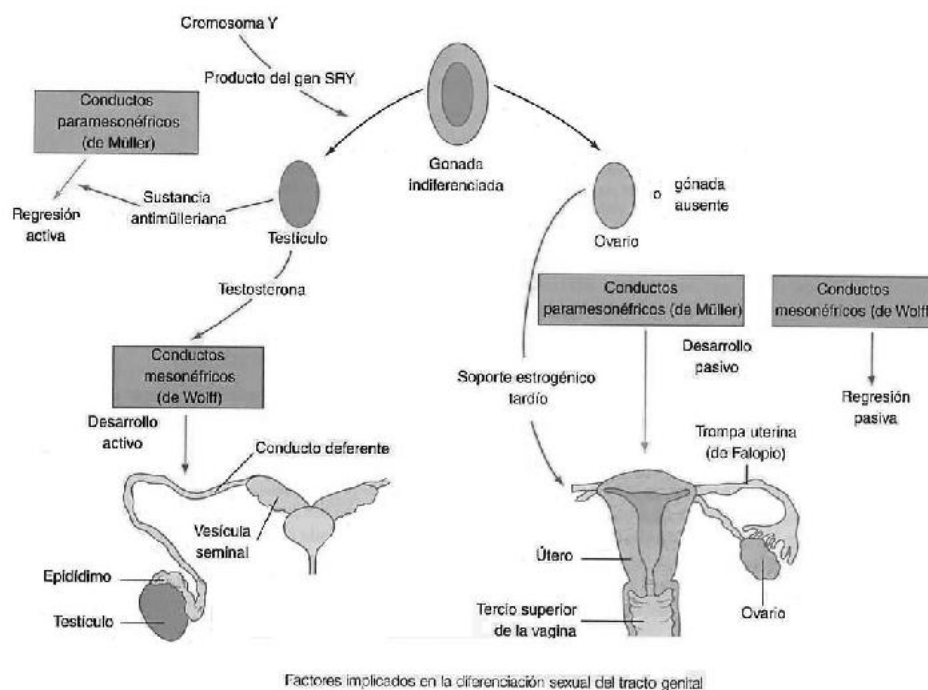


Figura 1. Diferenciación Gonadal. Cambios ocasionados por productos del gen SRY. ⁽¹⁾

1.1.4. DIFERENCIACIÓN DEL OVARIO.

En ausencia de las señales específicas de diferenciación testicular, las gónadas acaban convirtiéndose en ovarios. En contraste con los testículos, la presencia de células germinales viables es esencial para la diferenciación ovárica; si tales células no llegan a las crestas genitales o si son anormales (ej. una Monosomía del X) y se degeneran, la gónada se retrae y el resultado de esto son cintillas ováricas (ovarios vestigiales).⁽⁸⁾

Después de que las células germinales primordiales han llegado al futuro ovario, permanecen concentrados en la región corticomedular externa o cerca del límite de la misma. Al igual que el testículo, el ovario contiene cordones sexuales primitivos en la región medular, pero no están tan bien desarrollados como los del testículo. El origen de las células que forman los folículos ováricos no se ha determinado. Se han propuesto tres lugares de origen para las células del epitelio folicular: 1) el epitelio celómico (cordones sexuales secundarios); 2) los cordones sexuales primitivos de origen mesonéfrico y 3) una combinación de los dos.

Las células germinales primarias llamadas “*oogonias*” proliferan por mitosis desde el momento que entran en la gónada hasta el inicio del cuarto mes de gestación. Entonces algunas oogonias de la región medular interna del ovario entran en la profase de la primera división meiótica, posiblemente bajo la influencia de un factor estimulante de la meiosis que procede del mesonefros. Esta influencia puede estar asociada con cúmulos de epitelio derivados del mesonefros llamados “*rete ovarii medular*”. Las oogonias en meiosis, ahora llamadas “*oocitos*”, se asocian con células foliculares y forman los folículos primordiales. Entre tanto, las oogonias de la región cortical del

ovario continúan dividiéndose por mitosis. Las oogonias y los oocitos primarios están unidos por puentes citoplásmicos intercelulares que pueden intervenir en la sincronización de su desarrollo. Hacia la semana 22, el desarrollo folicular está bastante avanzado en todo el ovario, los oocitos continúan en meiosis hasta que alcanzan la etapa de diplotene de la profase cuando desaparece el bloqueo, en el adulto esto sucede en los oocitos individuales unos pocos días antes de la ovulación y en las mujeres premenopáusicas, pueden haber pasado hasta 50 años desde que estos oocitos entraron en el bloqueo meiótico durante la vida embrionaria.

En el ovario fetal se forma una delgada túnica albugínea casi imperceptible en la unión corticomedular, la corteza del ovario es el componente predominante y contiene la mayoría de los oocitos, la médula se llena con tejido conectivo y vasos sanguíneos que proceden del mesonefros.

El ovario en desarrollo no mantiene una relación con el mesonefros, normalmente los túbulos mesonéfricos del embrión femenino se degeneran y sólo quedan restos. ⁽¹⁾

En el ovario, los folículos primordiales tienen que pasar por diferentes estadios para llegar a folículos preovulatorios. En años anteriores, nuevos genes y nuevas proteínas han sido reconocidas que juegan un papel importante en la foliculogénesis. Una serie de ligandos y su receptor c-kit son necesarios para el mantenimiento del total de folículos de ovario: GDF-9, BMP15, originan una mayor foliculogénesis temprana. Existen algunas proteínas pro y antiapoptóticas tales como Bax y Bcl, las cuales se completan en las células de la granulosa, para mantener o no vivo el ambiente folicular. ⁽²⁾

Existe un gen MATER, que fue primeramente visto en ratones y que es requerido para el desarrollo embrionario temprano y sirve como un modelo de ratón autoantígeno. En el humano el cDNA de MATER clonado por técnicas de PCR, mide aproximadamente 63 kb DNA, ubicado en el cromosoma 19 y está compuesto de 15 exones y 14 intrones, y la expresión de la proteína MATER (de aproximadamente 134 kDa) fue detectada en los oocitos humanos y provee bases para la investigación de las implicaciones clínicas en falla ovárica prematura e infertilidad en las mujeres. ⁽³⁾

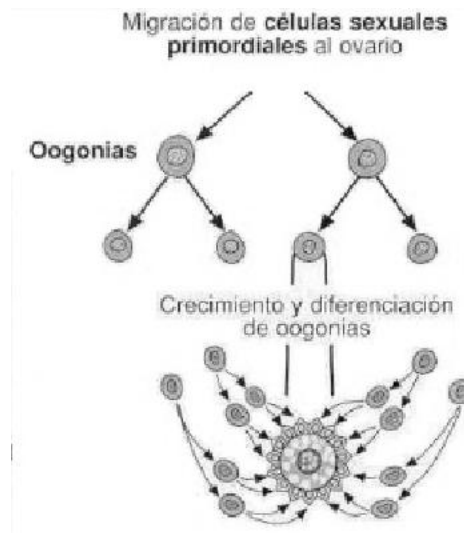


Figura 2. *Migración al Ovario.* Migración de células sexuales primordiales al ovario. ⁽⁴⁾

1.2. ASPECTOS CITOGENÉTICOS.

1.2.1. CROMOSOMAS.

Todas las células tienen cromosomas, el término fue dado por W. Waldeyer en 1888, el cual significa “cuerpo coloreado” y se usa porque los cromosomas se tiñen de

un color brillante con ciertas técnicas histológicas. Se encuentran en el núcleo en número constante para cada especie. El material nucleoprotéico de los cromosomas se denomina cromatina.

Cada cromosoma, con muy pocas excepciones tiene un claro punto de anclaje para las fibras que forman los husos mitótico y meiótico. Los puntos de anclaje se denominan cinetócoros, y las constricciones de los cromosomas en donde éstos se hallan se llaman centrómeros. Los cinetócoros, y las constricciones de los cromosomas en donde éstos se hallan se llaman centrómeros. Los cinetócoros están compuestos aparentemente por proteína y RNA. Los cromosomas se clasifican de acuerdo con la localización del centrómero. Este puede encontrarse en la mitad del cromosoma (metacéntrico), en el extremo del cromosoma (telocéntrico), muy cercano al final del cromosoma (acrocéntrico) o en alguna posición intermedia a éstas (subtelocéntrico o submetacéntrico).

Cada célula somática normal en la especie humana tiene 46 cromosomas por lo que son diploides ($2n$) antes de que tenga lugar la división celular; esto es, todos sus cromosomas se presentan en parejas. Uno de los miembros de cada pareja proviene de cada uno de los progenitores. Las células haploides (n), entre las que se incluyen las células reproductoras (gametos), poseen solo una copia de cada cromosoma. En el estado diploide, los miembros de un mismo par cromosómico se denominan cromosomas homólogos (o simplemente homólogos); los dos forman un par homólogo.

De los 23 pares, 22 se encuentran tanto en las células masculinas como femeninas y se llaman autosomas, y el otro par, denominados cromosomas sexuales o gonosomas, son dos cromosomas X en la mujer (46,XX), y un X y un Y en el varón (46,XY).

El número de cromosomas se mantiene constante en las células somáticas por el fenómeno de la división llamado mitosis y se reduce a la mitad en los gametos por la división conocida como meiosis. Fallas en cualquiera de estos dos procesos ocasionan las aberraciones del número de los cromosomas.

El complemento cromosómico total de una célula, el cariotipo, se puede fotografiar durante la mitosis y ordenar en parejas para formar una figura que se denomina cariograma.

1.2.2. MITOSIS.

El proceso por el cual una célula da origen a dos células hijas con igual número de cromosomas se denomina mitosis. Cuando no son aparentes los fenómenos de la división se dice que la célula se encuentra en el período de interfase, en donde los cromosomas están alargados formando una fina red dentro del nucleoplasma. La mayor parte de las células del organismo se divide periódicamente, para lo cual ocurren transformaciones y fenómenos que se suceden de manera cíclica, constituyendo lo que se denomina ciclo celular. ^(8,9) Para dividirse, la célula tiene que duplicar antes su material genético, lo cual ocurre durante el período S o sintético del ciclo por lo que en el período G1 cada cromosoma estará constituido por una simple cromátide, mientras que después del período S –en el período G2- ya aparecerá constituido por dos cromátides unidas por el centrómero. Al final del período G2 aparecen las fases que constituyen la mitosis propiamente dicha y que ocurre en 1 o 2 horas. La mitosis es un proceso continuo, pero se describe conformada por fases consecutivas que se definen por

las características morfológicas de los cromosomas: profase, metafase, anafase y telofase.

En la profase, los cromosomas que ya se habían duplicado en el período S de la interfase, se han ido acortando y aparecen como bastones compactos, por un proceso de espiralización. La membrana nuclear deja de hacerse visible y son aparentes los centriolos que también se han duplicado, migrando uno de ellos por la periferia del núcleo hacia el otro polo de la célula, el huso acromático aparece entre los dos centriolos. Éstos son los lugares donde se ensambla la tubulina -que es la subunidad proteica de los microtúbulos. El nucléolo también deja de hacerse visible durante la profase.

En la metafase, los cromosomas se colocan en el plano ecuatorial de la célula y aparecen unidos al huso acromático por el centrómero. En este estadio mediante las técnicas de cultivo de tejidos y el empleo de sustancias como la colchicina que impiden la formación del huso, se pueden observar mejor los cromosomas al microscopio.

En la anafase ocurre la división longitudinal del centrómero, por lo que permite que cada cromátide se separe y unida por el centrómero al huso acromático, migre hacia el polo respectivo de la célula.

En la telofase se forman dos núcleos hijos (cariocinesis) y el citoplasma también completa su división (citocinesis), de tal suerte que por último se obtienen dos células hijas con igual dotación de cromosomas y de citoplasma (división ecuatorial).

1.2.3. MEIOSIS.

La meiosis permite la reducción del número de cromosomas por medio de dos divisiones celulares sucesivas –primera y segunda divisiones meióticas- con una sola duplicación previa de los cromosomas.

Los cromosomas homólogos se aparean en la primera división de meiosis y realizan un proceso de intercambio de material genético denominado entrecruzamiento (crossing-over) que tiene notable importancia en la evolución y variación genética de las especies que se reproducen sexualmente.

La profase de la primera división meiótica consta de cinco etapas:

- 1) *Leptoteno*. En la cual los cromosomas aparecen como finos filamentos.
- 2) *Cigoteno*. Los cromosomas homólogos se aparean (sinapsan) en toda su longitud formando los llamados bivalentes, gracias a la formación del complejo sinaptonemal constituido por tres elementos paralelos –electrodensos- uno central y dos laterales llamados sinaptómeros, interconectados por filamentos transvesos.
- 3) *Paquiteno*. Los cromosomas se han ido acortando y cada cromosoma aparece claramente formado por dos cromátides, por lo cual el bivalente presenta cuatro filamentos (tétrada) en íntima relación, con esta fase ocurre el fenómeno de entrecruzamiento.
- 4) *Diploteno*. Comienza la separación de los bivalentes, quedando unidos en determinados puntos –llamados quiasmas- los cuales son la manifestación citológica del intercambio de material genético o entrecruzamiento. Este mecanismo permite que cada cromosoma de un gameto de un individuo

pueda llevar genes de ambos progenitores y es un factor que introduce notable variabilidad genética en los organismos de reproducción sexual. A medida que progresa el diploteno los quiasmas parecen moverse hacia los extremos del cromosoma, proceso llamado terminalización.

- 5) *Diacinesis*. Los cromosomas se han contraído aún más y los quiasmas se han desplazado por completo hacia sus extremos (terminalización).

En la metafase de la primera división meiótica los cromosomas bivalentes se colocan en el plano ecuatorial de la célula, orientando sus centrómeros hacia cada uno de los polos; durante la anafase los dos cromosomas de cada par se separan dirigiéndose cada uno de ellos al polo celular correspondiente. Esta separación de los homólogos constituye la base física de la segregación de los alelos.

En la telofase se completa la primera división de meiosis, la cual es seguida después de un breve período intercinético por la meiosis II sin que ocurra nueva síntesis de DNA. Durante la metafase II los cromosomas se colocan en el plano ecuatorial de la célula y en la anafase II ocurre la división longitudinal del centrómero. La migración hacia los polos se completa en la telofase II. Por consiguiente, cada una de las dos células obtenidas en la meiosis I originará a su vez otras dos o sea cuatro en total. Cada uno de estos gametos tendrá un número simple o haploide de 23 cromosomas.

La meiosis, sin embargo, presenta diferencias importantes según se trate de la mujer o el varón. En la mujer, la ovogénesis primaria produce un solo gameto funcional -el ovocito- que posee mayor cantidad de citoplasma debido a una división desigual que produce tres pequeños corpúsculos polares que degeneran además del ovocito. En el varón, la espermatogénesis tiene lugar en el testículo. En la pared de los túmulos seminíferos se encuentran las espermatogonias que se multiplican por mitosis. Las

espermatogonias maduras se acercan a la luz del túbulo y se transforman en espermatocitos primarios, que son las células que inician la meiosis. Cada espermatocito primario origina dos espermatocitos secundarios, y cada uno de ellos dos espermátides que se transformarán mediante espermiogénesis en espermatozoides o gametos masculinos.

En la meiosis I, los gonosomas X y Y se vinculan de manera terminoterminal por sus brazos cortos y forman lo que se llama la vesícula sexual.

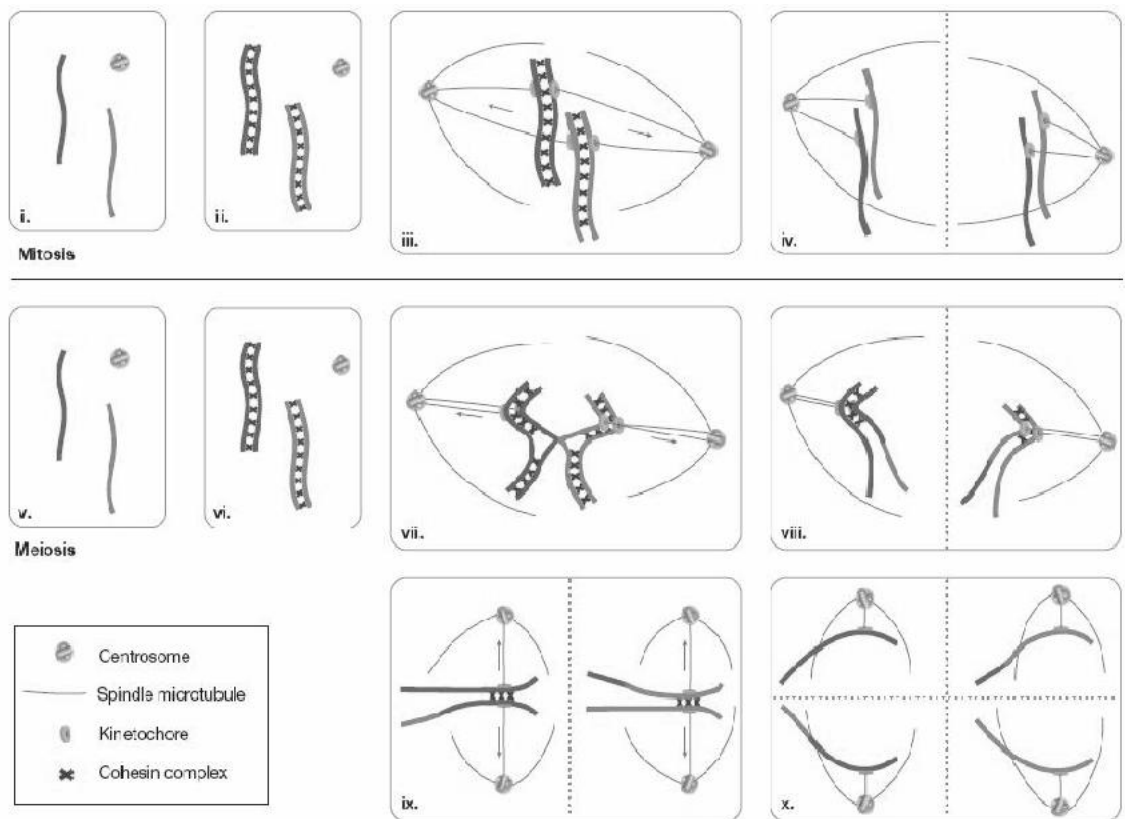


Figura 3. Ciclos de cromosomas en mitosis y meiosis. ⁽³⁷⁾

1.3. CROMOSOMA “X”.

1.3.1. BIOLOGÍA DEL CROMOSOMA X.

La biología del cromosoma X es única, así hay 2 cromosomas X en las mujeres y sólo uno en los hombres, mientras los autosomas están presentes en duplicado en ambos sexos. La presencia de un solo autosoma, lo cual puede ocurrir como resultado de un error en la segregación meiótica, es invariablemente un evento embrionario letal. La monosomía para el cromosoma X es viable porque la compensación del dosage, un sistema que se encuentra en todos los organismos con una forma X:Y de determinación sexual, el cual trae igualdad de expresión de la mayoría de los genes ligados al X en mujeres y hombres. En los mamíferos, el sistema de compensación de dosage génico involucra el silenciamiento de la mayoría de los genes del cromosoma X; esto es llamado inactivación del cromosoma X ^(38,39).

1.3.2. CROMATINA X Y REGULACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.

Análisis de la cromatina X en humanos.

La cromatina X es un corpúsculo intranuclear de forma planoconvexa de 0.7 a 1.2 mm de diámetro, la cual se tiñe de manera intensa con colorantes nucleares y existe en 10 a 98% de las células de mujeres normales, dependiendo de la técnica y métodos de tinción empleados. Los cuerpos de Barr pueden teñirse mediante una gran cantidad de colorantes como tionina, hematoxilina, verde de metilo y con la técnica de Feulgen

seguida por una hidrólisis ácida. El método más sencillo y utilizado a menudo es el frotis de mucosa obtenido por un raspado suave de la mucosa del carrillo, extendido en la laminilla y luego teñido. Por lo general, se analizan al microscopio entre 50 y 100 células, debido a que la cromatina X se observa con menor frecuencia en este tipo de tejido. Sin embargo, con el desarrollo de técnicas novedosas en citogenética, ya no se utiliza en la actualidad.

Relación entre la cromatina X y el número de cromosomas X presentes en el genoma.

Diversos investigadores han reconocido que mujeres con Síndrome de Turner resultan negativas para la cromatina X y que los varones con Síndrome de Klinefelter presentan cromatina X positiva. Otros estudios han demostrado que el corpúsculo de Barr puede ser único o múltiple. Esto ha llevado a formular una regla precisa: dado que es necesario que siempre un cromosoma X se mantenga activo en el genoma de un individuo, todos los cromosomas X supernumerarios se inactivan y el número de cromatinas X observadas, es uno menos el número de cromatinas X presentes.

Cada cromatina X corresponde a un cromosoma X heteropicnótico y de replicación tardía. En ocasiones, se observan cuerpos de Barr de tamaño y forma anormal; esto se debe a anomalías estructurales de uno de los cromosomas X. ⁽¹²⁾

Compensación de dosis e hipótesis de Lyon.

En 1961, Mary Lyon postuló una teoría que trataba de responder a interrogantes sobre si: ¿los genes ligados al X en la mujer son funcionales?, ¿la condensación

cromosómica se lleva a cabo en el mismo X (materno o paterno)? y ¿Qué mecanismo determina cuál de los cromosomas X se condensará?

Los puntos más importantes de la hipótesis de Lyon son:

- 1) El cromosoma X condensado resulta genéticamente inactivo.
- 2) La primera inactivación ocurre durante el desarrollo embrionario temprano, tal vez en el estado de blastocisto, cuando se inactiva al azar el cromosoma X materno o paterno.
- 3) La inactivación del X se hereda de manera clonal, es decir, una vez inactivado el X materno o paterno en una célula este mismo cromosoma se inactivará en las células descendientes.

La mejor observación que apoya la inactivación de un cromosoma X en varias líneas celulares en la mujer, provino de la determinación de la enzima glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), en eritrocitos de mujeres portadoras del gen mutado de la G6PD localizado en el cromosoma X. Muchas pacientes son homocigotas recesivas, es decir llevan el alelo mutado en ambos cromosomas X y no presentan valores enzimáticos detectables. No obstante algunas mujeres deficientes para G6PD son heterocigotas y aunque la concentración de la enzima en eritrocitos es intermedia en la mayoría de los casos, puede variar desde tan baja como en mujeres homocigotas recesivas hasta cifras observadas en mujeres y varones normales. Esta variabilidad se debe a que los eritrocitos de mujeres homocigotas con concentraciones muy bajas de G6PD descienden de una célula original, en la que el cromosoma X activo lleva el alelo anormal. Por el contrario, los eritrocitos de mujeres heterocigotas con valores adecuados de G6PD deben provenir de una célula cuyo cromosoma X activo lleva el gen normal.

La inactivación al azar se pierde cuando existe un cromosoma X estructuralmente incompleto o con demasiado material del mismo cromosoma X. En estos casos, dicho cromosoma alterado se inactiva de modo preferencial y forma un corpúsculo de Barr de tamaño y morfología diferentes como en el caso de una translocación X;autosoma.

De esta manera, las alteraciones estructurales del cromosoma X representan excepciones a la hipótesis de Lyon. ^(12,15)

Regiones pseudoautosómicas.

En los últimos años se han descrito dos regiones homólogas en los cromosomas X e Y conocidas como PAR1 y PAR2. Estas regiones contienen genes homólogos y se aparean como regiones autonómicas durante la meiosis en el varón. PAR1 corresponde a un segmento de 2.6 millones de pares de bases (bp) en el extremo distal de los brazos cortos de los cromosomas sexuales, donde debe suceder una recombinación obligada para asegurar la segregación de los cromosomas X e Y. Las deleciones de PAR1 resultan en falla del apareamiento meiótico, por lo cual se sugiere que esta región es primordial para la fertilidad masculina. La segunda región pseudoautosómica, PAR2, se localiza en el extremo distal de los brazos largos de los cromosomas X e Y. Esta región consta aproximadamente de 0.4 millones de pares de bases.

Estudios recientes indican que las regiones pseudoautosómicas representan vestigios de regiones autonómicas agregadas al X y al Y durante la evolución. ⁽¹⁵⁾

Ley de Ohno.

Ohno sugirió en 1967 que debido a la diferente relación de la dosis entre genes autonómicos y genes ligados al cromosoma X, las translocaciones entre el X y los

autosomas originadas durante la evolución deberían ser deletéreas y eliminadas. Por tanto, los genes ligados al cromosoma X en cierta especie de mamíferos también deberían estar ligados a este cromosoma en los demás mamíferos. Hasta hace poco se desconocían excepciones a esta hipótesis también como ley de Ohno.

Conceptos actuales de la inactivación del cromosoma X.

Durante los últimos años se han generado numerosos conocimientos que permiten esclarecer algunos de los mecanismos básicos de la inactivación del cromosoma X. Actualmente se considera que el proceso de inactivación del cromosoma X se lleva a cabo en múltiples pasos:

- 1) Recuento del número de cromosomas X.
- 2) Elección del X que permanecerá activo.
- 3) Inicio de la inactivación de cromosomas adicionales.
- 4) Extensión de la inactivación a lo largo del cromosoma X.

Se reconoce la existencia de un mecanismo que asegura que sólo un cromosoma X se mantendrá activo en una célula diploide y que todos los demás se inactivarán. Este proceso parece estar mediado por una señal de bloqueo producida en cantidad limitada, que se une a una región determinada de un solo cromosoma X, protegiéndolo así de la inactivación. Por otro lado, se ha comprobado que una señal en el desarrollo temprano es capaz de desencadenar el proceso de inactivación del X a partir de una región cromosómica específica denominada centro de inactivación (XIC). Therman y Patau introdujeron el concepto de un centro de inactivación en el cromosoma X humano, basándose en observaciones del patrón de inactivación en cromosomas X con diversas anomalías estructurales (deleciones, isocromosomas, isodicéntricos, etc.); además,

reconocieron que para que un cromosoma X sea inactivado se requiere la presencia de la región proximal de su brazo largo y postularon que la inactivación no ocurre cuando se pierde este segmento y el embrión muere de manera temprana. En el humano, el XIC se ubica en la banda Xq13 y abarca un segmento aproximado de DNA de 660 a 1200 kilobases.

Después de la señal de iniciación se produce la extensión de la inactivación a partir del XIC, lo cual origina el silenciamiento transcripcional de la mayor parte de los genes presentes en el cromosoma X.

Los mecanismos específicos de mantenimiento de la inactivación aseguran que el cromosoma X inactivo será transmitido de manera clonal a través de las divisiones celulares sucesivas. ^(12,15)

XIST.

En 1991, Ballabio y Willard propusieron que el locus denominado XIST origina la inactivación del cromosoma X en mamíferos. Este gen se localiza dentro del centro de inactivación (XIC), tanto en humanos como en ratones (*Xist*). En ambas especies XIST (*X-inactive specific transcript*) se presentan características únicas:

- Sólo se transcribe el alelo localizado en el X inactivo y no el del X activo.
- El transcrito es largo (15 kb) y codifica para un RNA que se retiene en el núcleo y que rodea al cromosoma X inactivo.
- Su expresión se correlaciona con la inactivación del cromosoma X en células somáticas femeninas y con la meiosis en espermatogonias.

Se requieren más estudios con el fin de aclarar la relación entre XIC y XIST, con el mecanismo que reconoce el número de X presentes en la célula y que asegura la inactivación de un solo X.

Los cromosomas X con delección de XIST no pueden inactivarse y se correlacionan con fenotipos graves debidos a disomías funcionales originadas por fallas en la inactivación

Inactivación del cromosoma X durante el desarrollo.

Durante las etapas tempranas de la embriogénesis femenina, tanto el cromosoma X materno como paterno están activos en los embriones preimplantados, El inicio de la inactivación del X ocurre de manera secuencial y paralela a la diferenciación celular, comenzando en el trofoectodermo extraembrionario y el endodermo primitivo del blastocisto y luego en las células fetales precursoras de la masa celular interna alrededor del período de implantación. En el desarrollo temprano, durante el blastocisto, se detectan transcritos derivados de algunos genes de ambos cromosomas X; se asume que la presencia dos X activos en etapas muy tempranas del desarrollo puede tolerarse debido al escaso número de genes activos ligados al X. Más tarde, en ausencia del mecanismo de compensación de dosis, resulta nociva la transcripción de un gran número de genes que sólo deben expresarse en una dosis.

Aún cuando los estudios en el ratón sugerían que la inactivación del cromosoma X finalizaba al iniciarse la gastrulación, hace poco se demostró que la inactivación sigue patrones diferentes y que algunos tejidos como notocorda, corazón, mesodermo craneal e intestino posterior se inactivan de modo más tardío.

Inactivación del cromosoma X en células germinales.

En las células somáticas de las mujeres, la inactivación del cromosoma X es estable y heredable. En cambio, en las células germinales en que se inactiva uno de los dos X al azar durante el proceso de migración hacia la cresta gonadal, este X debe reactivarse para permitir el inicio de la meiosis.

El proceso de reactivación da lugar a un estado eucromático necesario para el apareamiento meiótico normal. El cromosoma X reactivado continúa activo en los ovocitos a través de la ovulación y la fertilización, hasta que es inactivado durante el estado de preimplantación.

En las células germinales masculinas, el cromosoma X se condensa y se replica de manera tardía, junto con el cromosoma Y, con el cual forma la vesícula sexual y ambos resultan transcripcionalmente inactivos. El proceso de inactivación del único X durante la meiosis masculina previene el daño que pueda haber por eventos de recombinación en las regiones no apareadas del cromosoma X. Se consideraba que el cromosoma X continuaba inactivo en los espermatocitos, espermatidas y espermatozoides, y que sólo se reactivaba inmediatamente después de la fertilización, no obstante, hallazgos recientes demuestran transcripción en espermatidas, lo cual sugiere que la regulación transcripcional del cromosoma X, al igual que la del Y, está restringida al proceso de meiosis.

Características del cromosoma X inactivo.

El cromosoma X inactivo se identificó de manera original por su patrón de replicación tardía y su naturaleza de heterocromatina condensada, que se reconoce como

corpúsculo de Barr. Otras características específicas del cromosoma X inactivo incluyen diferencias en la metilación y en el estado de acetilación de las histonas. ⁽¹⁵⁾

Momento de la replicación.

En los tejidos somáticos, el cromosoma X inactivo se replica de manera tardía y, por tanto, de modo asincrónico respecto a su homólogo activo. Sin embargo, se ha demostrado que algunos genes, que en apariencia escapan a la inactivación en el X inactivo, replican de manera sincrónica en ambas cromosomas X. La combinación de replicación tardía y de condensación es una propiedad general de la heterocromatina, la cual se divide en:

- 1) Constitutiva: que incluye los centrómeros y otras regiones heterocromáticas.
- 2) Facultativa: en donde la cromatina puede adoptar el estado de eucromatina activa o de heterocromatina inactiva en diferentes células.

El cromosoma X inactivo corresponde a la heterocromatina constitutiva.

Metilación del DNA.

Durante mucho tiempo, a la metilación del DNA se le ha considerado como un excelente proceso para explicar el silenciamiento de genes en el cromosoma X inactivo. Por lo tanto no resulta sorprendente que los patrones de metilación sean diferentes en los genes de los cromosomas X activo e inactivo. La diferencia funcional radica en la presencia de islas CpG metiladas localizadas en el extremo 5' de ciertos genes en el cromosoma X inactivo. En cambio, en el X activo las islas CpG de estos genes no están metiladas, de este modo, la metilación del DNA ha demostrado ser importante en el silenciamiento transcripcional de genes en el cromosoma X inactivo.

Acetilación de histonas.

Se ha comprobado que en el cromosoma X inactivo del humano existe una disminución importante de isoformas acetiladas de diferentes histonas, lo cual sugiere que la heterocromatinización está relacionada con la hipoacetilación de histonas. Además se ha observado una estrecha correlación entre la hiperacetilación de la histona H4 con regiones de transcripción activa.

Genes en el cromosoma X que escapan a la inactivación.

Al inicio se consideró que ninguno de los genes localizados en el cromosoma X inactivo se transcribía; sin embargo, se han identificado alrededor de 20 genes que se expresan tanto en el X inactivo como en el activo. Estos hallazgos demuestran que ciertos genes escapan al proceso de inactivación y que para la construcción de un fenotipo normal se requiere que se expresen en doble dosis. Los genes que escapan a la inactivación se encuentran a lo largo del cromosoma X, aunque la mayor parte se localiza en las regiones pseudoautosómicas y en Xp11. Esta distribución indica que la inactivación del X es un fenómeno regional, donde bloques enteros de genes se encuentran regulados de manera coordinada.

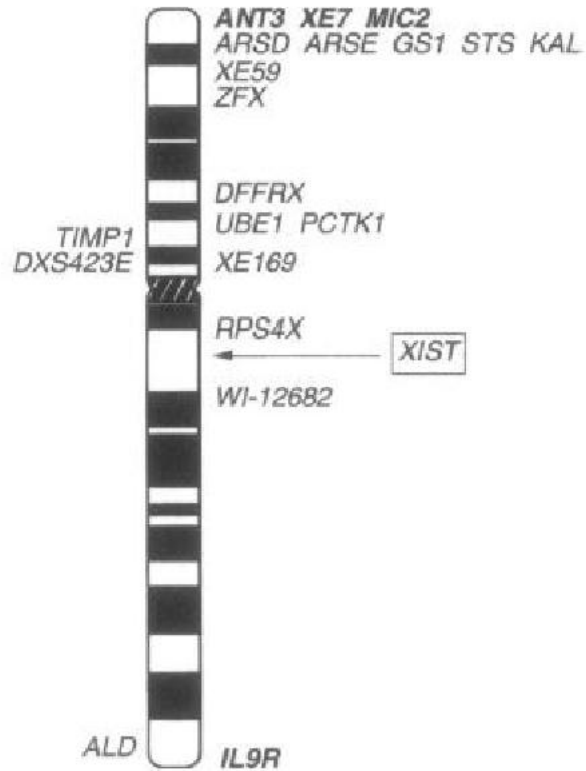


Figura 4. *Resumen de la expresión de genes desde el cromosoma X inactivo.* ⁽³⁷⁾

1.4. ABERRACIONES CROMOSÓMICAS.

1.4.1. CARIOTIPO.

Cuando una célula se divide, su material nuclear (cromatina) pierde la apariencia relativamente homogénea característica de las células que no están en división y se condensa hasta tomar la apariencia de organelos en forma de bastoncillos, denominados cromosomas (chroma, color; soma, cuerpo), porque se tiñen de modo intenso con ciertos colorantes.

Los 46 cromosomas de las células somáticas constituyen 23 pares. De estos 22 son semejantes en mujeres y varones, y se denominan autosomas. El par restante comprende los cromosomas sexuales: XX en mujeres y XY en varones.

Las anomalías de los cromosomas pueden ser numéricas y estructurales, y pueden afectar uno o más autosomas, cromosomas sexuales o ambos de manera simultánea ^(18,32,34).

1.4.2. TIPOS DE BANDAS CROMOSÓMICAS PARA ANÁLISIS.

Cierto número de métodos de bandeo se utilizan en los laboratorios de citogenética para la identificación de los cromosomas y análisis de la estructura cromosómica, dando como resultado entre otras:

Bandas G.

En este tipo de bandas los cromosomas, después de ser tratados con sustancias para desnaturalizar las proteínas cromosómicas y después teñirlos, se obtiene un patrón de bandeo claro-oscuro, específico de cada par de cromosomas. Siendo esta la técnica más utilizada. ^(19,32)

Bandas C.

En este tipo de bandas se tiñe la región centromérica de cada cromosoma, así como de otras regiones que contienen heterocromatina; esto es, secciones de los cromosomas 1q, 9q y 16q adyacentes al centrómero y la parte distal de Yq. Siendo de gran utilidad para la detección de polimorfismos cromosómicos. ^(19,32)

Bandas Q.

Estas bandas requieren de tinción con mostaza de quinacrina o compuestos relacionados para poder ser visualizadas, así como el análisis con microscopio de fluorescencia. ^(19,32)

Bandas R.

Si los cromosomas reciben tratamiento con calor previamente a la tinción con Giemsa, se obtendrá un patrón de bandas claras y oscuras que resultan opuestas a las que se producen por los bandeos G o Q, siendo de gran utilidad para la detección de pequeñas deleciones en regiones teloméricas. ⁽¹⁹⁾

Hibridación in situ por fluorescencia.

Es el método que permite la separación y purificación de cromosomas individuales sobre la base de su intensidad después de teñirlos con una o más tinciones de DNA fluorescente. Los cromosomas en metafase se aíslan de una población de células mitóticas en cultivo, se tiñen en solución y reflejan los cromosomas de una determinada intensidad fluorescente. ^(19,32)

1.5. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS NUMÉRICAS.

Las células pueden tener variaciones en el número de sus cromosomas que impliquen múltiplos del número haploide –denominadas euploidías- o cambios en los

cuales solo uno o algunos cromosomas están implicados, a las que se les conoce como aneuploidías.

En las euploidías se repite varias veces el número haploide (n) de 23, por lo que una célula con $3n$ tendrá 69 cromosomas y constituye una triploidía; si tiene $4n$ tendrá 92 y es una tetraploidía; si tiene $5n$ será una pentaploidía y contará con 115 cromosomas, etc. En general, números mayores al diploide se denominan poliploidías.

1.5.1. ANEUPLOIDÍAS.

Las aneuploidías son las más conocidas por sus repercusiones como causa de defectos congénitos. Se presentan como resultado de una no separación cromosómica (no disyunción) o por rezago anafásico de un cromosoma durante la anafase de la división celular. Estas fallas pueden presentarse tanto en la meiosis como en la mitosis, y, en caso de afectar la meiosis pueden ocurrir en la meiosis I o II, y por supuesto, durante la espermatogénesis o en la ovogénesis.

Las aneuploidías más importantes son:

- Trisomía: Cuando hay un cromosoma adicional.
- Monosomía: Si falta un cromosoma.
- Doble trisomía: Cuando se encuentran dos cromosomas adicionales de distinto par.
- Tetrasomía: Los dos cromosomas adicionales son del mismo par.

Cuando la no separación cromosómica se produce en la mitosis temprana, después de la formación del cigoto (poscigótica), durante la formación de los primeros blastómeros se originan los mosaicos o mixoploidías.

Sin embargo, no todas las líneas celulares que se forman como resultado de la no separación cromosómica son viables, algunas quedan sin la información genética necesaria para seguir multiplicándose y desaparecen.

1.5.2. MOSAICISMO DEL CROMOSOMA X.

En una escasa proporción un individuo puede tener líneas celulares con diferente número de cromosomas. Esta situación puede ser resultado de una no disyunción o un retraso cromosómico durante la mitosis del cigoto o en los núcleos de las etapas tempranas del embrión.

De acuerdo a la etapa de desarrollo en que ocurra la no disyunción será la variedad de líneas celulares que encontraremos en el adulto. Entre más temprana mayor será la afectación (Figura 5).

Se conocen muchos mosaicos para los cromosomas sexuales en el humano entre los que se encuentran los individuos con: 45X/46XX y 46XX/47XXX. ^(1,2,3,36,37)

Origen de Mosaicismo

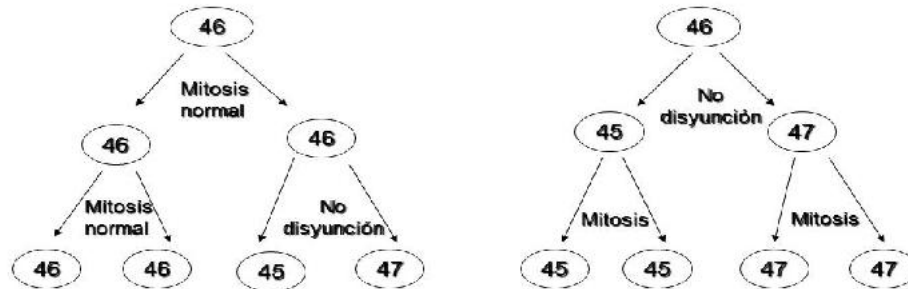


Figura 5. Esquema de no disyunción y afectación de líneas celulares

1.6. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES.

Las alteraciones estructurales se originan por ruptura cromosómica seguida o no de reconstitución en una combinación anormal; estos reordenamientos pueden ocurrir de muchas maneras; sin embargo, son más raras que las aneuploidías.

Los tipos más comunes de rearrreglos cromosómicos son los siguientes:

a) *Translocación.*

Implica el intercambio de segmentos cromosómicos entre cromosomas posterior a una ruptura. Existen dos tipos principales: robertsonianas y recíprocas.

Las translocaciones robertsonianas se presentan únicamente entre cromosomas acrocéntricos (de los grupos D y G) y las translocaciones recíprocas entre cualquier cromosoma. ^(19,32)

b) Delección.

Es una pérdida de un segmento cromosómico que genera desequilibrio cromosómico, puede ser terminal o intersticial. ^(19,32)

c) Duplicación.

Las duplicaciones como las deleciones pueden originarse por recombinación desigual o por segregación anormal meiótica en un portador de una translocación o una inversión. ^(19,32)

d) Inversión.

Una inversión se produce cuando en un solo cromosoma ocurren dos rupturas y se reconstituye con los segmentos entre las rupturas invertidos con un giro de 180° y son de dos tipos: paracéntricas (a un lado del centrómero), en las que ambas rupturas ocurren en un brazo, y pericéntricas (alrededor del centrómero), en las que hay una ruptura en cada brazo. ^(19,32)

e) Cromosomas en anillo.

Los cromosomas en anillo se forman cuando se producen rupturas en ambos extremos del cromosoma a nivel de los telómeros y los extremos rotos por contener una enzima adhesiva se acercan y se reúnen formando una estructura anular. ^(19,32)

f) Isocromosomas.

Un isocromosoma es un cromosoma en el que falta un brazo y el otro está reduplicado, dando la apariencia de una imagen en espejo; por lo tanto, un individuo con 46 cromosomas que porta un isocromosoma tiene una sola copia del material genético de un brazo y tres copias del material del otro. ^(19,32)

g) Cromosomas Dicéntricos.

Es un tipo raro de cromosoma anormal en que dos segmentos cromosómicos (de diferentes cromosomas o de dos cromátides de uno solo), cada uno con un centrómero, se fusionan en los extremos con pérdida de sus fragmentos acéntricos. ^(19,32)

h) Cromosomas marcadores.

Ocasionalmente se observan cromosomas marcadores muy pequeños en cultivos cromosómicos, con frecuencia en un estado de mosaico. A menudo se encuentran junto a un complemento cromosómico normal, y por tanto, se denominan cromosomas supernumerarios. ^(19,32)

1.7. REPERCUSIONES CLÍNICAS.

Los factores genéticos explican el 33% de los trastornos de la reproducción humana, de los cuales la tercera parte tienen origen cromosómico. En México se calcula una frecuencia del 11% de anomalías cromosómicas en los pacientes con

alteraciones reproductivas, entre los que se incluyen las alteraciones de los cromosomas sexuales.

Los mosaicos cromosómicos se presentan con dos líneas celulares o más en un mismo individuo, en uno o más tejidos, pudiendo ser autosómicos (cualquier autosoma) o sexocromosómicos (para los cromosomas X o Y).

Los productos de la concepción con Síndrome de Turner con cariotipo 45,X terminan en aborto en el 99% de las veces; mientras que algunas variantes como son los mosaicos con 2 o 3 líneas celulares: 45,X/46,XX ; 45,X/46,XX/47,XXX sobreviven; cursando con fenotipos variables: físicos y reproductivos, asociándose con aborto recurrente o alteraciones cromosómicas en su descendencia, principalmente.

También están los mosaicos de mujer XXX como por ejemplo: 46,XX/47,XXX ; 46,XX/47,XXX/48,XXXX ó 47,XXX/48,XXXX que hasta el momento no se han estudiado adecuadamente y que también pueden cursar con alteraciones reproductivas como: aborto recurrente, hijos con defectos congénitos o esterilidad.

A todas estas variantes que se mencionan se les puede englobar con el nombre de Mosaicos del cromosoma "X". Este mismo ha sido reportado en asociación con desarrollo sexual anormal, pérdidas gestacionales, recién nacidos con aneuploidías autosómicas o de sexocromosomas.

Estas mujeres tienen grandes variaciones fenotípicas y mayor riesgo de función reproductiva anormal, pudiendo pasar desapercibidas cuando no se realiza el abordaje adecuado; sin embargo, en ocasiones pueden pasar desapercibidos estos mosaicos si por alguna circunstancia no se buscan adecuadamente con un número mayor de metafases analizadas en el cariotipo en linfocitos de sangre periférica.

Se han hecho determinaciones hormonales en donde se ha visto que principalmente las pacientes con Síndrome de Turner o sus mosaicos presentan un hipogonadismo hipogonadotrófico, ⁽²¹⁾ en ocasiones también hipoglicemia hiperinsulinémica ⁽²²⁾ o alteraciones en la hormona del crecimiento. ^(23 y 24)

Alteraciones pélvicas, las cuales se presentan como ausencia de útero o hipoplasia uterina, alteraciones en el volumen de los ovarios o la ausencia de los mismos o solo vestigios. ⁽²⁵⁾

También la presencia de alteraciones cardiovasculares, tanto estructurales como de la conducción. ^(26,27,28)

Reportan la presencia de alteraciones en la morfología de los dientes, principalmente los premolares ^(29,30) o la presencia de mala oclusión dental. ^(31,32)

Alteraciones renales estructurales así como diversas infecciones de tracto genitourinario. ⁽³³⁾

Las alteraciones de la reproducción representadas por esterilidad primaria o secundaria, así como la presencia de aborto recurrente ^(34,35) y la posibilidad de complicaciones como la falla ovárica prematura. ⁽³⁶⁾

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.

1.8. JUSTIFICACIÓN.

En la literatura mundial las alteraciones de los cromosomas sexuales se reportan en uno de cada 400 recién nacidos vivos ^(21,22) y explican el 4% de los trastornos de la reproducción. ⁽²³⁾ No existe hasta ahora un reporte de la frecuencia de mosaicos del cromosoma X, probablemente porque hasta ahora se han mantenido en un subregistro.

No es posible correlacionar la fórmula cromosómica con la indicación del estudio de las pacientes; lo que se traduce en un fenotipo reproductivo variable y probablemente con la proporción de las líneas celulares en diversos tejidos, mismas que inclusive pueden variar con la edad.

La importancia de la detección de estos casos es dar un diagnóstico, realizar la correlación cariotipo-fenotipo, dar un asesoramiento real con respecto al riesgo reproductivo y a las posibles alteraciones asociadas o las manifestaciones posteriores, pudiendo así tratar o prevenir las complicaciones a futuro.

De este modo resulta de gran importancia el conocer la prevalencia del mosaicismo, los datos clínicos tanto en el físico como a nivel de la función de los diferentes órganos y las causas principales por las que acuden a la consulta para su atención. La correlación con los diferentes tipos citogenéticos, así como los riesgos para la descendencia y por otra parte las alternativas que pueden existir para la pareja, contando inclusive en caso de lograr embarazo con los métodos de diagnóstico prenatal invasivo y no invasivo y el adecuado protocolo de estudio para la limitación de las secuelas que pueden presentar por la alteración cromosómica presente debido a que el cromosoma “X” tiene la influencia sobre el adecuado funcionamiento de los ovocitos.

Es importante la detección de este tipo de alteraciones para realizar la evaluación completa de la paciente y su pareja para poder dar un buen asesoramiento genético, hablarles acerca de las opciones reproductivas, así como la limitación de las secuelas por el desbalance cromosómico.

Este trabajo de investigación puede contribuir además de determinar que tipo de mosaicismo presenta una mujer con estas características, a que el médico tratante se base en una guía para su manejo adecuado y esto repercute en la atención de las pacientes.

Tales datos que se pretenden buscar no están reportados en la literatura en un solo artículo, sólo existen reportes aislados.

1.9. HIPOTESIS.

Si las mujeres con mosaicismo de cromosoma X presentan alteraciones de la reproducción, entonces podrá realizarse una correlación entre el fenotipo y el cariotipo así como determinar el riesgo para la descendencia.

OBJETIVOS.

1.10. OBJETIVO GENERAL:

- Conocer la frecuencia del mosaicismo del cromosoma “X” en una muestra de pacientes mexicanas con trastornos de la reproducción.

1.11. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el tipo de mosaicismo de cromosoma “X”.
- Conocer cual es el mosaico de cromosoma X más frecuente.
- Establecer la correlación de Bandas GTG con FISH.
- Detectar la posibilidad de secuencias del cromosoma Y en el tejido analizado.
- Establecer la correlación fenotipo-cariotipo en cada caso.
- Analizar las posibilidades de riesgo para su descendencia.
- Establecer el flujograma de estudio para estas pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 VALORACIÓN CLÍNICA.

Se atendió a las parejas que acudieron con alguna alteración de la reproducción a la consulta de Genética del Instituto Nacional de Perinatología, realizándoles la historia clínica genética, el árbol genealógico, la somatometría, signos vitales y exploración física correspondiente y a aquellas parejas que reunieron los requisitos dentro de las causas probables para el estudio se les realizó el cariotipo en sangre periférica a ambos.

Teniendo como criterios de selección:

- 1) Amenorrea primaria o secundaria.
- 2) Esterilidad primaria o secundaria.
- 3) Pérdida gestacional recurrente: aborto, obito, muerte neonatal temprana.
- 4) Hijo(s) previo(s) con defecto(s) congénito(s)
- 5) Hijo(s) previo(s) con cromosomopatía.

2.2 PROCEDIMIENTO DE AMNIOCENTESIS GENÉTICA.

En posición de decúbito dorsal se realizó a cada paciente una exploración ultrasonográfica nivel II para evaluación de las características del útero, posición del feto y la integridad de las membranas amnióticas, la inserción placentaria, las características del líquido amniótico y la morfología fetal, además de corroborar la vitalidad del mismo.

Se identificó el punto idóneo de punción y se procedió a la realización de la asepsia y antisepsia de la pared abdominal con solución antibacteriana de amplio espectro, colocando campos estériles; se le colocó un campo estéril al transductor para poder seguir con la guía ultrasonográfica y se realizó la punción con aguja espinal Needle de calibre 22 y 12 cm de largo provista de estilete para minimizar el riesgo de contaminación materna hasta llegar a cavidad amniótica.

Se aspiraron los primeros 3 ml de líquido mediante una jeringa adecuada que se usó para la determinación bioquímica o de resguardo. Posteriormente se aspiraron 20 ml de líquido amniótico que se usaron para el estudio citogenético y el ensayo cometa.

Se desconectó y retiró la jeringa y posteriormente se retiró de la aguja bajo guía ultrasonográfica. Se confirmó posteriormente la vitalidad fetal y se procedió a llevar la muestra al laboratorio de Genética como se muestra en la figura 6.

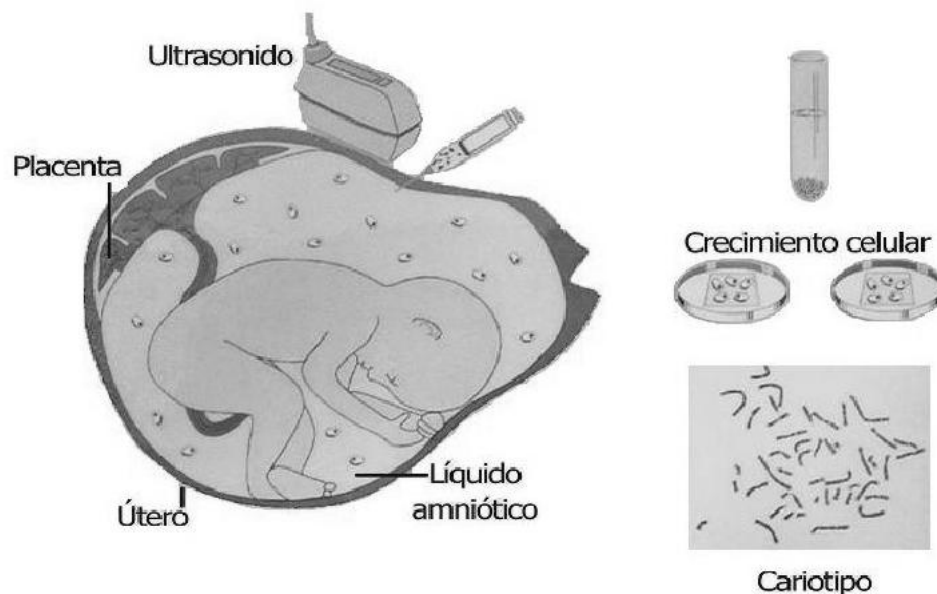


Figura 6. Realización de la amniocentesis citogenética.. a) mediante guía ultrasonográfica, b) obtención del botón celular y siembra del mismo, c) obtención del cariotipo fetal.

2.3 CULTIVO DE AMNIOCITOS.

La muestra de líquido amniótico fue colocada en 2 tubos de ensaye de 10 ml cada uno para su centrifugación a 1000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 3 ml de medio AmnioMax-C100 y se colocó en un frasco Falcon de 50 ml y en 5 cajas Petri, conteniendo un cubreobjetos de 5 ml para ser cultivados a 37° C y 5% de CO₂.

Las cajas Petri fueron valoradas con frecuencia hasta la observación de clonas y en ese momento se realizó la cosecha *in situ* para la obtención de cromosomas.

El frasco Falcon se mantuvo en cultivo hasta la confluencia celular. En su momento las células fueron desprendidas con tripsina 1x/EDTA y subcultivadas en cajas Petri con medio AmnioMax-C100 a 37° C y 5% de CO₂ durante 24 h para completar el estudio citogenético y realizar la técnica de FISH. ⁽¹⁹⁾

2.4 COSECHA *IN SITU* PARA OBTENCIÓN DE CROMOSOMAS.

Cuando los cultivos de amniocitos realizados en cajas Petri presentaron clonas bien formadas, se procedió a la obtención de cromosomas, para ello, se agregaron 10 µl de Colcemid y se incubaron durante 15 min a 37° C y 5% de CO₂.

Posteriormente se sustituyó el medio con el Colcemid por 3 ml de solución hipotónica al 0.8% de citrato de sodio a 37° C y se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se hizo una prefijación, agregando 2 ml de fijador Metanol-Acido Acético a una proporción de 5:2 a 4° C por 2 min. Transcurrido este tiempo se sustituyó la prefijación por 3 ml de fijador fresco a 4° C. Este paso se repitió 3 veces

cada 15 min. Finalmente se secó el cubreobjetos y se procedió a realizar la tinción para Bandas GTG. ⁽¹⁹⁾

2.5 TÉCNICA DE TINCIÓN Y ANÁLISIS DE BANDAS “G”.

Para la tinción de cromosomas, los cubreobjetos con las células de estudio se colocaron en varias soluciones en el orden siguiente: 1) solución de tripsina al 4% en buffer pH 7 (Gurr) por 2 min; 2) buffer pH 7 (Gurr) por 1 min; 3) solución de Wright al 4% en buffer pH 6.8 % (Gurr) por 3 min; 4) solución de giemsa al 4% en buffer pH 6.8 (Gurr) por 3 min; y 5) agua bidestilada para retirar el exceso de colorante. Se dejaron secar por 2 min, se etiquetaron y se montaron en portaobjetos con entellán, para su observación al microscopio de campo claro. ⁽¹⁹⁾

Se analizaron de 15 a 20 metafases por caso, de 4 a 5 cultivos primarios, con el objeto de dar un diagnóstico citogenético prenatal certero. Para el análisis cromosómico se siguió el patrón de bandeo que establece el Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética, A.C. ⁽²⁰⁾

2.6. HIBRIDACIÓN *IN SITU* POR FLUORESCENCIA.

La técnica de FISH es un estudio molecular que consiste en hacer laminillas por goteo con las células de estudio y colocarlas en una solución 2XSSC a 37° C por 30 min, enseguida se deshidratan en etanol al 70, 85 y 100% durante 2 min en cada uno. Se dejaron secar y se colocaron en una solución de desnaturalización (formamida al 70% en 2XSSC) a 72° C y pH 7. Se deshidrataron por segunda vez al 70, 85 y 100%, se dejaron

secar, se colocó la sonda (DNA marcado) de interés, desnaturizada a 72° C. Se colocó sobre las células de estudio y se incubó por 24 hrs. a 37° C para que se realizara la hibridación.

Trancurrido dicho tiempo se realizó un proceso posthibridación que consistió en el lavado con solución 0.3% NP40 en 0.4XSSC a 72° C por 2 min. y 0.1% NP40 en 2XSSC a temperatura ambiente por 1 min.

Se agregaron 10 ml de DAPI, se montó la laminilla y se observó al microscopio equipado con fluorescencia (Figura 7).⁽¹⁹⁾

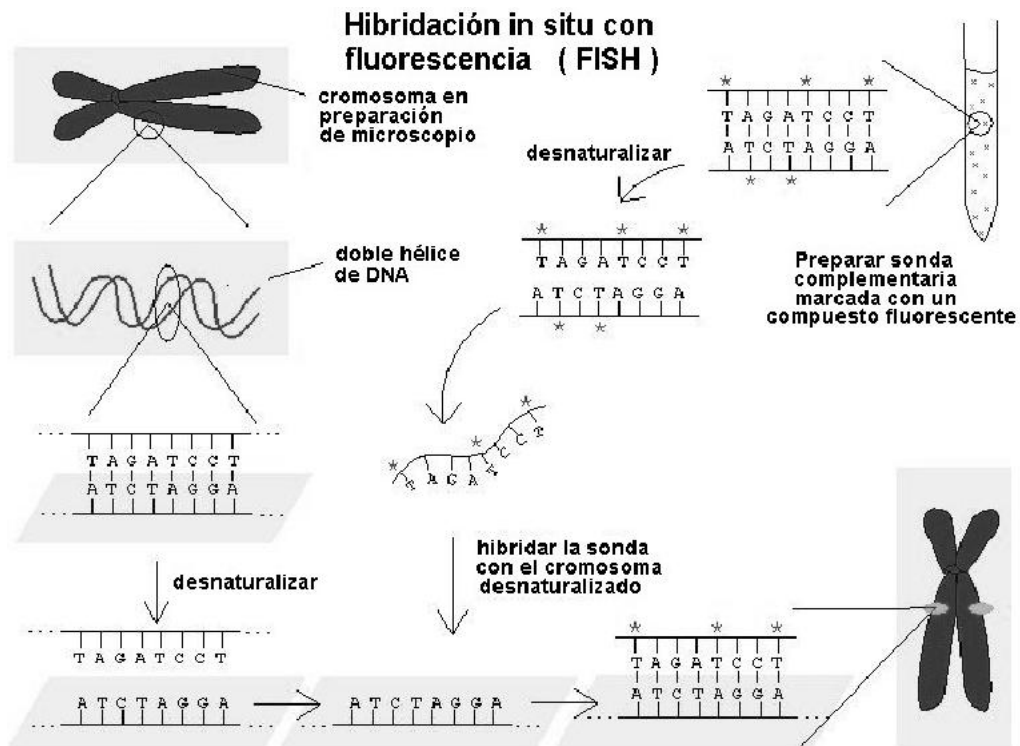


Figura 7. Hibridación *in situ* por Fluorescencia.

2.7. CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA.

Se realizó según el método de Moorhead modificado, siguiendo los pasos establecidos a continuación:

1. Se sembró por duplicado en la campana de flujo laminar, 10 gotas de sangre total en cada tubo de cultivo de plástico desechable con 4 ml de medio de cultivo McCoy 5 y 1 ml de suero fetal de ternera.
2. Se agregó 0.2 ml de fitohemaglutinina M, utilizando una jeringa de 1 ml con aguja No. 20 (cuatro gotas).
3. Se agregó 0.1 ml de solución de antibióticos penicilina-estreptomina.
4. Todos los cultivos se incubaron a 37° C durante 72 h.
5. Posteriormente se agregó 0.2 ml de solución de Colchicina.
6. Se incubó durante 1 a 2 hrs a 37° C.
 7. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min.
 8. Se retiró el sobrenadante.
 9. Se resuspendieron las células en solución hipotónica de cloruro de potasio 0.075 M.
10. Se incubaron los tubos a 37° C durante 20 a 30 min.
11. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min.
12. Se retiró el sobrenadante.
13. Se agregó solución fijadora de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) hasta completar 10 ml y se resuspendió hasta homogeneizar.
14. Se repitió el paso 11 al 13 dos veces
15. Se eliminó con cuidado el sobrenadante.

-
16. Se resuspendió el paquete celular con aproximadamente 0.5 ml del fijador.
 17. Se hicieron las preparaciones sobre portaobjetos previamente lavados, dejando caer dos gotas de la suspensión celular desde una altura suficiente para lograr una dispersión adecuada de los cromosomas.
 18. Se dejaron secar al aire.
 19. Se colocaron a 60°C por 24 h.
 20. Se procedió a la realización de tinción.

2.8. MOSAICOS A ESTUDIAR.

Se estudiaron a todas las pacientes que presentaron un mosaicismo de Cromosoma X (presencia de dos o más líneas celulares):

45,X / 46,XX

45,X / 46,XX / 47,XXX

45,X / 47,XXX

46,XX / 47,XXX

46,XX / 47,XXX / 48,XXXX

2.9. PROTOCOLO DE ESTUDIO PARA LAS PACIENTES.

A las pacientes que se les detectó cualquier tipo de mosaico de cromosoma X, se les realizó un protocolo de estudio que comprendió:

-
- Perfil hormonal completo.
 - Pruebas de función renal.
 - Ultrasonido pélvico, con valoración posterior de una histerosalpingografía.
 - Ultrasonido renal, con valoración posterior de una urografía excretora.
 - Electrocardiograma y tele de tórax.
 - Valoración por Medicina Interna.
 - Valoración oftalmológica.
 - Valoración estomatológica.
 - Valoración psicológica.
 - Densitometría ósea.

Teniendo el cuidado de que cada protocolo de estudio no excediera de un año para cada paciente.

Terminando el estudio de cada paciente se le dio el asesoramiento genético real y a tiempo y fueron canalizadas para su manejo integral.

En caso de embarazo posterior al ingreso al protocolo se les ofreció los métodos de diagnóstico prenatal y se llevó seguimiento hasta el término del mismo.

Contando con todos los datos de cada paciente, se analizaron para la correlación de los hallazgos clínicos con el cariotipo y los datos de laboratorio y gabinete y de acuerdo a los resultados obtenidos se realizó un flujograma de estudio para estas pacientes.

2.10. CRITERIOS.

Inclusión: Las que presentaron cualquier tipo de mosaicismo del cromosoma X.

Exclusión: Las que presentaron alteraciones estructurales del cromosoma X, y que presentaron cualquier otra alteración cromosómica.

2.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó la prueba estadística por análisis de varianza con un valor de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS.

3. RESULTADOS.

De todas las parejas que ameritaron el estudio de cariotipo en sangre por sus antecedentes reproductivos, se detectaron a 87 mujeres con diferentes mosaicos numéricos del cromosoma X (Tabla 1).

Tabla 1 .- Datos generales de pacientes con mosaicismo. Parte 1 de 3.

Caso Numero	Edad	Diagnóstico	Resultado Citogenético	%	Otros Tejidos	Gesta	Para	Aborto	Cesárea
1	28	3 abortos	45,X (3)/46,XX (92)/47,XXX (5)	3/92/5		3	0	3	0
2	33	3 abortos	45,X (6)/46,XX (94)	6/94		3	0	3	0
3	29	5 abortos	46,XX (95)/47,XXX (5)	95/5		6	0	5	1
4	27	4 abortos	45,X (8)/46,XX (88)/47,XXX (4)	8/88/4		6	0	4	2
5	27	esterilidad	45,X (4)/46,XX (93)/47,XXX (3)	4/93/3		0	0	0	0
6	26	amenorrea primaria	45,X (70)/46,XX (30)	70/30		0	0	0	0
7	32	esterilidad	46,XX (96)/47,XXX (4)	96/4		0	0	0	0
8	27	amenorrea secundaria	46,XX (98)/47,XXX (2)	98/2		0	0	0	0
9	32	6 abortos	46,XX (98)/47,XXX (2)	98/2		7	1	6	0
10	30	4 abortos	46,XX (96)/47,XXX (4)	96/4		4	0	4	0
11	34	4 abortos	45,X (12)/46,XX (88)	12/88		4	0	4	0
12	32	esterilidad	45,X (2)/46,XX (98)	feb-98		0	0	0	0
13	37	8 abortos	45,X (24)/46,XX (68)/47,XXX (8)	24/68/8		8	0	8	0
14	30	esterilidad	45,X (12)/46,XX (86)/47,XXX (2)	12/86/2		0	0	0	0
15	38	3 abortos y 1 obito	45,X (2)/46,XX (96)/47,XXX (2)	2/96/2		5	1	3	1
16	25	2 abortos	45,X (10)/46,XX (90)	10/90		2	0	2	0
17	36	2 abortos, 1 RNP(+)	45,X (12)/46,XX (84)/47,XXX (4)	12/84/4		4	2	2	0
18	37	3 abortos	45,X (18)/46,XX (76)/47,XXX (6)	18/76/6		5	2	3	0
19	31	amenorrea secundaria	45,X (12)/46,XX (88)	12/88		0	0	0	0
20	40	5 abortos	45,X (10)/46,XX (86)/47,XXX (4)	10/86/4		5	0	5	0
21	30	4 abortos	46,XX (96)/47,XXX (4)	96/4		5	0	4	1
22	35	4 abortos	45,X (2)/46,XX (98)	2/98		4	0	4	0
23	26	3 abortos	45,X (6)/46,XX (92)/47,XXX (2)	6/92/2		4	0	3	1
24	37	1 aborto, 1 obito, 2 hijos con C.C	46,XX (96)/47,XXX (4)	96/4		6	5	1	0
25	34	2 abortos	45,X (8)/46,XX (84)/47,XXX (8)	8/84/8		2	0	2	0
26	33	esterilidad	45,X (2)/46,XX (98)	2/98	46,XX	0	0	0	0
27	40	4 abortos	45,X (8)/46,XX (92)	8/92		4	0	3	0
28	34	3 abortos (1 c/S.D)	45,X (6)/46,XX (92)/47,XXX (2)	2/92/2	46,XX	3	0	3	0

Tabla 1 (continua).- Datos generales de pacientes con mosaicismo Parte 2 de 3.

Caso Numero	Edad	Diagnóstico	Resultado Citogenético	%	Otros Tejidos	Gesta	Para	Aborto	Cesárea
29	23	2 abortos	45,X(6)/46,XX(92)/47,XXX(2)	6/92/2		2	0	1	0
30	23	4 abortos	45,X(2)/46,XX(94)/47,XXX(4)	2/94/4		4	0	4	0
31	32	2 hijos con defctos congénitos	45,X(6)/46,XX(94)	6/94		2	0	0	2
32	40	2 abortos	45,X(6)/46,XX(94)	6/94		2	0	2	0
33	34	2 obitos (1 c/CC y 1 c/S.D)	45,X(6)/46,XX(92)/47,XXX(2)	2/98	46,XX	3	1	0	2
34	31	amenorrea secundaria	45,X(2)/46,XX(98)	2/98	46,XX	0	0	0	0
35	34	aborto + 1 hijo previo con S.D.	45,X(6)/46,XX(92)/47,XXX(2)	2/96/2	46,XX,inv(9)	2	0	1	1
36	29	4 abortos	45,X(2)/46,XX(98)	2/98	46,XX	4	0	4	0
37	40	4 abortos	45,X(12)/46,XX(85)/47,XXX(3)	12/85/3		6	1	4	0
38	44	2 abortos,1 hija c/CC (+)	46,XX(92)/47,XXX(8)	92/8		3	0	2	1
39	28	esterilidad	45,X(2)/46,XX(96)/47,XXX(2)	2/96/2		0	0	0	0
40	30	5 abortos	45,X(4)/46,XX(96)	4/96		5	0	4	0
41	34	4 abortos, 2 obitos	45,X(4)/46,XX(92)/47,XXX(4)	4/92/4	46,XX	6	2	4	0
42	28	3 abortos, 1 hija con VACTER (+)	45,X(2)/46,XX(96)/47,XXX(2)	2/96/2	46,XX	4	0	3	1
43	36	2 abortos	45,X(2)/46,XX(96)/47,XXX(2)	2/96/2		2	0	2	0
44	25	4 abortos, 1 emb anembriónico	46,XX(98)/47,XXX(2)	92/8		5	0	4	0
45	37	4 abortos	45,X(5)/46,XX(95)	5/95		4	0	4	0
46	33	3 abortos	45,X(7)/46,XX(93)	7/93		3	0	3	0
47	29	amenorrea primaria	46,XX(96)/47,XXX(2)/48,XXXX(2)	96/2/2		0	0	0	0
48	25	amenorrea primaria	45,X(5)/46,XX(95)	5/95		0	0	0	0
49	39	hijo previo con defectos congénitos	46,XX(92)/47,XXX(8)	92/8		1	1	0	0
50	39	2 abortos	46,XX(97)/47,XXX(3)	97/3		2	0	2	0
51	28	2 abortos	45,X(2)/46,XX(96)/47,XXX(2)	2/96/2		2	0	2	0
52	19	amenorrea primaria	46,XX(95)/47,XXX(5)	95/5		0	0	0	0
53	26	amenorrea secundaria	45,X(2)/46,XX(96)/47,XXX(2)	2/96/2		0	0	0	0
54	29	esterilidad	45,X(7)/46,XX(93)	7/93		0	0	0	0
55	31	2 hijos con defctos congénitos	45,X(4)/46,XX(94)/47,XXX(2)	4/94/2		2	1	0	1
56	31	3 abortos	45,X(3)/46,XX(97)	3/97		4	1	3	0
57	35	2 abortos	45,X(2)/46,XX(96)/47,XXX(2)	2/96/2		3	0	2	1
58	32	4 abortos	45,X(2)/46,XX(96)/47,XXX(2)	2/94/2/2		5	1	4	0
59	24	amenorrea primaria	45,X(3)/46,XX(95)/47,XXX(2)	3/95/2		0	0	0	0
60	30	4 abortos	45,X(2)/46,XX(96)/47,XXX(2)	2/96/2		5	0	4	1
61	34	3 abortos	46,XX(97)/47,XXX(3)	97/3		3	0	3	0
62	39	6 abortos	45,X(3)/46,XX(97)	3/97		6	0	6	0
63	29	2 abortos	45,X(2)/46,XX(94)/47,XXX(2)/48,XXXX(2)	2/94/2/2		2	0	2	0
64	34	3 abortos	45,X(3)/46,XX(94)/47,XXX(3)	3/94/3		4	1	3	0

Tabla 1 (continua).- Datos generales de pacientes con mosaicismo Parte 3 de 3.

Caso Numero	Edad	Diagnóstico	Resultado Citogenético	%	Otros Tejidos	Gesta	Para	Aborto	Cesárea
65	36	3 abortos	45,X (3)/46,XX (94)/47,XXX (3)	3/94/3		3	0	3	0
66	18	amenorrea primaria	46,XX (96)/47,XXX (4)	96/3		0	0	0	0
67	33	2 abortos	45,X (2)/46,XX (96)/47,XXX (2)	2/96/2		2	0	2	0
68	37	2 abortos	45,X (3)/46,XX (97)	3/97		3	1	2	0
69	32	3 abortos	45,X (2)/46,XX (98)	2/98		3	0	3	0
70	32	2 abortos	45,X (2)/46,XX (98)	2/98		2	0	2	0
71	30	5 abortos	45,X (4)/46,XX (97)/47,XXX (3)	4/93/3		6	0	5	1
72	38	4 abortos	46,XX (97)/47,XXX (3)	97/3		4	0	4	0
73	26	3 abortos	46,XX (97)/47,XXX (3)	97/3		3	0	3	0
74	28	amenorrea secundaria	45,X (4)/46,XX (96)	4/96		0	0	0	0
75	32	4 abortos	45,X (5)/46,XX (92)/47,XXX (3)	5/92/3		4	0	4	0
76	33	2 abortos	45,X (3)/46,XX (97)	3/97		2	0	2	0
77	35	3 abortos	45,X (5)/46,XX (92)/47,XXX (3)	4/96		3	0	3	0
78	31	hijo previo C/DC	46,XX (95)/47,XXX (5)	95/5		2	1	0	1
79	33	3 abortos	45,X (3)/46,XX (93)/47,XXX (4)	3/93/4		4	0	3	1
80	23	3 abortos	45,X (4)/46,XX (96)	4/96		3	0	3	0
81	32	hijo previo C/DC	46,XX (95)/47,XXX (5)	95/5		2	0	1	1
82	37	3 abortos	46,XX (94)/47,XXX (6)	94/6		3	0	3	0
83	29	2 abortos	45,X (4)/46,XX (94)/47,XXX (2)	4/94/2		2	0	2	0
84	37	2 abortos	45,X (5)/46,XX (95)	5/95		2	0	2	0
85	43	amenorrea secundaria	45,X (3)/46,XX (95)/47,XXX (2)	3/95/2		0	0	0	0
86	36	1 obito 2 abortos	45,X (3)/46,XX (97)	3/97		2	1	1	0
87	30	2 abortos	45,X (4)/46,XX (96)	4/96		2	0	2	0

La población tuvo una edad mínima de 19 años y máxima de 44 años (promedio de 31.8 años) al ingreso del protocolo, siendo la causa más frecuente por la que acudieron a la consulta el aborto recurrente (56 mujeres), 2) amenorrea (12 mujeres), 3) esterilidad (7 mujeres), 4) hijo previo con defectos congénitos (7 mujeres), 5) aborto e hijo previo con defectos congénitos (4 mujeres) (Figura 8).

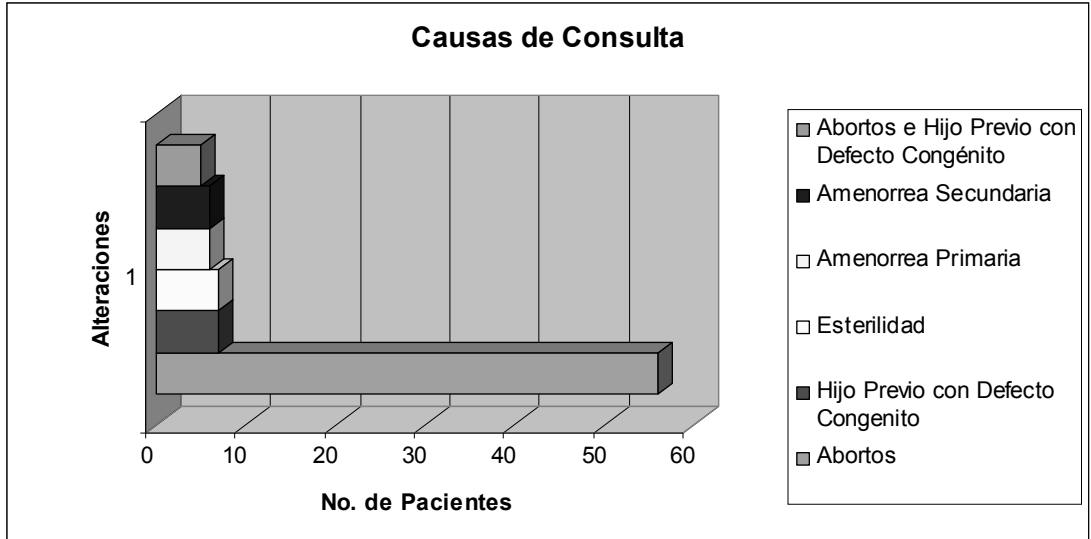


Figura 8. Causas más frecuentes de consulta de las mujeres con mosaico del "X".

El mosaico que se encontró más comúnmente fue el de 45,X / 46,XX / 47,XXX (37 mujeres); 45,X / 46,XX (29 mujeres); 46,XX / 47,XXX (19 mujeres); 45,X/46,XX/47,XXX/48,XXXX (1 mujer) y 46,XX/47,XXX/48,XXXX (1 mujer). Los cuales fueron corroborados por la técnica de FISH (Figura 9, 10, 11, 12 y 13) (Tablas 2, 3, 4 y 5).

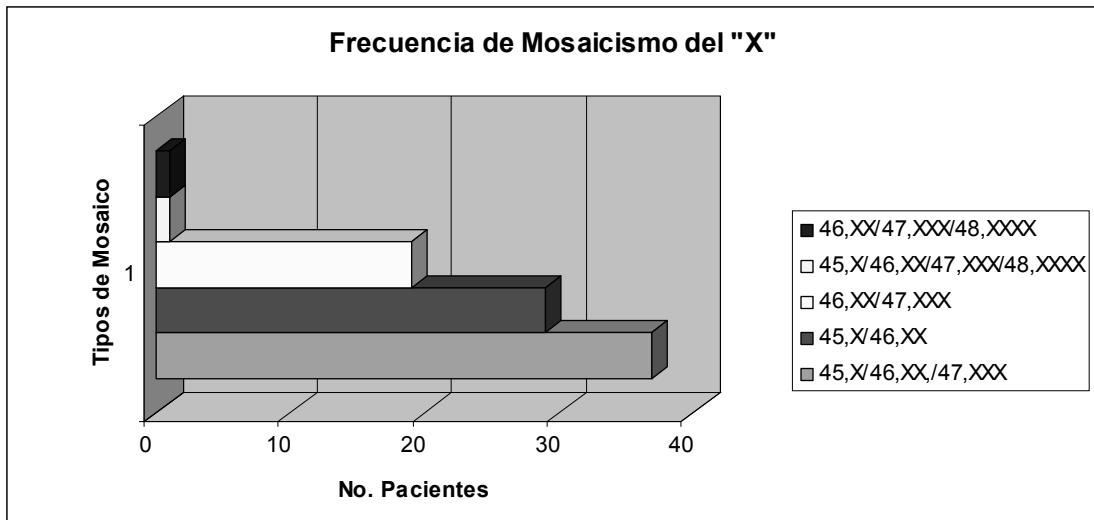


Figura 9. Frecuencia de los mosaicismos de cromosoma X.

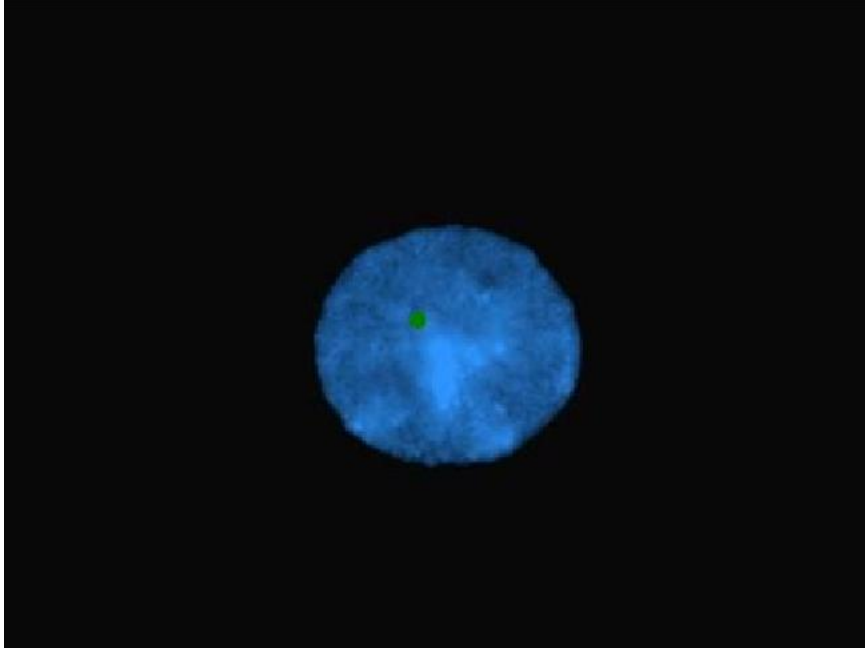


Figura 10. Imagen de FISH de linfocitos en interfase para una señal.

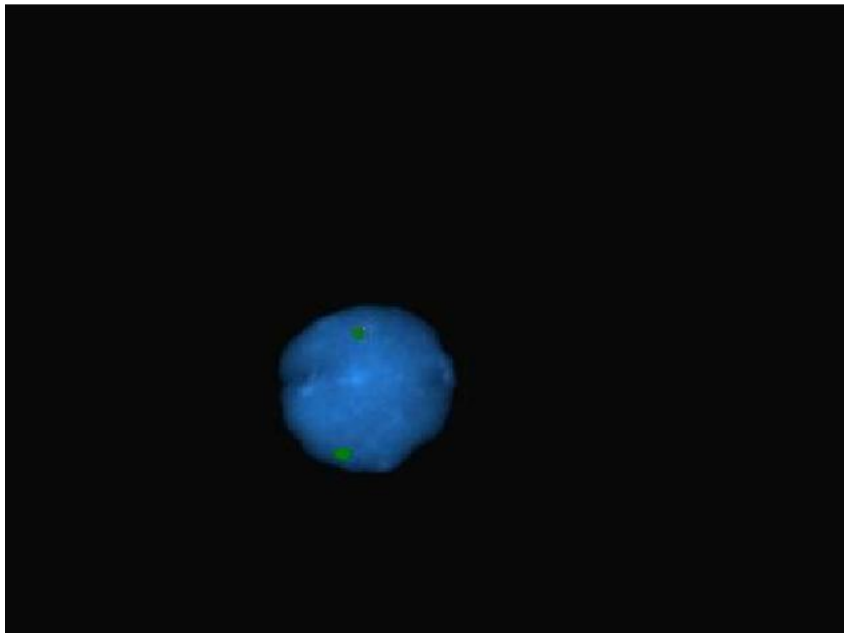


Figura 11. Imagen de FISH de linfocitos en interfase para dos señales.

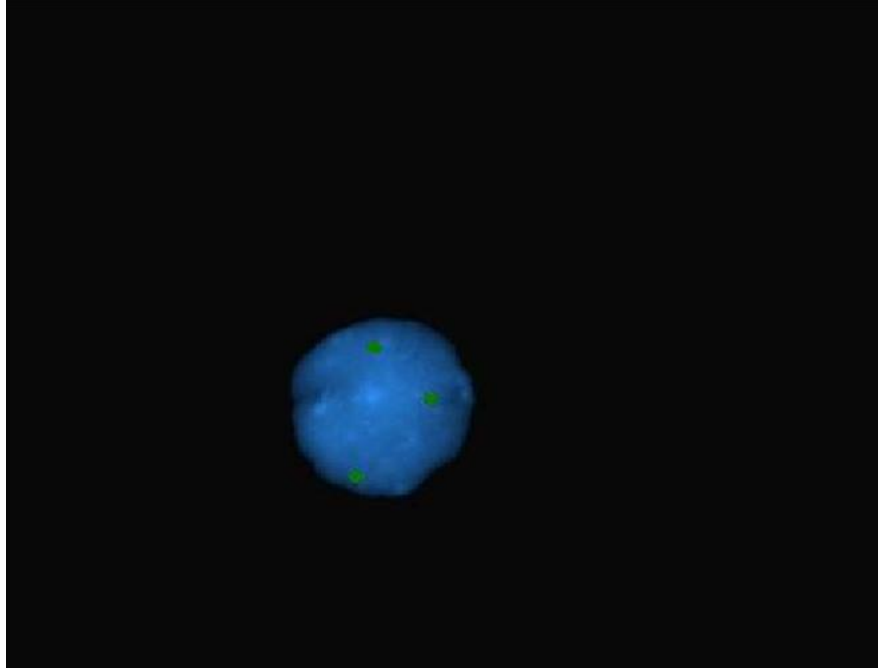


Figura 12. Imagen de FISH de linfocitos en interfase para tres señales.

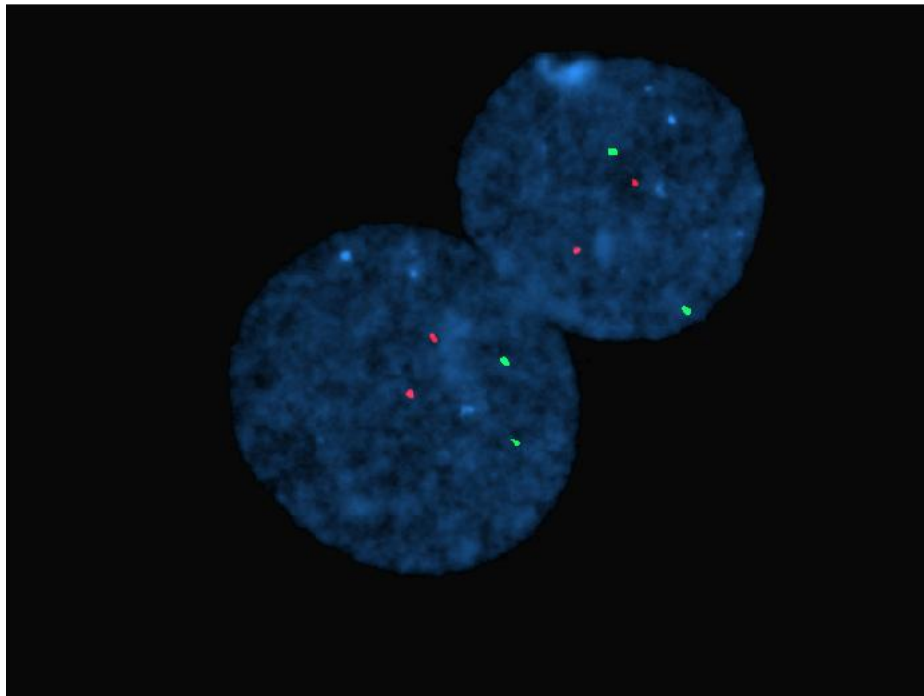


Figura 13. Imagen de FISH de linfocitos en interfase para cuatro señales.

Tabla 2.- Pacientes con mosaicismo 45,X/46,XX						
Caso	Edad	Causa de consulta	Gestas	Abortos	Obitos	Hijos Vivos
2	33	aborto	3	3		0
6	26	amenorrea	2	0		2
11	34	aborto	5	4		1
12	32	esterilidad	0	0		0
16	25	aborto	2	2		0
19	31	amenorrea	0	0		0
22	35	aborto	4	4		0
26	33	esterilidad	0	0		0
27	40	aborto	4	3	1	0
31	32	hijo c/D.C.	2	0		0
32	40	aborto	2	2		0
34	31	amenorrea	0	0		0
36	29	aborto	4	4		0
40	30	aborto	5*	4		0
45	37	aborto	4	4		0
46	33	aborto	4	3		1
48	25	amenorrea	1	0		1
54	29	esterilidad	0	0		0
56	31	aborto	4*	3		0
62	39	aborto	6	6		0
68	37	aborto	3*	2		0
69	32	aborto	3	3		1
70	32	aborto	2	2		0
74	28	amenorrea	0	0		0
76	33	aborto	2	2		0
80	23	aborto	3	3		0
84	37	aborto	2	2		0
86	36	obito y aborto	2*	1		0
87	30	aborto	3	2		1

* Embarazo en evolución, D.C. Defecto Congénito

Tabla 3 .- Pacientes con mosaicismo 46,XX/47,XXX

Caso	Edad	Causa de consulta	Gestas	Abortos	Obitos	Hijos Vivos
3	29	aborto	6	5		1
7	32	esterilidad	0	0		0
8	27	amenorrea	0	0		0
9	32	aborto	7	6		1
10	30	aborto	4	4		0
21	30	aborto	5	4		1
24	37	obito, aborto e hijo c/D.C.	6*	1	1	3
38	44	aborto e hijo c/D.C.	3	2		1
44	25	aborto, emb anembriónico	5	4		0
49	39	hijo c/D.C.	1	0		1
50	39	aborto	2	2		0
52	19	amenorrea	0	0		0
61	34	aborto	3	3		0
66	18	amenorrea	0	0		0
72	38	aborto	4	4		0
73	26	aborto	3	3		0
78	31	hijo c/D.C.	2	0		0
81	32	hijo c/D.C.	2	0		2
82	37	aborto	3	3		0

* Embarazo en evolución, D.C. Defecto Congénito

Tabla 4 .- Pacientes con mosaicismo 45,X/46,XX/47,XXX

Caso	Edad	Causa de consulta	Gestas	Abortos	Obitos	Hijos Vivos
1	28	aborto	3	1	1	1
4	27	aborto	6	4		2
5	27	esterilidad	0	0		0
13	37	aborto	8	8		0
14	30	esterilidad	1	0		1
15	38	obito y aborto	5*	4		0
17	36	obito y aborto	4*	2		1
18	37	aborto	5	3	1	2
20	40	aborto	5	5		0
23	26	aborto	4*	3		0
25	34	aborto	2	2		0
28	34	aborto e hijo c/D.C.	3	3		0
29	23	aborto	2*	1		0
30	23	aborto	4	4		0
33	34	obito e hijo c/D.C.	3	0		0
35	34	aborto e hijo c/D.C.	2*	1		0
37	40	aborto	6	4	2	0
39	28	esterilidad	0	0		0
41	34	obito y aborto	6*	4	1	0
42	28	aborto e hijo c/D.C.	4*	3		0
43	36	aborto	2	2		2
51	28	aborto	2	2		0
53	26	amenorrea	0	0		0
55	31	hijo c/D.C.	2*	1		0
57	35	aborto	3	2		1
58	32	aborto	5	4		1
59	24	amenorrea	0	0		0
60	30	aborto	5	4		1
64	34	aborto	4	3		1
65	36	aborto	3	3		0
67	33	aborto	2	2		0
71	30	aborto	6	5		1
75	32	aborto	4	4		0
77	35	aborto	3	3		0
79	33	aborto	4*	3		1
83	29	aborto	2	2		0
85	43	amenorrea	0	0		0

* Embarazo en evolución, D.C. Defecto Congénito

Tabla 5 .- Pacientes con mosaicismos poco frecuentes.

Caso	Edad	Causa de consulta	Cariotipo	Gestas	Abortos
47	29	amenorrea	46,XX (96)/47,XXX (2)/48,XXXX (2)	0	0
63	29	aborto	45,X (2)/46,XX (94)/47,XXX (2)/48,XXXX (2)	2	2

* Embarazo en evolución

La talla mínima de estas mujeres fue de 1.51m y la máxima de 1.69 y a la exploración física no se encontraron alteraciones en el fenotipo. En la población estudiada, la edad promedio en que se presentaron la mayor parte de los mosaicismos del X fue entre los 27 a 33 años como se puede apreciar en la Figura 14.

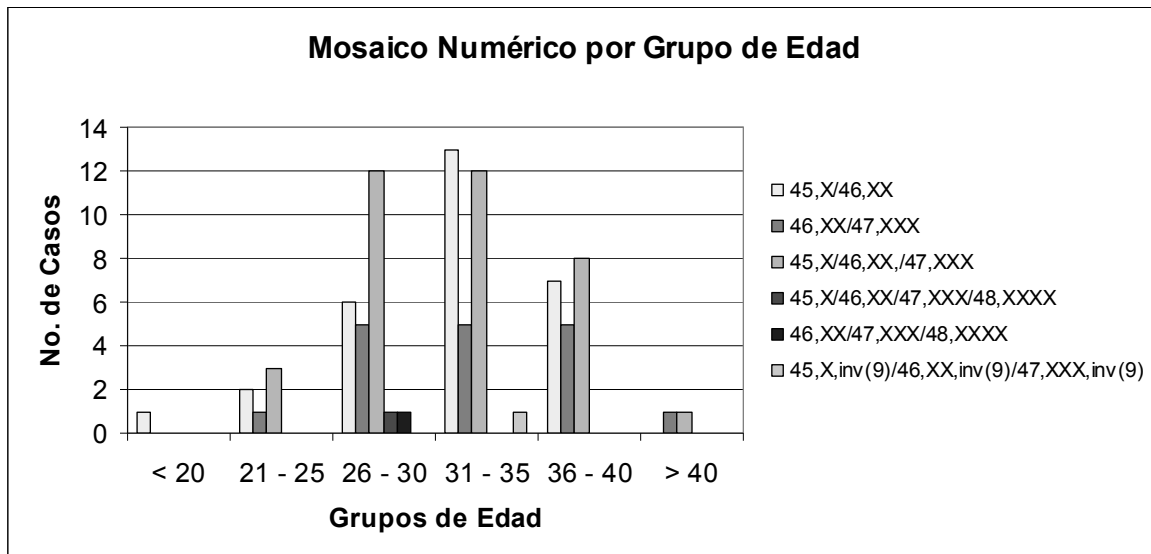


Figura 14. Presentación del mosaicismo de cromosoma X por edad.

Posterior a una consulta para entrega de resultados y asesoramiento genético a las pacientes y a sus parejas, se les invitó a estas mujeres, bajo consentimiento informado a ingresar a un protocolo de estudio para realizar algunas valoraciones en búsqueda de alteraciones asociadas, en el cual todas las pacientes aceptaron participar. Posterior al análisis del perfil hormonal ginecológico se encontró en 19 mujeres un hipogonadismo hipogonadotrófico. Se les realizó un ultrasonido pélvico y la histerosalpingografía en donde se apreciaron la mayoría dentro de parámetros normales, con el hallazgo de 8 mujeres con hipoplasia uterina, 2 pacientes con útero bicorne y 1 con útero septado, así como 2 mujeres con oclusión tubaria espontánea. El ultrasonido abdominal se realizó en búsqueda de posibles alteraciones en alguno de los órganos y se mostró en 2 mujeres la presencia de hidronefrosis y con la urografía excretora se detectó una mujer con doble sistema colector. Les fueron tomadas placas de tórax y electrocardiograma para una valoración cardiológica en donde solo se reportaron en 1 mujer una cardiopatía isquémica y en otra una cardiopatía compleja no especificada. Dentro de la valoración oftalmológica se detectaron a 18 mujeres con miopía, sin alteraciones en fondo de ojo y en la valoración de estomatología se encontró maloclusión dental en 9 pacientes (Figura 15,16, 17, 18 y 19).



Figura 15. Ultrasonido de útero hipoplásico.



Figura 16. Rayos X con medio de contraste que muestra obstrucción de tubas uterinas.



Figura 17. Ultrasonido de riñón con nefritis.



Figura 18. Imagen por urografía renal de un doble sistema colector.



Figura 19. Asimetría dental.

Por el antecedente de amenorrea, a las 12 mujeres estudiadas por este motivo se les solicitó una densitometría ósea y el reporte mostró la descalcificación ósea, principalmente de cabeza de fémur de grado variable en 4 de estas pacientes (Tabla 6) (Figura 20).

Tabla 6 .- Pacientes con mosaicismos del X detectadas por amenorrea			
Caso	Edad	Cariotipo	Estatura
6	26	45,X (70)/46,XX (30)	1.45
8 *	27	46,XX (98)/47,XXX (2)	1.47
19 *	31	45,X (12)/46,XX (88)	1.48
34 *	31	45,X (2)/46,XX (98)	1.45
47	29	46,XX (96)/47,XXX (2)/48,XXXX (2)	1.48
48	25	45,X (5)/46,XX (95)	1.47
52	19	46,XX (95)/47,XXX (5)	1.46
53 *	26	45,X (2)/46,XX (96)/47,XXX (2)	1.48
59	24	45,X (3)/46,XX (95)/47,XXX (2)	1.48
66	18	46,XX (96)/47,XXX (4)	1.51
74 *	28	45,X (4)/46,XX (96)	1.53
85 *	43	45,X (3)/46,XX (95)/47,XXX (2)	1.49

* Presentaron falla ovárica prematura

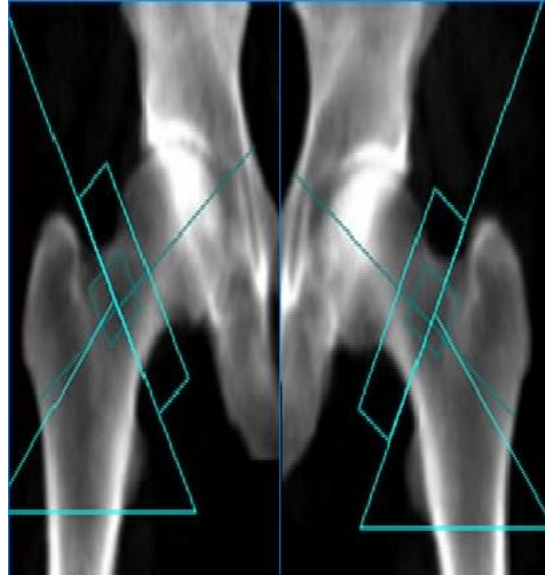


Figura 20. Densitometría ósea alterada a nivel de trocantes de ambos fémures.

Se llevó seguimiento de cada una de sus valoraciones con citas periódicas para revisar los resultados, explicárselos y reforzar la consejería y de esta forma se fueron canalizando de acuerdo a las alteraciones que presentaron con los diferentes especialistas para su manejo y limitación de las alteraciones (tabla 7).

Tabla 7.- Resultados de las valoraciones por diferentes servicios.

Perfil Hormonal Completo	19 hipogonadismos hipogonadotróficos	
US pélvico, Histerosalpingografía	8 hipoplasias uterinas	2 oclusiones tubarias espontáneas
US renal, Urografía excretora	2 hidronefrosis	1 doble sistema colector
ECG, tele de torax	1 cardiopatía isquémica	1 cardiopatía compleja
Valoración oftalmológica	5 miopías	
Densitometría ósea	4 anormales	

Posterior a finalizar con cada una los estudios y las citas periódicas para completar el asesoramiento, también se les dieron los riesgos para la descendencia y los métodos de diagnóstico prenatal en caso de decidir un embarazo, haciéndoles hincapié en que la toma de decisión era de pareja y para esto fueron enviados para apoyo al servicio de psicología para calmar su ansiedad.

De esta manera, 19 mujeres decidieron correr el riesgo de un nuevo embarazo, logrando 15 recién nacidos a término, 7 de pretérmino, 11 partos complicados. (Tabla 8)

Tabla 8.- Evolución de las pacientes con mosaicismo del X que tomaron la decisión de embarazarse nuevamente.

Embarazo	Recién Nacido	Líquido Amniótico	Linfocitos	Cxs. Fetales	Cxs. Maternas
A término	15	(5) 46,XX (1) 47,XX,+21	(6) 46,XY (3) 46,XX	* S. de Down * Pab. Aur.	*HTA
Pretérmino	7	(2) 46,XY	(4) 46,XY (1) 46,XX	*MNT *H diaf. *(3) AE	
Complicado (11)	--	---	CT (4) 46,XX (1) 47,XY+21	*(9) AE *(1) EE *(1) EBA	*->Salping

Dos mujeres decidieron llevar a cabo los trámites para una adopción, 2 pasaron a tratamiento por medicina Interna y dos a Nefrología. De estas pacientes se realiza el diagnóstico de falla ovárica prematura en 3 y pasan a la Clínica de Climaterio (Tabla 9).

Tabla 9.- Pacientes con mosaicismo del X detectadas por esterilidad

Caso	Edad	Cariotipo	Estatura
5	27	45,X (4)/46,XX (93)/47,XXX (3)	1.51
7	32	46,XX (96)/47,XXX (4)	1.52
12	32	45,X (2)/46,XX (98)	1.46
14	30	45,X (12)/46,XX (86)/47,XXX (2)	1.48
26	33	45,X (2)/46,XX (98)	1.52
39	28	45,X (2)/46,XX (96)/47,XXX (2)	1.53
54	29	45,X (7)/46,XX (93)	1.5

Trece pacientes del estudio tienen el antecedente de hijos con defectos congénitos (Tabla 10), de las pacientes que durante el estudio estaban embarazadas o concluyeron su embarazo se presentaron malformaciones congénitas del tipo defectos del tubo neural, microtia-atresia y síndrome de Down (Figura 21, 22, 23, 24 y 25).

En las Tablas de 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 se presentan el promedio, media, desviación estándar, moda y rango de acuerdo al motivo inicial de consulta por cual ingresaron al estudio.

Tabla 10 .- Casos con antecedentes de Defecto Congénito				
Caso	Edad	Antecedente	Cariotipo	Defecto
17	36	2 abortos, 1 RNP c/DC	45,X (12)/46,XX (84)/47,XXX (4)	Cardiopatía Congénita
24	37	1 aborto, 1 obito, 2 hijos c/ DC	46,XX (96)/47,XXX (4)	2 con Cardiopatía Congenita
28	34	3 abortos (1 c/DC)	45,X (6)/46,XX (92)/47,XXX (2)	Sind. Down
31	32	2 hijos c/DC	45,X (6)/46,XX (94)	1 Sind. Down, 1 Cardiopatía Congénita
33	34	2 obitos (1 c/DC)	45,X (6)/46,XX (92)/47,XXX (2)	1 Sind. Down, 1 Cardiopatía Congénita
35	34	1 aborto, 1 hijo c/DC.	45,X (6)/46,XX (92)/47,XXX (2)	Sind. Down
38	44	2 abortos, 1 hija c/DC	46,XX (92)/47,XXX (8)	Cardiopatía Congénita
41	34	4 abortos, 2 obitos c/DC	45,X (4)/46,XX (92)/47,XXX (4)	Defecto no especificado
42	28	3 abortos, 1 hija c/DC	45,X (2)/46,XX (96)/47,XXX (2)	1 con asociación VACTER
49	39	1 hijo c/DC	46,XX (92)/47,XXX (8)	Defecto no especificado
55	31	2 hijos c/DC	45,X (4)/46,XX (94)/47,XXX (2)	1 Sind. Down, 1 Cardiopatía Congénita
78	31	1 hijo c/DC	46,XX (95)/47,XXX (5)	Atresia Esofágica
81	32	1 hijo c/DC	46,XX (95)/47,XXX (5)	Cardiopatía Congénita



Figura 21. Óbito con defecto del tubo neural.



Figura 22. Óbito con defecto del tubo neural.



Figura 23. Recién nacido con microtia-atresia.



Figura 24. Recién nacido con microtia-atresia.



Figura 25. Recién nacido con Síndrome de Down.

Tabla 11 .- Análisis Estadístico por motivo de consulta: *Aborto*

	# pacientes (%)	Media	Moda	Rango	DS
Edad	55/87 (63.22)	32.65	30	23-40	4.71
	#	Media	Moda	Rango	
Talla		1.51		1.41-1.64	
Embarazos	204	3.71	2	2-8	
Partos	13	0.23	0	0	
Abortos	177	3.21	2	1-8	
Cesareas	9	0.16	0	0-2	
Hijos Vivos	18				
Hijos con Defectos	0				
	Mosaicismo		# (%)		
Cariotipo	45,X/46,XX/47,XXX		24/55 (43.63)		
	45,X/46,XX		20/55 (36.36)		
	46,XX/47,XXX		10/55 (18.18)		
	45,X/46,XX/47,XXX/48,XXXX		1/55 (1.81)		

Tabla 12 .- Análisis Estadístico por motivo de consulta: *Amenorrea*.

	# pacientes (%)	Media	Moda	Rango	DS
Edad	11/87 (13.80)	27.25	26	18-43	6.41
	#	Media	Moda	Rango	
Talla		1.48		1.44-1.58	
Embarazos	0	0	0	0	
Partos	0	0	0	0	
Abortos	0	0	0	0	
Cesareas	0	0	0	0	
Hijos Vivos	0				
Hijos con Defectos	0				
	Mosaicismo		# (%)		
Cariotipo	45,X/46,XX	5/12 (41.66)			
	45,X/46,XX/47,XXX	3/12 (25)			
	46,XX/47,XXX	3/12 (25)			
	46,XX/47,XXX/48,XXXX	1/12 (8.3)			

Tabla 13 .- Análisis Estadístico por motivo de consulta: *Esterilidad*.

	# pacientes (%)	Media	Moda	Rango	DS
Edad	7/87 (8.040)	30.14	32	27-33	2.26
	#	Media	Moda	Rango	
Talla		1.5		1.43-1.63	
Embarazos	0	0	0	0	
Partos	0	0	0	0	
Abortos	0	0	0	0	
Cesareas	0	0	0	0	
Hijos Vivos	0				
Hijos con Defectos	0				
	Mosaicismo		# (%)		
Cariotipo	45,X/46,XX	3/7 (42.85)			
	45,X/46,XX/47,XXX	3/7 (42.85)			
	46,XX/47,XXX	1/7 (14.28)			

Tabla 14 .- Análisis Estadístico de mujeres de *Hijos con Alteraciones Cromosómicas*.

	# pacientes (%)	Media	Moda	Rango	DS
Edad	5/87 (5.74)	33.4	34	32-34	0.89
	#	Media	Moda	Rango	
Talla		1.54		1.45-1.69	
Embarazos	17	3.4	3	2-5	
Partos	2	0.04	0	0-1	
Abortos	11	2.2	3	0-4	
Cesareas	4	0.8	0	0.2	
Hijos Vivos	3				
Hijos con Defectos	3				
	Mosaicismo		# (%)		
Cariotipo	45,X/46,XX/47,XXX		5/5 (100)		

Tabla 15 .- Análisis Estadístico de mujeres de *Hijos con Defecto Congénito*.

	# pacientes (%)	Media	Moda	Rango	DS
Edad	4/87 (4.60)	33.25	31	31-39	3.86
	#	Media	Moda	Rango	
Talla		1.54		1.49-1.62	
Embarazos	7	1.75	2	1-2	
Partos	3	0.75	1	0-1	
Abortos	0	0	0	0	
Cesareas	4	1	1	0-2	
Hijos Vivos	1				
Hijos con Defectos	4				
	Mosaicismo		# (%)		
Cariotipo	46,XX/47,XXX		2/4 (50)		
	45,X/46,XX		1/4 (25)		
	45,X/46,XX/47,XXX		1/4 (25)		

Tabla 16 .- Análisis Estadístico por motivo de consulta: *Aborto e Hijos con Defectos*

	# pacientes (%)	Media	Moda	Rango	DS
Edad	4/87 (4.60)	33.25		28-44	6.89
	#	Media	Moda	Rango	
Talla		1.53	0	1.44-162	
Embarazos	15	3.75	0	2-6	
Partos	5	1.25	0	0-5	
Abortos	7	1.75	1	1-3	
Cesareas	3	0.75	1	0-1	
Hijos Vivos	3				
Hijos con Defectos	3				
	Mosaicismo		# (%)		
Cariotipo	46,XX/47,XXX		3/4 (75)		
	45,X/46,XX/47,XXX		1/4 (25)		

Tabla 17 .- Análisis Estadístico por motivo de consulta: *Todos los Casos.*

	# pacientes (%)	Media	Moda	Rango	DS
Edad	87/87 (100)	31.9	32	18-44	5.11
	#	Media	Moda	Rango	
Talla		1.51		1.41-1.69	
Embarazos	243	2.8	2	0-8	
Partos	23	0.26	0	0-5	
Abortos	195	2.24	0	0-8	
Cesareas	20	0.23	0	0-2	
Hijos Vivos	25				
Hijos con Defectos	8				

DISCUSIÓN.

4. DISCUSION.

La edad de descubrimiento del mosaicismo está en relación con la condición clínica que motiva la asistencia de las mujeres a consulta con el médico. El no contar con un protocolo de estudio y atención adecuado retarda el diagnóstico oportuno y certero.

La aparición de líneas aneuploides no influye en el fenotipo exterior más bien en alteraciones de la reproducción, el peso y talla de los casos se encuentra dentro de los parámetros de la población mexicana.

En las madres de bebés que presentaron Síndrome de Down se observó una asociación con mosaicismo de tres líneas, probablemente por la interrelación que existe entre cromosomas sexuales y el ciclo celular.

Las mujeres afectadas con mosaicismo del X presentaron hipogonadismo e hipogonadotrofia por la atrofia ovárica, originada probablemente desde la etapa prenatal. (9,34,35,36,42)

No se llevó a cabo una valoración completa sobre la relación entre alteraciones de la función tiroidea y mosaicismo del X, aunque sería interesante ahondar más en el tema.

Los pacientes enviados a valoración psicológica aún no han concluido la resolución de su proceso debido a que es difícil conocer si sus alteraciones emocionales son causadas por la alteración cromosómica o el duelo de pérdida. (46,47)

En cuanto a las alteraciones dentales encontradas en las pacientes corresponden a lo reportado por otros autores. (29, 30,31,32)

Los defectos y alteraciones renales corresponden a lo publicado por otros autores.^(33,44) Así como las alteraciones óseas.⁽¹¹⁾

De las alteraciones cardiovasculares, se encontró una cardiopatía isquémica y una cardiopatía compleja no reportadas en la literatura.⁽²⁶⁾

De los defectos congénitos en general predominaron los del tubo neural, la microtia-atresia y el Síndrome de Down.

La frecuencia de los defectos congénitos de hijos de madres con mosaicismo de X no es superior a la población en general, con excepción de las mujeres que presentaron tres líneas celulares en las cuales se observó una asociación.^(16,43)

Los estudios citogenéticos de los productos fueron realizados a partir de muestras prenatales por amniocentesis, en recién nacidos en linfocitos de sangre periférica y en productos de abortos con el mismo tejido, coincidiendo los resultados con otras publicaciones.^(14,35,43)

Corroborar la presencia de mosaicismo X en otros tejidos no es una posibilidad a seguir debido a que las células aneuploides tienden a perderse cuando el tiempo de cultivo es muy prologado, además de la situación per se.⁽¹⁹⁾

Cuando se analizan algunos datos separándolos por grupos de acuerdo a la causa inicial de consulta se encuentran ligeras diferencias, para una conclusión valida se requiere un estudio con una población mayor que permita una comparación objetiva.

CONCLUSIONES.

5. CONCLUSIONES:

1. El mosaicismo de cromosoma “X” es una alteración que hasta el momento no se había estudiado en forma integral.
2. La causa más frecuente de consulta de estas pacientes es el aborto recurrente.
3. El mosaico que más se presenta son las líneas: 45,X/46,XX/47,XXX
4. No se encontraron secuencias del “Y”, en ninguna paciente.
5. Estas mujeres pueden presentar alteraciones fenotípicas a nivel reproductivo.
6. El riesgo para la descendencia es variable.
7. Es importante el ingreso de estas pacientes a un protocolo de estudio multidisciplinario e interdisciplinario.
8. En caso de embarazo posterior es de gran importancia el seguimiento hasta su resolución, así como la realización de estudios de diagnóstico prenatal y seguimiento del recién nacido.

Con lo anterior proponemos el siguiente esquema de flujo para la atención de los pacientes.

Flujograma de estudio.

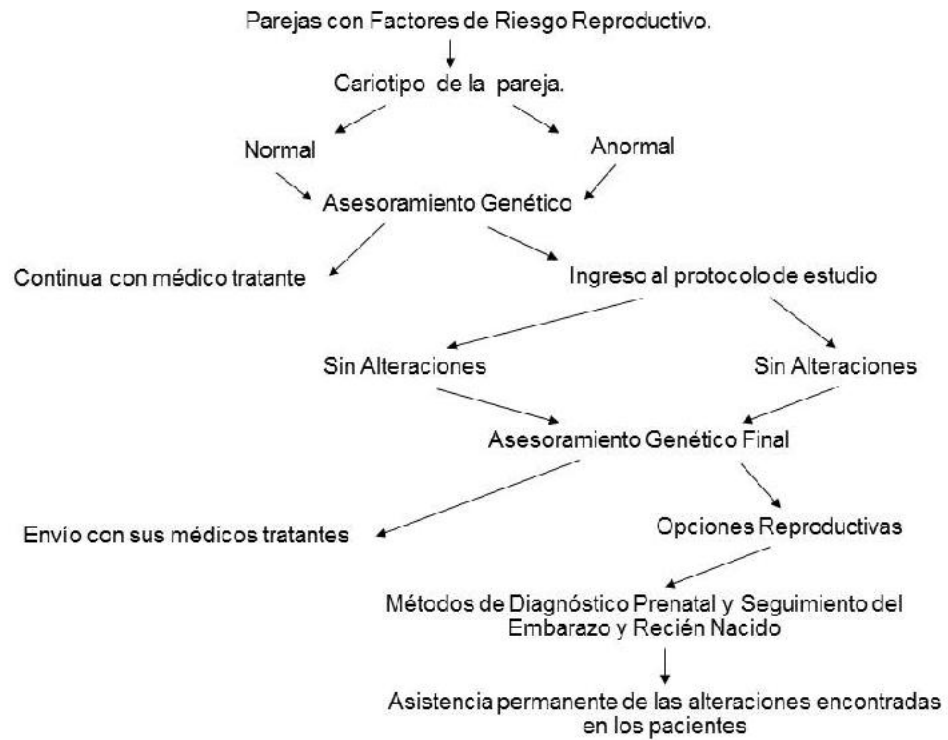


Figura 26. Propuesta de flujograma para atención de pacientes con mosaicismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Carlson B. Embriología Humana y Biología del Desarrollo, edit. Harcourt.
2. Christin-Maitre S, Ronci-Chaix N, Bouchard P. Ovary genes and molecular pathology. *J Soc Biol* 2002; 196(3): 207-16.
3. Tong ZB, Bondy CA, Zhou J, Nelson LM. A human homologue of mouse Mater, a maternal effect gene essential for early embryonic development. *Human Reprod* 2002 Apr; 17(4): 903-11.
4. Sinisi AA, Pasquali D, Notaro A, Bellastella A. Sexual differentiation. *J Endocrinol Invest* 2000; 26(3 Suppl): 23-8.
5. Gurates B, Amsterdam A, Tamura M, Yang S, Zhou J, Fang Z, Sebastian S, Bulun SE. *Moll Cell Endocrinol* 2003 Oct; 208(1-2): 61-75.
6. Jameson JL, Achermann JC, Ozisik G, Meeks LL. Battle of the sexes: new insights into genetic pathways of gonadal development. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2003; 114: 51-63.
7. Federman D. Three facets of sexual differentiation. *N Engl J Med* 350(4) Jan 22: 323-4, 2004.
8. Simpson JL, Rajkovic A. Ovarian differentiation and gonadal failure. *American Journal of Medical Genetics* 1999 Dec 29; 89(4): 186-200.
9. Santoro N. Research on the mechanisms of premature ovarian failure. *J Soc Gynecol Investig* 2001 Jan; 8(1 Suppl 1): S10-S12.
10. Laml T, Schul-Lobmeyr I, Obruca A, Huber JC, Hartmann BW. Premature ovarian failure: etiology and prospects. *Gynecol Endocrinol* 2000 Aug; 14(4): 292-302.
11. Eastell R. Management of osteoporosis due to ovarian failure. *Med Pediatr Oncol* 2003 Sep; 41(3): 222-7.
12. Zinn AR. The X chromosome and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 2001 Jan; 8(1 Suppl 1): S34-S36.
13. Forges T, Monnier-Barbariano P, Faure G. What are the antigenic targets in the ovary?. *Gynecol Obstet Fertil* 2003 Sep; 31(9): 759-65.
14. Zinn AR, Ross JL. Molecular analysis of genes on Xp controlling Turner syndrome and premature ovarian failure. *Semin Reprod Med* 2001 Jun; 19(2): 141-6.

-
15. Gartier SM., Goldman MA. (2001). Biology of the X chromosome. *Current Opinion Pediatrics* 13: 340-345.
 16. Guízar-Vázquez J. (2001). *Genética Clínica*. Tercera edición. Editorial El Manual Moderno, México, pp. 669-704.
 17. Thompson & Thompson. (2000). *Genética en Medicina*. Quinta edición. Editorial Masson, México. pp. 13-19, 191-207.
 18. Salamanca F. (1993). *Citogenética Clínica*. Primera edición. Editorial Panamericana, México. pp. 43-48, 83-92.
 19. Barch MJ. (1991) The A.C.T. (Association of Cytogenetic Technologist). *Cytogenetic Laboratory Manual*. Second edition. Raven Press. NY. pp. 149-187.
 20. Mitelman F. (1995). *ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)*. Editorial Karger. p 104.
 21. Pasquino AM., Passeri F., Pucarrelli I., Segni M., Municchi G. (1997). Spontaneous Pubertal development in Turner's syndrome. Italian study Group for Turner's syndrome. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism* 82: 1810-1813.
 22. Alkhayyat H., Christesen HB., Steer J., Stewart H, Brusgaard K, Hussain K. (2006). Mosaic Turner syndrome and hiperinsulinaemic hipoglycaemia. *Journal pediatric Endocrinology metabolism* 19: 1451-1457.
 23. Tsezou A., Hadjiathanasiou C., Gourgiotis D., Galla A., et al. (1999). Molecular genetics of Turner syndrome : correlation with clinical phenotype and response to growth hormone therapy. *Clinical Genetics* 56: 441-446.
 24. Pirazzoli P., Mazzanti L, Bergamasch R., Perri A., et al. (1999). Reduced spontaneous growth hormone secretion in patients with Turner's syndrome. *Acta Paediatrica* 88 : 610-613.
 25. Mazzanti L., Cacciari E., Bergamaschi R., Tassinari D., et al. (1997). Pelvic ultrasonography in patients with Turner syndrome : age related findings in different karyotypes. *Journal Pediatrics* 131: 135-140.
 26. Couceiro Gianzo JA., Pérez Cobeta R., Fuster Siebert M., et al. (1996). The Turner syndrome and cardiovascular changes. *Español Pediatría* 44: 242-244.
 27. Mimasaka S., Ohtsu Y., Tsunenari S., Matsukawa A., et al. (2007). Sudden death of a young woman due to aortic dissection caused by Turner's syndrome. *Pathology International* 57: 219-223.

-
28. El-Mansoury M., Barrenas ML., Bryman I., Hanson C., et al. (2007). Chromosomal mosaicism mitigates stigmata and cardiovascular risk factors in Turner syndrome. *Clinical Endocrinology* 66: 744-751.
 29. Varrela J. (1992). Effect of 45,X/46,XX mosaicism on root morphology of mandibular premolars. *Journal Dental Research* 71: 1604-1606.
 30. Midtbo M., Halse A. (1994). Root length, crown height, and root morphology in Turner syndrome. *Acta Odontologic Sandinavia* 52: 303-314.
 31. Midtbo M., Halse A. (1996). Oclussal morphology in Turner syndrome. *European Journal Orthodoney* 18: 103-109.
 32. Pirttiniemi P., Alvesalo L., Silvén O, Heikkilä., et al. (1998). Asymmetry in the occlusal morphology of first permanent molars in 45,X/46,XX mosaics. *Archive Oral Biology* 43: 25-32.
 33. Bilge I., Kayserili H., Emre S., Nayir A., Sirin A., et al. (2000). Frecuency of renal malformations in Turner syndrome: analysis of 82 Turkish children. *Pediatrics Nephrology* 14: 1111-1114.
 34. Wu RC., Kuo PL., Lin SJ., Liu CH., Tzeng CC. (1993). X chromosome mosaicism in patients with recurrent abortion or premature ovarian failure. *Journal Formos Medical Association* 92: 953-956.
 35. Kuo PL., Guo HR. (2004). Mechanism of recurrent spontaneous abortions in woman with mosaicism of X-chromosome aneuploidies. *Fertility and Sterility* 82: 1594-1601.
 36. Devi AS., Metzger DA., Luciano AA., Benn PA. (1998) 45,X/46,XX mosaicism in patients with idiopathic premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 70: 89-93.
 37. McDougall, Alex; Elliott, David J.; Hunter, Neil. Pairing, connecting, exchanging, pausing and pulling chromosomes. Meeting on the Cell-Cycle Regulation of Meiosis. *EMBO reports*. 2005. 6:2 p120-125
 38. Brown, Carolyn J.; Carrel , Laura; Willard, Huntington F.. Expression of Genes from the Human Active and Inactive X Chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 60:1333-1343, 1997
 39. Chow, Jennifer C.; Yen, Ziny; Ziesche, Sonia M.; Brown, Carolyn J.. Silencing of the Mammalian X Chromosome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005. 6:6 p69-92
 40. Singh DN, Hara S, Foster HW, Grimes EK. (1980). Reproductive performance in women with sex chromosome mosaicism. *Obstet Gynecol* 55:608-11.

-
41. 2.Jasen LW, Rechard JC, Daniel WM, Robert JW, Mary LM, Sharon L. (2009). Cryptic subtelomeric rearrangements and X chromosome mosaicism: a study of 565 apparently normal individuals with fluorescent in situ hybridization. *Plos ONE* 4(6):5855-5858.
 42. Diao FY, Xu M, Liu JY.. Analysis of X chromosome mosaicism in patients with premature ovarian failure by fluorescent in-situ hybridization. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2003 Jan;38(1):20-3
 43. Kiss A, Rosa RF, Dibi RP, Zen PR, Pfeil JN, Graziadio C, Paskulin GA.. Chromosomal abnormalities in couples with history of recurrent abortion. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009 Feb;31(2):68-74
 44. Kirillova EA, Rozovskiĭ IS.. Interpretation of the karyotype characteristics of patients with developmental defects of the urogenital system. *Tsitol Genet*. 1980 Jan-Feb;14(1):55-9.
 45. Fernández-García R, García-Doval S, Costoya S, Pásaro E.. Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: a study of 'hidden' mosaicism. *Clin Genet*. 2000 Sep;58(3):201-8
 46. Shapiro LR, Simensen RJ, Wilmot PL, Fisch GS, Vibert BK, Fenwick RG, Tarleton J, Phelan MC.. Asymmetry of methylation with FMR-1 full mutation in two 45,X/46,XX mosaic females associated with normal intellect. *Am J Med Genet*. 1994 Jul 15;51(4):507-8
 47. Kumra S, Wiggs E, Krasnewich D, Meck J, Smith AC, Bedwell J, Fernandez T, Jacobsen LK, Lenane M, Rapoport JL.. Brief report: association of sex chromosome anomalies with childhood-onset psychotic disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1998 Mar;37(3):292-6.