

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“DETECCIÓN TEMPRANA DE POLISOMÍA DEL X MEDIANTE LA
CUANTIFICACIÓN DE LA DOSIS GÉNICA DE *SHOX* Y *VAMP7* POR Q-PCR
EN MUESTRAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO”**

Por

DRA. ISABEL MORENO VEGA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

FEBRERO 2017

**“DETECCIÓN TEMPRANA DE POLISOMÍA DEL X MEDIANTE LA
CUANTIFICACIÓN DE LA DOSIS GÉNICA DE *SHOX* Y *VAMP7* POR Q-PCR
EN MUESTRAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO”**

Aprobación de la tesis:

**Dra. Marisol Ibarra Ramírez
Director de tesis**

**Dra. Med. Laura Elia Martínez Garza
Miembro de la Comisión de Tesis**

**Dr. Luis Daniel Campos Acevedo
Miembro de la Comisión de Tesis**

**Dr. Ricardo Cerda Flores
Miembro de la Comisión de Tesis**

**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado**

AGRADECIMIENTOS

A Dios que a lo largo de la vida me ha permitido seguir adelante y me ha mostrado lo extraordinario de su creación.

A mi **Padre** que en vida siempre me apoyó y cuidó de mí y ahora estoy segura que lo sigue haciendo día a día aunque no lo pueda ver.

A mi **Madre** ejemplo de fortaleza que me permitió continuar con mis sueños y que hasta hoy continúa haciendo.

A mis hermanos **Karla, Reyna y Saúl** que de alguna u otra forma han cuidado de mí.

A mis sobrinos **Lucero y Saúl Alejandro** por brindarme sonrisas que me inspiraban para continuar.

A la Dra. Laura Martínez y profesores del área clínica que han compartido sus conocimientos y experiencias para formar un profesional de calidad.

A la Dra. Roble y Química Luz que no sólo fueron parte del equipo académico de profesores sino que formaron parte de una familia más, gracias por sus enseñanzas académicas y a nivel personal.

A todos los químicos que brindaron parte de su tiempo a enseñar, gracias área de citogenética, biología molecular y bioquímica.

A Azalia que representó más que una recepcionista, fue una amiga que me ayudó a recorrer estos 3 años. A las secretarias y personal de limpieza que estuvieron ahí para brindar una sonrisa y palabras de aliento, pues el residente no solo se forma por personal académico sino de todo un entorno.

A mis compañeros (as) residentes y amigos, *gracias*.

TABLA DE CONTENIDO

Página

CAPITULO I

1. RESUMEN.....	1
------------------------	----------

CAPÍTULO II

2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Epidemiología.....	15
2.2 Etiología.....	15
2.3 Características clínicas.....	16
2.4 Diagnóstico.....	18
2.5 El diagnóstico prenatal.....	19
2.6 Tamiz neonatal.....	19
2.7 Manejo.....	21
2.8 Antecedentes.....	23
2.9 Justificación.....	28

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS.....	29
--------------------------	-----------

CAPÍTULO IV

4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos particulares.....	30

CAPÍTULO V

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....31

5.1 Tipo del estudio.....31

5.2 Población de Estudio.....32

5.2.1 Criterios de inclusión.....32

5.2.2 Criterios de exclusión.....32

5.2.3 Criterios de eliminación.....32

5.3 Descripción del diseño.....33

5.3.1 Recolección de la muestra.....34

5.3.2 Extracción automatizada de ADN.....35

5.3.3 Cuantificación y calidad del ADN.....38

5.4 Metodología general.....40

5.5 Análisis de los datos.....43

5.6 Diagrama general del estudio.....51

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS.....52

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN.....61

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIÓN.....64

CAPÍTULO IX

9. ANEXOS.....	65
9.1 Carta de consentimiento informado.....	65
9.2 Cuestionario para datos clínicos.....	74

CAPÍTULO X

10. BIBLIOGRAFÍA.....	76
------------------------------	-----------

CAPÍTULO XI

11. AUTOBIOGRAFÍA.....	82
-------------------------------	-----------

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Fenotipo reportado en literatura de pacientes con Polisomía del X.....	16
2. Seguimiento de pacientes con Polisomía del X.....	21
3. Dosis génica con probable Polisomía del X.....	52
4. Resumen clínico de las pacientes encontradas.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Fenotipo variable en pacientes con Polisomía del X.....	18
2. Representación esquemática del ensayo qPCR.....	26
3. Regiones pseudoautosómicas y genes marcadores utilizados.....	34
4. Esquema del diseño general.....	51
5. Cariotipo caso 1.....	53
6. Cariotipo caso 2.....	54
7. Cariotipo caso 3.....	55
8. Caso 1.....	59
9. Caso 2.....	59
10. Caso 3.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa.

qPCR: PCR cuantitativa o en tiempo real.

SHOX: Gen Short-stature Homeobox.

VAMP7: Gen Vesicle –associated membrane protein 7.

SRY: Gen Sex-determining región Y.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

XIST: Gen X-inactive specific transcript.

XIC: Centro de inactivación del cromosoma X.

TSIX: X-Inactivation-Specific Transcript-Antisense.

PAR´s: Regiones Pseudoautosómicas.

PAR1: Región Pseudoautosómica 1.

PAR2: Región Pseudoautosómica 2.

KALIG1: Kallmann Syndrome Interval Gene 1.

STS: Gen Steryl-Sulfate Sulfohydrolase

RPS4X: Gen Ribosomal Protein S4, X-Linked.

ZFX: Gen Zinc Finger Protein, X-Linked

UBE1: Gen Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 1

IQ: Coeficiente intelectual.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

EEG: Electroencefalograma.

C_T: Cycle threshold.

$\Delta\Delta C_T$: Delta Delta C_T

RQ: Cuantificación relativa.

μL: Microlitros.

RNASE P: Gen Ribonuclease A Family Member 1, Pancreatic

DCC: Displasia Congénita de Cadera.

PC: Perímetro cefálico.

CAPÍTULO I

1. RESUMEN

La trisomía del cromosoma X (47, XXX) es una aneuploidía del cromosoma sexual en el cual las mujeres tienen un cromosoma X extra, comparado a un cariotipo femenino normal 46, XX. La incidencia de esta patología es de aproximadamente de 1 en 1000 mujeres, sin embargo, se estima que sólo el 10% de los casos son diagnosticados. El cariotipo 47, XXX es lo más frecuente, el 10% de los casos ocurren en forma de mosaico 46, XX/47/XXX o 47, XXX/48, XXXX, o en combinación con líneas celulares monosómicas tales como 45,X/47,XXX o 45,X/46,XX/47,XXX. La trisomía del X ocurre como un evento de no disyunción en meiosis I materna en el 58-63% de los casos, 16-17.4% son derivados de meiosis II y 18-19.6% son secundarios a una no disyunción post-cigótica. El cuadro clínico comprende talla alta, pliegue epicanto, clinodactilia, hipotonía en la infancia, malformaciones genitourinarias, crisis convulsivas, displasias congénita de cadera, dolor abdominal/constipación, falla ovárica prematura. Debido a que Polisomía del X es una patología con amplia variabilidad fenotípica no ha sido posible un diagnóstico clínico oportuno, por lo que se considera una patología sub-diagnosticada, ya que no se cuenta con una metodología que permita el diagnóstico temprano.

Se han diseñado metodologías basadas en la PCR para la detección temprana de las aneuploidías más frecuentes (cómo Síndrome de Turner), la qPCR o PCR en tiempo real es una metodología rápida, sensible, de alto rendimiento y que

puede automatizarse por lo que ha sido considerada como una metodología eficaz en el diagnóstico de cromosomopatías numéricas.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la utilidad de la cuantificación de la dosis génica mediante la técnica qPCR como método para la detección temprana de pacientes con Polisomía del X en muestras de sangre en papel filtro de la población neonatal, así como establecer la incidencia de tal patología en la población del noreste del país.

Se obtuvieron un total de 10,033 muestras, 4945 corresponden a mujeres, 5088 corresponden a hombres, todas tomadas en recién nacidos. Se les realizó análisis de qPCR y los recién nacidos con resultados de perfil de aneuploidía para Polisomía del X se analizaron con un cariotipo bandas GTG.

En el estudio se encontró que el análisis de la dosis génica de marcadores localizados en las regiones pseudoautosómicas como *SHOX* y *VAMP7* pueden ser de utilidad en la detección de pacientes con Polisomía del X. En el estudio se detectaron 3 pacientes con Polisomía del X, lo cual permite una incidencia en la población del noreste del país de 1 en 1648 recién nacidas.

CAPÍTULO II

**DETECCIÓN TEMPRANA DE POLISOMÍA DEL X MEDIANTE LA
CUANTIFICACIÓN DE LA DOSIS GÉNICA DE *SHOX* Y *VAMP7* POR Q-PCR
EN MUESTRAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO**

2. INTRODUCCIÓN

El genoma humano está constituido por 46 cromosomas, dispuestos en 23 pares. De estos 23 pares, 22 son semejantes en los hombres y las mujeres, y se denominan autosomas; su numeración va desde el más grande al más pequeño.¹ El par restante está constituido por los cromosomas sexuales: dos cromosomas X en las mujeres y la combinación de un cromosoma X y un cromosoma Y en los hombres.²

Cada cromosoma contiene un conjunto diferente de genes dispuestos linealmente a lo largo de su DNA. Los miembros de un par de cromosomas (denominados homólogos), contienen información genética congruente entre sí; es decir, poseen los mismos genes y en la misma secuencia.² Sin embargo, en un locus específico pueden existir formas idénticas o ligeramente diferentes del mismo gen, denominados alelos.² En las mujeres, los cromosomas sexuales (los dos cromosomas X) son también prácticamente indistinguibles entre sí. Sin embargo, en los hombres, los cromosomas sexuales son diferentes uno de otro. Uno de ellos es un cromosoma X, idéntico a los dos cromosomas X de la mujer; el hombre hereda este cromosoma X de su madre y los transmite a sus hijas. El otro

miembro del par de cromosomas es el Y, que el hombre hereda de su padre y que transmite a sus hijos.²

La composición de los genes existentes en el genoma humano, así como los determinantes de su expresión, queda especificada en el DNA de los 46 cromosomas humanos existentes en el genoma humano, así como en el DNA mitocondrial. Cada cromosoma humano está constituido por una única doble hélice de DNA continuo, sumando en total más de 6000 millones de nucleótidos.¹

En el interior de cada célula, el genoma se dispone formando la cromatina, en la que el DNA genómico forma complejos con varias clases de proteínas cromosómicas. En la cromatina, las moléculas de DNA de un cromosoma forma un complejo con una familia de proteínas cromosómicas denominadas histonas, y con un grupo heterogéneo de proteínas no histonas que desempeñan un papel clave en el establecimiento de un entorno apropiado que permita el comportamiento normal de los cromosomas y la expresión genética adecuada.²

Dos copias de cada una de las histonas nucleares H2A, H2B, H3 y H4 constituyen un octámero, alrededor del cual se enrolla un segmento de doble hélice de DNA.

³Con cada octámero se asocian aproximadamente 140pb a su alrededor dando al menos 1.7 vueltas. Tras un corto segmento espaciado de DNA se forma el siguiente complejo DNA-octámero y así sucesivamente, lo que confiere a la cromatina un aspecto de collar de perlas.³ Cada complejo de DNA con su núcleo de histonas se denomina nucleosoma, que es la unidad estructural básica de la cromatina.³ La histona H1, se enlaza con el DNA en el margen de cada nucleosoma, en la región espaciadora internucleosómica. El patrón de los tipos

principales y especializados de histonas, junto con sus modificaciones, se denomina código de histonas, dicho código se considera, que es responsable de la manera en que es empaquetado el DNA, de forma que quede accesible a las moléculas reguladoras que determinan la expresión génica.³ Las largas hebras de nucleosomas están, a su vez empaquetadas en una estructura cromatínica helicoidal secundaria llamada solenoide, la cual, parece ser la unidad fundamental de la organización de la cromatina. A su vez, los solenoides se organizan en forma de bucles o dominios y se acoplan, a intervalos de 100kb, a un conjunto de proteínas no histonas que forman la matriz extracelular.²

Así pues, toda la información genética está debidamente empaquetada en los cromosomas y cualquier anomalía en el número o en la estructura del cromosoma se verá reflejada en el fenotipo del individuo.

Las anomalías cromosómicas son tanto autosómicas como sexuales y se clasifican en numéricas y estructurales.⁴

Las alteraciones numéricas pueden ser **aneuploidía** o **poliploidía**, siendo las primeras la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas, es decir, cualquier número de cromosoma no múltiplo de su número haploide de 23 pares de cromosomas; pueden ser monosomía (pérdida de un cromosoma), trisomía (ganancia de un cromosoma) o tetrasomía (ganancia de dos cromosomas). Las aneuploidías son debidas a una no disyunción por lo general en meiosis I, lo que

ocasiona que el gameto contenga ambos homólogos de una pareja de cromosomas, se destacan por su frecuencia e implicación biológica.⁴

La no disyunción en la meiosis produce gametos con 22 o 24 cromosomas, que después de la fecundación por un gameto normal producen un cigoto trisómico o monosómico. La no disyunción en la mitosis crea un mosaico.^{2,4}

Otro mecanismo involucrado en la no disyunción es un retraso en la anafase, en donde existe una falla de un cromosoma o una cromátide para incorporarse en uno de los núcleos hijos después de la división celular, como resultado del movimiento tardío (retraso) durante la anafase. Los cromosomas que no penetran en el núcleo de la célula hija se pierden.^{2,4}

Las segundas corresponden a la adición de uno o más complementos haploides, pudiendo ser triploidía (69 cromosomas) o tetraploidía (92 cromosomas). La triploidía se encuentra a menudo en el material formado en los abortos espontáneos, la supervivencia más allá de la mitad del embarazo es rara. Puede ser por un fallo en la maduración de la división meiótica en un óvulo o en un espermatozoide que conduce, a la retención de un cuerpo polar o a la formación de un espermatozoide diploide. Alternativamente, se puede producir por la fertilización de un óvulo por dos espermatozoides, situación conocida como dispermia.⁴

Las alteraciones estructurales se definen por alteraciones en la forma del cromosoma como son las deleciones, duplicaciones, translocaciones, inversiones, anillos, etc.⁴

El Síndrome de Klinefelter es la aneuploidía más común con una frecuencia de 1:500 recién nacidos,⁵ en el caso específico de los cromosomas sexuales la aneuploidía que sigue en frecuencia es la Polisomía del X al presentarse 1 en 1000 recién nacidas, la misma frecuencia es reportada en los individuos 47, XYY y para el caso de las monosomías el síndrome de Turner es la única monosomía completa, compatible con la vida y se reporta en 1:2000-2500 recién nacidas vivas.⁶

Las aneuploidías sexuales (con excepción en algunos casos clásicos de Síndrome de Turner) no se diagnostican en etapas neonatales, el diagnóstico de la mayor parte de los pacientes se realiza en la vida adulta por problemas de fertilidad y/o alteraciones en la talla. Su detección tardía retrasa o impide tratar las comorbilidades asociadas a estos síndromes en un tiempo oportuno como cardiopatías, depresión, malformaciones renales, alteraciones esqueléticas, alteraciones endocrinológicas y metabólicas. Algunas de las cuales pueden afectar su sobrevida. Su manejo es tarea multi e interdisciplinaria, por lo tanto, es importante detectar estas condiciones en etapas tempranas, de esta manera, el individuo afectado tendrá una mejor calidad de vida, que permita su adecuada integración en la sociedad y un entorno de desarrollo más favorable para él y su familia.

Inactivación del cromosoma X.

En el locus Xq13 se encuentra el gen *XIST=XITE* (X inactivo transcrito específico), el cual es responsable de la inactivación de uno de los dos cromosomas X de la mujer. ⁷

En 1961 la genetista inglesa Mary F. Lyon propuso que las mujeres (y las hembras de los mamíferos) no expresan por partida doble los genes de sus dos cromosomas X en sus células somáticas, sino solo los genes de uno de ellos (en los ovocitos se expresan los dos cromosomas X). ⁸

Lyon propuso que en una fase temprana de la vida embrionaria (a los 14 días de la fertilización en el ser humano) tiene lugar un proceso especial, por el cual cada célula del macizo celular interno del embrión selecciona por azar uno de los dos cromosomas X, el materno o el paterno, para que sea inactivado, una vez realizada esa elección todas las células hijas mantienen ese cromosoma específico inactivo, es decir, se forman clones o líneas celulares que mantienen inactivo el cromosoma X paterno y otros clones que mantienen inactivo al cromosoma X materno, de lo que resulta un embrión que es un mosaico para el cromosoma X_m (materno) y X_p (paterno).⁷

Todas las células somáticas de la mujer tienen un cromosoma X inactivo (generalmente visible como un corpúsculo de cromatina condensada) ese cromosoma X no es el mismo en células diferentes (puede ser el X_p o el X_m).⁷

La inactivación o lionización (llamada así por el nombre de la investigadora, Mary Lyon) de un cromosoma X, al convertir a la mujer en un mosaico celular para los cromosomas X, opera para producir una protección propia del sexo femenino frente a la presencia de mutaciones perjudiciales en uno de sus cromosomas X.²

La mujer es funcionalmente hemicigota para los genes ligados al cromosoma X pero posee dos poblaciones celulares que expresan la hemicigocidad respecto de cada uno de sus dos cromosomas X, mientras que el varón es hemicigoto obligado y siempre expresa las mutaciones perjudiciales, lo que implica una ventaja genética significativa para el sexo femenino.²

El mecanismo de lionización determina que las células femeninas y las células masculinas expresen una cantidad similar de producto génico ligado al cromosoma X a pesar de que las primeras poseen dos cromosomas X. Este fenómeno se denomina “*compensación de dosis génica*” y es común a todos los mamíferos; también existe un fenómeno de compensación de dosis génica en los invertebrados, pero basado en un mecanismo diferente del de los mamíferos, sin el gen *XIST* y la lionización de un cromosoma.⁹

Mecanismo responsable de la lionización del cromosoma X

La lionización de uno (o más, en los casos de polisomía) de los cromosomas X es un fenómeno mucho más complejo que la simple condensación e inactivación del cromosoma. Se trata de un proceso de desarrollo que afecta al cromosoma X en etapas sucesivas que todavía no se conoce del todo. Las etapas de este proceso se pueden clasificar en 3 partes:^{2,7}

a) **Etapa de preionización.** Abarca desde la fertilización hasta el día 14 del desarrollo embrionario humano. Muestra que el cigoto femenino y las etapas de dos y de 4 blastómeros (totipotenciales) expresan sus dos cromosomas X pero sin transcribir el gen *XIST*, al llegar a esta última etapa de 4 blastómeros empieza a expresarse en forma diferencial el gen *XIST*: sólo se expresa en el cromosoma X, la expresión precoz (en el estado de 4 blastómeros) del gen *XIST* se asocia con el origen paterno, precisamente porque el gen *XIST* es demetilado en la profase meiótica paterna, continúa así en el espermatozoide y entra en el cigoto preparado para una expresión precoz, a diferencia del gen *XIST* de origen materno. La expresión diferencial de un gen ya sea paterno o materno, se denomina impronta génica, porque de alguna manera el gen conserva una huella o "impronta".²

Además de su estado de hipometilación en el cromosoma Xp, para expresarse el gen *XIST* requiere un factor citoplasmático presente en el ovocito. Posteriormente, al formarse el trofoblasto, se produce exclusivamente en las células trofoblásticas la inactivación selectiva del cromosoma Xp; por consiguiente, esta inactivación no es una ionización sino el resultado de la impronta génica del cromosoma X paterno.⁷

b) **Etapa de lionización.** Se desarrolla aproximadamente el día 14 pero con diferencias de tiempo en distintas células, de lo que resulta una distribución irregular de la inactivación en diferentes tejidos. Comienza con el borrado de la

impronta génica en las células del macizo celular embrionario que dan lugar al embrión, dicho borrado ocurre al mismo tiempo que una demetilación general del genoma de las células embrionarias y por eso se cree que ambos procesos están vinculados entre sí. Al mismo tiempo, el factor de origen materno necesario para la expresión del *XIST*, que en apariencia se agota rápidamente en las células proliferantes del macizo y que corresponde a un gen con impronta materna, empieza a ser producido nuevamente, en ese momento se desarrolla un recuento de cromosomas X, cuyo mecanismo se desconoce, pero cuyo efecto es la inhibición del gen *XIST* en un cromosoma X y la expresión de ese gen en todo otro cromosoma X adicional (la expresión del gen *XIST* conduce a la inactivación del cromosoma en el que está situado el gen: efecto en cis). Uno de los cromosomas X queda activo y el otro silenciado, este proceso se realiza en forma independiente en cada célula, lo que dará origen al mosaicismo X_m/X_p .^{2,7}

- c) **Etapa de poslionización.** Es permanente en la generalidad de las células somáticas, pero no en la línea germinal. Consiste en la transmisión del estado de los cromosomas X en la célula progenitora a las células descendientes. Esta transmisión clonal parece invariable, salvo unas pocas excepciones: células en cultivo, células tumorales y células envejecidas. En la línea germinal los pregonocitos sufren el proceso de lionización pero los revierten en los ovocitos, al comienzo de la profase meiótica, para llegar a ovocitos deslionizados, en los cuales se expresan ambos cromosomas X.²

El gen *XIST*, localizado en Xq13 tiene una organización muy peculiar porque no posee marcos de lectura abiertos de extensión apropiada para codificar polipéptidos; en realidad el gen *XIST* se transcribe pero no se traduce en ningún polipéptido significativo. El producto del gen *XIST* es directamente un ARN que actúa sobre el propio cromosoma X (en cis) mediante un mecanismo poco conocido que parece ser la acumulación progresiva de ese ARN sobre la región periférica al gen, lo que provoca un cambio de conformación de la cromatina que se va extendiendo y finalmente abarca todo el cromosoma, con inhibición de su actividad transcripcional.²

Las secuencias del gen humano *XIST* y las del gen homólogo del ratón *Xist* son poco semejantes, por lo cual no parecen conservadas.⁷

El gen *XIST* consta de 8 exones y su producto de transcripción es mayor de 16 kb, codificante de un ARN no traducible que se va acumulando y “decora” el cromosoma X inactivo. La región entera que contiene el *XIST* (llamado XIC: centro de inactivación del X), región que abarca unas 680kb en el cromosoma X humano incluye otros elementos génicos imprescindibles para la lionización del cromosoma X. Es notable que en esta región (XIC) se produzcan varios transcritos de antisentido, es decir, que se transcriban ambas cadenas en (sentidos opuestos) en el mismo sitio, lo cual producirá transcritos complementarios entre sí que tenderán a silenciar ese sitio.⁷ El transcritos antisentido más importante es el *TSIX*(inversa de *XIST*), que es un transcritos de alrededor de 40kb que se superpone parcialmente con el *XIST*. El tercer elemento importante conocido de la región XIC es un elemento regulador pequeño, rico en

CpG que contienen un ADN minisatélite de 34 nucleótidos, repetidos como unidades. Este regulador, llamado DXPas34 (de X, sitios de H pall, satélite de 34), está situado del lado 3' del gen *XIST* y es esencial para la iniciación de la lionización porque posiblemente sea el sitio de iniciación del transcrito de antisentido *TSIX*. Es probable que el proceso comience a partir de una mínima transcripción del *XIST* en células embrionarias, insuficiente para provocar otros efectos, y de una transcripción antisentido de *TSIX*, que evita acciones posteriores del *XIST*. Si en el momento de inicio de la lionización el regulador de *TSIX*, es decir el elemento DXPas34 recibe una señal (proteína, desconocida) deja de ser el sitio de comienzo del transcrito antisentido *TSIX*, lo que permite la acumulación del *XIST*. A su vez, la acumulación de *XIST* va produciendo sus sucesivos efectos: extensión de la decoración del cromosoma, reclutamiento de la histona especial macroH2A1, metilación de la lisina 9 de la histona H3 de los nucleosomas y desacetilación de las histonas (con la consiguiente condensación de la cromatina), para finalizar con la metilación de regiones controladoras CpG de los genes que van a ser silenciados.⁷

Hay cierto número de genes que a pesar de estar en un cromosoma X inactivo son resistentes al proceso de lionización y mantienen su actividad transcripcional.

Estos genes son:²

- a) Los de la región pseudoautosómica. Los cuales son homólogos entre los cromosomas X y Y de los mamíferos. Las PAR's se comportan como un autosoma y se recombinan durante la meiosis, así los genes en esta región se

heredan como un rasgo autosómico en lugar de una forma estrictamente ligada al sexo. Son dos regiones denominadas PAR1 y PAR2. Los genes localizados en estas regiones pueden ser considerados como candidatos para detectar alteraciones en el número de alelos tanto de un hombre como en mujeres para los casos de aneuploidías de los cromosomas sexuales estos pudieran ser utilizados como marcadores pues son genes que se encuentran en forma diploide en ambos sexos.

- b) Genes cercanos a la región pseudoautosómica como *KALIG1* y *STS*.
- c) Genes cercanos al *XIST*, como *RPS4X*.
- d) Unos pocos genes adicionales en el brazo corto del cromosoma X entre ellos *ZFX* y *UBE1*.

Aproximadamente 5-10% de los genes adicionales en el cromosoma X, fuera de las regiones PAR escapan a la inactivación. Así, en trisomía X, 2 de los 3 cromosomas son inactivados, sin embargo, los genes en las regiones PAR y otros genes que escapan a inactivación son expresados en los 3 cromosomas. Por lo tanto el fenotipo asociado con trisomía X resulta en una sobre-expresión de los genes del cromosoma X. Una excepción es el gen *SHOX*, el cual escapa a la inactivación y está asociado con talla baja en síndrome de Turner y la talla alta observada en la trisomía del X no está asociada.

2.1 Epidemiología

En 1959 se documentó el primer caso de trisomía del X por Jacobson et al. Un par de años después en 1961 se reportó el primer caso de Tetrasomía del X por Carr.¹⁰

Trisomía X corresponde a una de las alteraciones de Polisomía del X, es una anomalía cromosómica sexual con un fenotipo variable causada por la presencia de un cromosoma X adicional en las mujeres (47, XXX). Ocurre en aproximadamente 1 de cada 1.000 nacimientos de niñas.^{11,12} Se estima que sólo el 10% de los casos son diagnosticados.¹³ Los casos detectados han sido de forma prenatal a través de amniocentesis o biopsia de vellosidades coriales, en los casos postnatales a través de cariotipo solicitado por la presencia de hipotonía, retraso del desarrollo o problemas del comportamiento.^{14,15} En México no existen reportes de la incidencia de tal entidad.

2.2 Etiología

La Polisomía del X se produce como resultado de la no disyunción durante la meiosis, aunque una no disyunción postcigótica puede ocurrir en aproximadamente el 20% de los casos generando mosaicos. Estudios del origen parental del cromosoma X adicional en la trisomía X demostraron el 58-63% de los casos derivan de un error en la meiosis I materna, 16-17.4% derivan de un error en la meiosis II materna y el 18-19.6% derivan de un error en la no

disyunción postcigótica. El riesgo de tener hijas con polisomía del X aumenta con la edad materna.^{10,12,16}

El cariotipo 47, XXX es lo más frecuente, el 20% de los casos ocurren en forma de mosaico 46,XX/47,XXX o 47,XXX/48,XXXX, o en combinación con líneas celulares monosómicas tales como 45,X/47,XXX o 45,X/46,XX/47,XXX.^{12,17}

2.3 Características clínicas

El cuadro clínico es muy heterogéneo, desde la infancia se puede detectar un incremento en la velocidad de crecimiento entre los 4 y 8 años, para finalmente tener una estatura promedio por arriba del percentil 75 (80-90%). Los hitos del desarrollo pueden estar retrasados, más de la mitad (55-71%) presentarán hipotonía en la infancia; su IQ se queda por debajo del 90, en cuanto al lenguaje un 75% van a presentar problemas.^{10,12}

En los hallazgos fenotípicos encontraremos:

Característica	% reportado
Pliegue epicanto	32-46%
Cuello Corto	¿?
Clinodactilia	42-65%
Cifosis torácica	¿?
Pubertad temprana	¿?

Displasia de cadera	2-12%
Dolor abdominal/constipación	12-45%
Anomalías genitourinarias	5-16%
Crisis convulsivas	11-15%
Falla ovárica prematura	¿?

Tabla 1. Fenotipo reportado en Polisomía del X. ¿? Se han reportado casos pero se desconoce su porcentaje.

Alteraciones en las imágenes de cerebro representadas por asimetría de ventrículos también se ha observado.¹⁸

Las niñas tienen mayores tasas de retraso motor y del habla, con un aumento del riesgo de déficits cognitivos y de aprendizaje en la edad escolar. Características psicológicas como déficit de atención, trastornos del estado de ánimo (ansiedad y depresión) y otros trastornos psicológicos son más frecuentes que en la población general.¹⁷

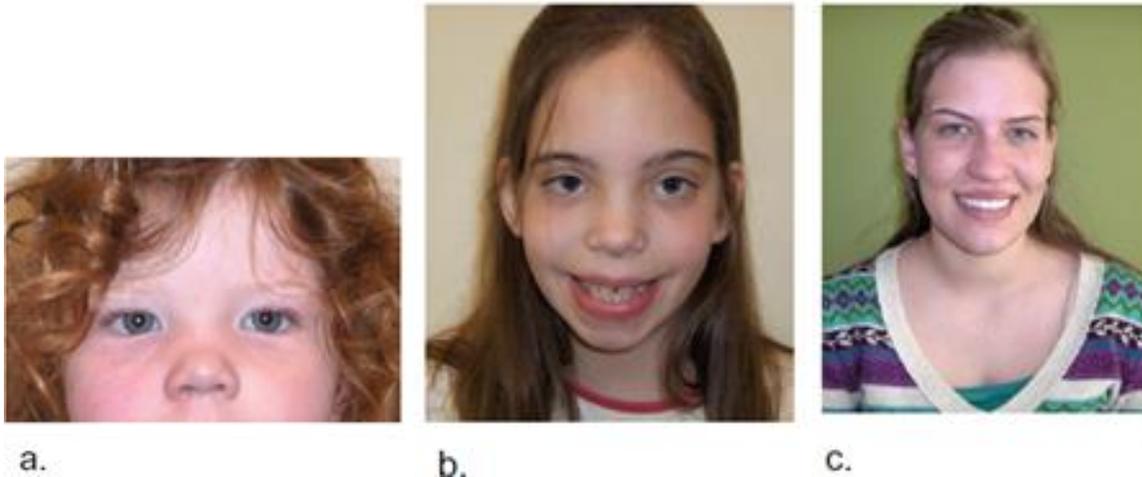


Figura 1. Fenotipo variable en paciente con Polisomía del X. a. pliegue epicanto e hipertelorismo. b. hipertelorismo en una niña de 9 años. c. ausencia de características dismórficas en una paciente de 19 años con trisomía del X.

*Fotografías tomadas de *Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. A review of trisomy X (47,XXX). Orphanet Journal of Rare Diseases. 2010; 5:8*

Debido a la heterogeneidad de sus manifestaciones y a la poca sospecha clínica sólo el 10% son diagnosticados.¹³

2.4 Diagnóstico

Realizar el estudio cariotipo (microfotografía de los cromosomas de un individuo dispuestos de forma estándar¹) sigue siendo el estándar de oro. Las manifestaciones físicas y psicológicas de trisomía del X son variables, por lo que un estudio de cariotipo debe ser considerado en mujeres que presenten¹²:

- Retraso del desarrollo (habla y/o motor).
- Hipotonía.

- Hipertelorismo/pliegue epicanto/clinodactilia.
- Talla alta.
- Falla ovárica prematura
- Discapacidad de aprendizaje/discapacidad intelectual.
- Déficit de atención/Trastorno por déficit de atención e hiperactividad.
- Ansiedad y/o síntomas psiquiátricos.

2.5 Diagnóstico prenatal

El diagnóstico durante el período prenatal mediante amniocentesis o muestreo de vellosidades coriónicas ha sido hallazgo, ya que no hay dato de ultrasonido obstétrico frecuente en estas pacientes que sea justificante para realizar estudio de cariotipo en busca de Polisomía del X.¹⁹

2.6 Tamiz neonatal

En el año de 2012 la Secretaría de Salud federal lanzó el Programa Piloto de Tamizaje Neonatal Ampliado en tres estados de la república, siendo uno de ellos el estado de Nuevo León.²⁰ Este programa brindará a 30,000 recién nacidos en nuestro estado la oportunidad de detectar enfermedades metabólicas utilizando pruebas bioquímicas especializadas siendo posible la detección de hasta 39 enfermedades, las cuales presentan una sintomatología semanas o incluso años después de su nacimiento generando el riesgo de desarrollar

secuelas tan graves como la muerte súbita o discapacidad intelectual severa. Estas 39 enfermedades están comprendidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2002" Para la Prevención y Control de los Defectos al Nacimiento".²¹ En el estado de Nuevo León, todos los recién nacidos en el Hospital Universitario automáticamente entran al programa de Tamiz neonatal ampliado el cual consiste en recolectar una muestra de sangre de talón en papel filtro S&S 903 después de la 24 horas y antes de la primer semana de vida. Una vez procesadas las muestras, se evalúan los resultados con valores de referencia establecidos en la población mexicana.¹⁹ Actualmente diversos países han buscado ampliar el número de enfermedades que puedan ser diagnosticadas a través del uso de muestra de sangre en papel filtro, tal es el caso de enfermedades de origen genético que pueden ser evaluadas a través de la extracción de ADN de las muestras.

En el caso de la polisomía del X se considera una enfermedad que puede ser considerada un buen candidato a pruebas de tamizaje, ya que al utilizar una metodología de tamiz neonatal se podrá identificar anomalías de los cromosomas sexuales en individuos fenotípicamente normales; teniendo un diagnóstico a etapas tempranas se podrá implementar programas de atención y seguimiento para las distintas comorbilidades de esta patología.

Algunas metodologías para la detección de aneuploidías a través de tamizaje están basadas en PCR, como es el Southern Blot, pero tienen algunos inconvenientes como el costo elevado, además de que requiere un mayor tiempo

de inversión para su realización. Otros han sido la pirosecuenciación como lo realizó Rivkees et al. pero ha sido poco práctica su aplicación a gran escala ya que implica un alto costo.^{22,23,24} Las metodologías anteriores no han sido validados en muestras de recién nacidos, aún requieren la confirmación diagnóstica por estudio de cariotipo.

2.7 Manejo

Los pacientes deben mantenerse en vigilancia para manejo temprano de las complicaciones y terapia de apoyo en caso de retraso en el desarrollo. Las niñas en edad escolar y las adolescentes se benefician de una evaluación psicológica con énfasis en mejorar las habilidades cognitivas, lenguaje y / o el desarrollo social. Los adolescentes y mujeres adultas que presentan la menarquia tardía, irregularidades menstruales o problemas de fertilidad deben ser evaluados para descartar falla ovárica prematura y realizar su manejo por ginecología. El pronóstico es variable, dependiendo de la gravedad de las manifestaciones así como de su detección temprana y manejo oportuno.^{10,16}

MANEJO PREVENTIVO

	Manejo físico	Manejo psicológico
Periodo prenatal	Examen ultrasonográfico con especial atención a región urogenital.	-

Periodo neonatal	Examen pediátrico.	-
Periodo de preescolar	<ol style="list-style-type: none"> 1. Examen EEG. 2. Examen neurológico, alteraciones de la coordinación. 3. Examen oftalmológico. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Investigación neuropsicológica y soporte educacional subsecuente si es necesario. 2. Investigación lingüística.
Periodo de primaria	<ol style="list-style-type: none"> 1. Examen EEG, si el primer estudio falló. 2. Examen oftalmológico. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Investigación de la función auditiva. 2. Investigación psicológica con enfoque a la función social. 3. Investigación neuropsicológica y definición subsecuente de necesidades educacionales. 4. Soporte a los padres, la familia, maestros y a la niña 47, XXX.
Adolescencia	-	<ol style="list-style-type: none"> 1. Investigación psicológica con enfoque a la función social. 2. Investigación neuropsicológica y definición subsecuente de

		necesidades educacionales. 3. Soporte a los padres, la familia, maestros y a la niña 47, XXX.
Joven	Examen físico en caso de signos clínicos y síntomas.	Investigación ocupacional y soporte ocupacional subsecuente, si es necesario.
Adulto	Examen físico en caso de signos clínicos y síntomas.	Examen psicológico/psiquiátrico en caso de signos y síntomas clínicos.

Tabla 2. Seguimiento de pacientes con Polisomía del X.

2.8 Antecedentes

Actualmente las Polisomías del X son sub-diagnosticadas, ya que no hay un fenotipo clásico, por lo que, existe un retraso en el diagnóstico. Su detección temprana permitirá implementar medidas sobre todo a nivel psicológico, y a nivel reproductivo. Los estudios de diagnóstico oportunos involucran desde el nivel prenatal con los estudios de biopsia de vellosidades coriales y amniocentesis.¹⁹ Se han diseñado metodologías basadas en la PCR para su aplicación en el tamiz de aneuploidía, como el SoutherBlot, pero con la desventaja del costo elevado y el tiempo invertido para su realización. Dichas metodologías no han sido

validados en una muestra de recién nacidos y requieren la confirmación del diagnóstico por cariotipo.^{22,23}

Algunos autores han realizado estudios mediante pruebas moleculares para la detección de aneuploidías mediante PCR, pero principalmente para el síndrome de Turner.^{22,23,24}

Hasta la fecha solo existen reportes para el diagnóstico prenatal de Polisomías del X.¹⁹

Rocha M. N., et.al. (2010) publicó una metodología basada en PCR de tiempo real para cuantificar la dosis génica en pacientes con Síndrome Turner.²⁵

Previamente en el departamento de genética de la Universidad Autónoma de Nuevo León se realizó un estudio piloto para utilizar genes localizados en regiones pseudoautosómicas: *SHOX* (Xp22.33), *VAMP7*(Xq28 y Yq12), *SRY* (Yp11.33). Dicho estudio permitió ver viable la técnica q-PCR en la detección de aneuploidías.^{26,27}

La técnica de q-PCR puede ser considerada como una metodología cuantitativa, eficaz y económica y que puede automatizarse, lo que la convierte en una técnica útil aplicable en pruebas de tamizaje.

La PCR en tiempo real da resultados cuantitativos con relativa facilidad y conveniencia de su uso comparado con algunos métodos más antiguos. Esta técnica fue descrita por Higuchi et al. en 1992.²⁸ La PCR en tiempo real incorpora un lector de fluorescencia que está diseñado para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación, de tal forma que los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos de la PCR basándose en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción y a través del empleo de un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección que es capaz de adquirir y cuantificar la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra.²⁹

Los sistemas de detección de fluorescencia empleados en la PCR en tiempo real pueden ser agentes intercalantes o bien ligandos en el surco menor, con mejor detectabilidad que el etidio. Como agente intercalante se encuentra SYBR Green que se une al DNA de doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. Existen sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre las dos moléculas, una de estas sondas es la sonda Taqman. El cual es un oligonucleótido marcado con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador.²⁹ Antes de revisar la cantidad de ADN

blanco producido después de un número fijo de ciclos, las pruebas de PCR en tiempo real determinan el punto en el tiempo durante el proceso de ciclado cuando se detecta por primera vez la amplificación de un producto de PCR. Este se determina identificando el número del ciclo en el cual la intensidad de la emisión del reportero marcado se levanta sobre el ruido de fondo. Este número de ciclo está referido como el ciclo umbral o “thresholdcycle” (Ct). El Ct se determina en la fase exponencial de la reacción de PCR y es inversamente proporcional al número de copias del blanco. Por lo tanto cuanto más alto es el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar, más pronto se observa un aumento significativo en la fluorescencia, y son más bajos de Ct.^{29,30}

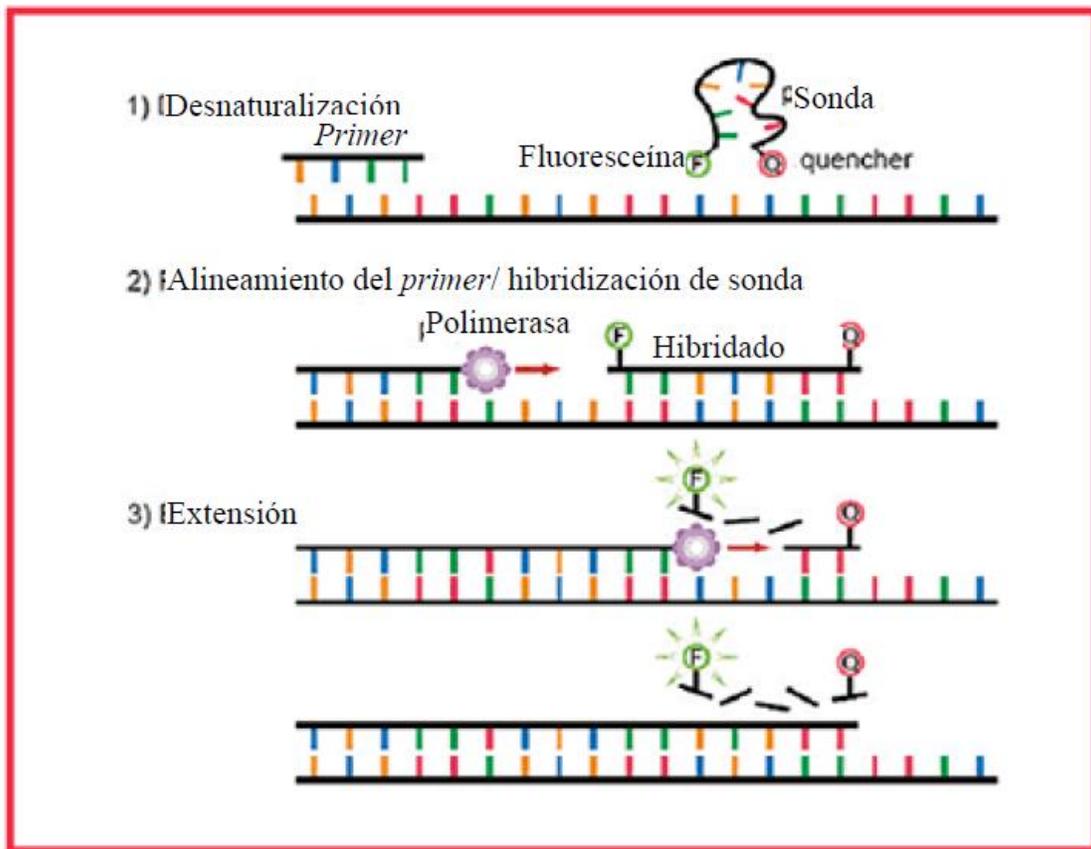


Figura 2. Representación esquemática del ensayo PCR en tiempo real.

La PCR puede ser considerada como una metodología cuantitativa, eficaz, económica y que puede automatizarse, lo que la convierte en una técnica útil y aplicable en pruebas de tamizaje.

Los genes localizados en las regiones pseudoautosómicas pueden ser considerados como candidatos para detectar alteraciones en el número de alelos tanto en hombres como en mujeres para los casos de aneuploidías de los cromosomas sexuales, como la Polisomía del X, así ser utilizados como marcadores, ya que son genes que se encuentran en forma diploide en ambos sexos.

En el caso donde una persona con aumento en el número de cromosomas X (polisomía del X) los genes localizados en las regiones pseudoautosómicas presentarán un aumento en su dosis génica la cual puede ser cuantificada de forma sensible por PCR cuantitativa (qPCR).^{31,32}

Los dos métodos más comúnmente utilizados para analizar los datos de los experimentos cuantitativos usando qPCR son la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa. La cuantificación absoluta determina el número de copias en relación con una curva estándar ya determinada. La cuantificación relativa relaciona la señal de la transcripción de PCR de un gen de referencia endógeno ya conocido y el producto de una muestra de estudio.^{29,30}

El método $\Delta\Delta C_T$ es una manera conveniente para analizar los cambios relativos en la cuantificación de genes en la PCR de tiempo real y es actualmente una herramienta incluida en el software de análisis de resultados para la mayoría de los equipos de qPCR.³⁰

2.9 Justificación

Actualmente la Polisomía del X tienen una incidencia de 1/1000^{11,12}, es un padecimiento genético subdiagnosticado lo cual limita su manejo oportuno, por lo que contar con un método de diagnóstico temprano, como el tamiz neonatal, permitiría el tratamiento adecuado de sus principales manifestaciones tanto ginecológicas como del comportamiento mejorando así la calidad de vida de las pacientes.

CAPÍTULO III

3.1 HIPÓTESIS

La determinación de la dosis génica en los genes *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* por Q-PCR es un método efectivo para el diagnóstico de las Polisomías del X.

3.2 HIPÓSTESIS NULA

La determinación de la dosis génica en los genes *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* por Q-PCR no es un método efectivo para el diagnóstico de las Polisomías del X.

CAPÍTULO IV

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la utilidad de la cuantificación de la dosis génica mediante la técnica Q-PCR como método para la detección temprana de pacientes con Polisomía del X en muestras de sangre en papel filtro de la población neonatal.

4.2 Objetivos particulares

1. Cuantificar la dosis génica de *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* mediante el método de Q-PCR.
2. Determinar la cuantificación relativa (RQ) de *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* con el gen de referencia *RNASE P* mediante análisis estadísticos.
3. Calcular la incidencia de Polisomía del X en 10,000 recién nacidos, en una población del noreste del país.

CAPÍTULO V

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

Se trata de un estudio

- Descriptivo,
- Transversal,
- Ciego.

Este estará dividido en dos fases:

Fase I. El estudio será de incidencia ya que permitirá conocer los casos nuevos de la enfermedad bajo estudio en esta comunidad. Con los datos se calcularán tasas de incidencia (Número de nuevos casos de una enfermedad específica en un área y periodo determinados / Población del área estimada a mitad del periodo * 1000). Cabe señalar que con criterios de diagnósticos precisos de la enfermedad, las incidencias calculadas que se obtengan serán bastante precisas.

Fase II. El estudio será de prueba diagnóstica. La aprobación del presente protocolo por el comité de ética será solicitada de la resolución de evaluación.

5.2 Población de estudio

Se obtuvieron 10,033 muestras de recién nacidos en el Hospital Universitario “Dr. J. Eleuterio González” y Hospital Materno Infantil, cuya madre aprobó mediante consentimiento informado y se les tomó en conjunto con el tamiz metabólico una muestra en papel filtro para cuantificación de la dosis génica. Aquellos con dosis génica con probable polisomía del X se les realizó cariotipo bandas GTG, siendo este último el gold estándar para diagnóstico de las cromosopatías numéricas. Se corroboró el diagnóstico si este último reportó 47, XXX.

5.2.1 Criterios de inclusión:

1. Neonatos menores de 2 semanas de nacidos en las instalaciones de los servicios de Salud del estado de Nuevo León (Hospital Regional Materno- Infantil y Hospital Universitario “Dr. José E. González”)

5.2.2. Criterios de exclusión:

1. Neonatos transfundidos.
2. Imposibilidad de tomar muestras de sangre.

5.2.3 Criterios de eliminación:

1. Muestra inadecuada.
2. Rechazo a participar en la evaluación clínica.

5.3 Descripción del diseño

El presente estudio se basa en el análisis molecular de la cuantificación de la dosis génica a través del uso de la Q-PCR, realizando una cuantificación relativa con el método $\Delta\Delta C_T$, la cual permite a través del uso de un gen de referencia endógeno establecer la dosis génica de un gen de estudio determinado.

Se utilizarán los genes *SHOX* (gen short-stature homeobox) el cual está localizado en Xp22.32 en la región pseudoautosómica 1 o también conocida como (PAR1), este gen escapa a la inactivación del X, se encuentra en forma bialélica tanto en hombres como en mujeres. *VAMP7* (Gen Vesicle-associated membrane protein 7), localizado en Xq28 y este último está en la región pseudoautosómica 2 (PAR2) cuenta con un homólogo en la PAR2 del cromosoma Y. Por último el gen *SRY* el cual es el gen determinante del sexo y está en el cromosoma Y, localizado en Yp11.3.

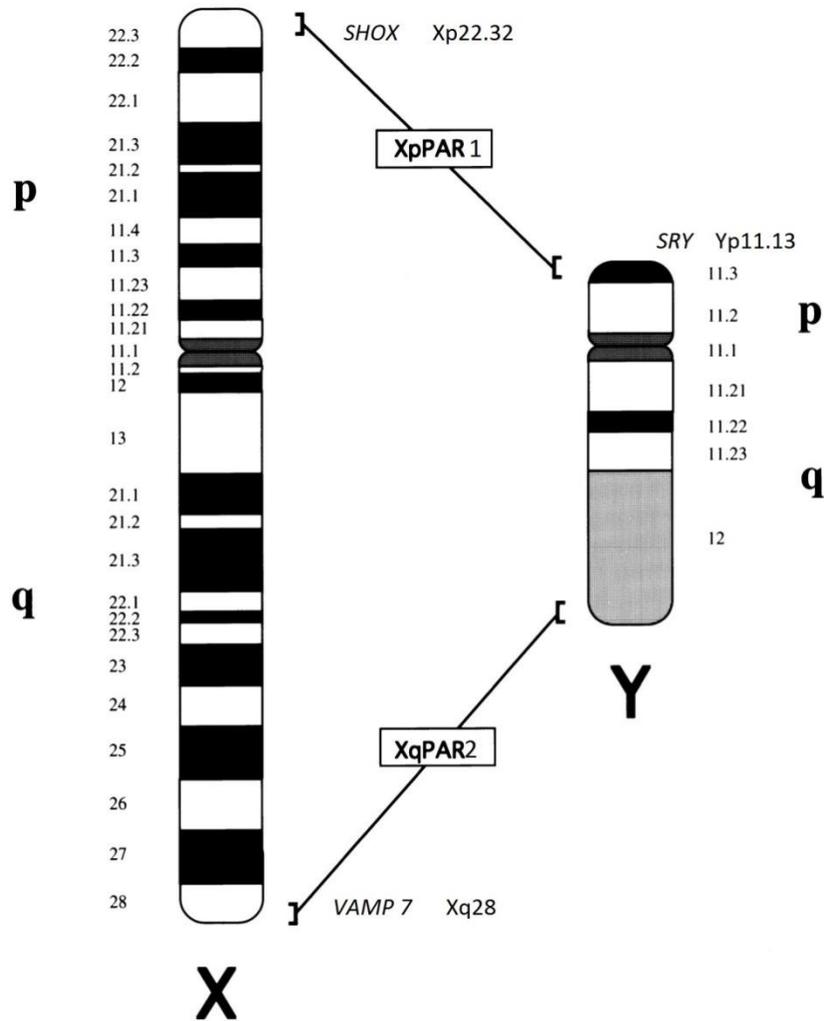


Figura 3. Regiones pseudoautosómicas y genes marcadores utilizados para cuantificar la dosis génica.

5.3.1 Recolección de la Muestra

Se llevó a cabo previo consentimiento informado la recolección de las muestras, las cuales se obtuvieron de todos los recién nacidos en las instalaciones de los Servicios de Salud del Estado de Nuevo León. Se recolectaron 10,033 muestras en papel filtro (sangre periférica total impregnada

en papel filtro), se completó la meta de las 10,033 muestras en aproximadamente 10 meses, el total de muestras tomadas 4945 correspondieron a mujeres y 5088 a hombres.

Toma de muestra de sangre en papel filtro:

Se tomó la muestra en papel filtro ELUTE Micro CardWhatman™ en conjunto con el programa de Tamiz neonatal a todo recién nacido capturado en el servicio de cuneros de pediatría de Hospital Universitario y del Hospital Regional Materno Infantil, así como en la consulta 14 de control del niño sano departamento de pediatría del Hospital Universitario.

Una vez recolectadas las muestras se etiquetaron otorgándoles un ID para su identificación adecuada, los consentimientos informados y cada muestra ya identificada pasó por 3 revisiones para verificar la adecuada correspondencia de las mismas.

5.3.2 Extracción automatizada del ADN

Partiendo de una muestra de sangre completa impregnada en papel filtro, se tomaron 4 perforaciones de 3 mm cada una, para extraer y purificar ADN, para su posterior cuantificación y análisis. Las muestras se procesaron en el equipo QIAcube de marca de Qiagen, haciendo uso del estuche comercial QIAamp® DNA Investigator. Como primer paso, el equipo realizó una lisis de la muestra en condiciones desnaturalizantes con proteinasa K, posteriormente el ADN se unió a

la membrana de sílice y mediante una serie de lavados se eliminaron todos los contaminantes, obteniendo así una correcta purificación - extracción del ADN.

Equipo

QIAcube.

Reactivos

QIA amp® DNA Investigator.

Material

Tubos CB (2ml) especiales para el QIAcube.

Tubos de elusión de 1.5ml

Micropipeta de 20-200uL

Puntas con filtro, 200µl especiales para el QIAcube.

Puntas con filtro, 1000µl especiales para el QIAcube.

Adaptadores del Rotor.

Porta adaptadores del Rotor.

Procedimiento

- Se agregaron las muestras con las perforaciones de 3 mm cada uno en los tubos CB previamente rotulados con el código de identificación de cada paciente.

- Se retiró el adaptador colocado dentro del QIAcube y se colocó en el mismo orden los tubos CB con las muestras.
- Se colocó en el equipo el rack con las puntas indicadas, tubos de elusión y los reactivos de acuerdo al protocolo que se realizó.
- Se encendió el QIAcube y se seleccionó la aplicación “DNA” en la pantalla del Menú principal.
- Se eligió el nombre del Kit, el tipo de muestra así como el Protocolo, presionando las flechas “↑” o “↓” y se oprimió el botón “Select” entre cada paso.
- Se inició la corrida del protocolo al presionar “Start”.
- El equipo realizó paso a paso una revisión del sistema (muestras, materiales y reactivos necesarios), al terminar solamente se oprimió “Continuar” en cada paso.
- Se realizó una revisión automática del material y al no encontrar el equipo problema alguno, se procedió a realizar la extracción.
- Al terminar la corrida, se retiraron los tubos que contienen el DNA purificado para su cuantificación con el espectrómetro NanoDrop.

5.3.3 Cuantificación y calidad del DNA

La estimación de la calidad de una muestra de ADN es obtenida por la relación de absorbancia 260/280. Para poder garantizar un buen análisis, es importante que el ADN extraído cumpla con los siguientes intervalos de calidad: La relación de Abs 260/230 y 260/280 debe ser mayor o igual a 1.8 y menor de 2.0 (Valores superiores o inferiores indican una contaminación, en el caso de 260/280 de proteínas, en el caso de 260/230 indica una contaminación de sales o solventes). Se evaluó y cuantificó el ADN extraído mediante un espectrofotómetro de la marca NanoDrop®ND-1000.

Equipo

- NanoDrop® ND-1000.
- Micropipeta de 10uL.

Reactivos

Agua libre de nucleasas

Material

Puntas con filtro (10µl).

Toallas absorbentes Kimwipes

Procedimiento

- Se abrió el software del equipo en la computadora a la que se encuentra conectado.
- Se indicó el tipo de cuantificación (Ácidos nucleicos/ADN o ARN).
- Se colocó 1µl del buffer empleado para resuspender el DNA a cuantificar y se designa como “Blank” en el equipo.
- Se limpió la zona en donde se colocó la muestra con un papel libre de polvo.
- Se pidió al equipo que midiera la concentración de un estándar de concentración conocida para verificar el correcto funcionamiento del equipo.
- Se volvió a limpiar la zona en donde se colocó la muestra con un papel libre de polvo.
- Posteriormente se agregó 1µl del DNA de la muestra para iniciar la cuantificación, se presionó “Measure”.
- Se limpió el resto de muestra con una toalla absorbente libre de polvo (Kimwipes)
- Se obtuvo la cuantificación en ng/µl de DNA y la calidad mediante las lecturas de absorbancia A_{260}/A_{280} .
- Se presionó “Exit” una vez obtenidos los resultados.

5.4 Metodología general

TaqMan®CopyNumberAssays se corre simultáneamente con TaqMan®CopyNumber Reference Assay en una PCR en tiempo real. El Kit de análisis de número de copias detecta el gen o secuencia genómica de interés, y el kit análisis de referencia detecta una secuencia que se sabe que existe en dos copias en un genoma diploide.

El número de copias de la secuencia de interés en cada muestra es determinado por una cuantificación relativa (RQ) usando el método de comparación de C_T ($\Delta\Delta C_T$). Este método mide la diferencia de C_T (ΔC_T) entre el gen de interés y la secuencia del gen de referencia y compara el valor de ΔC_T de la muestra con el calibrador de la muestra (s) conocido por tener dos copias de la secuencia de interés. El número de copias del gen de interés es calculado.

Al terminar la PCR, los archivos que contienen los valores C_T de cada muestra son exportados al software del equipo para el análisis de los datos post-PCR en experimentos de cuantificación de número de copias.

Equipo

- StepOnePlus™System.

Reactivos

- TaqMan®CopyNumberAssay

- TaqMan® Copy Number Reference Assay RNase P.
- TaqMan® Genotyping Master Mix.
- Agua libre de nucleasas.

Material

- MicroAmp® Fast optical 96-Well Reaction Plate.
- MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate.
- MicroAmp® Optical Adhesive Film.
- Puntillas con filtro (10µl-200µl).
- Guantes sin polvo.
- Tubos Eppendorf (0.2-0.5ml)

Protocolo

- *Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR)*
- Realizar una PCR en tiempo real con el equipo StepOnePlus™ (Life Technologies).
- Cada PCR debe incluir la muestra de ADN de pacientes y/o controles, un control negativo y la muestra de ADN de referencia.

- Descongelar completamente los reactivos, mezclar con vortex y se dar un spin.
- Calcular el número de muestras que se van a procesar, hacer un mix con los reactivos en un tubo de 0.5ml.
- Realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 4µl de ADN a 5 ng/µl obtenido de las muestras de los pacientes, 10µl del reactivo del estuche comercial 2X TaqMan® Genotyping Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, UnitedStates), 10µl de TaqMan®CopyNumberAssays (Life Technologies) el cual contiene ya ambos oligonucleótidos y la sonda específicos para la amplificación y detección de los genes *SHOX*, *VAMP7* y *SRY*.
- Utilizar *RNASEP* como gen de referencia.
- Mezclar los reactivos y se agregar a una placa de 96 pozos junto con los 4µl de ADN, mezclar por pipeteo.
- Colocar una tapa óptica adhesiva sobre la placa y sellar con firmeza.
- Colocar la placa en el equipo de PCR para iniciar la amplificación.

- El programa de amplificación consistió de un paso inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C.
- Sacar los tubos de la reacción una vez que la PCR terminó.

5.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Los resultados de los individuos que presentan una alteración en el número de cromosomas sexuales ya sea pérdidas o ganancias (parcial o total), mostrarán una alteración en el número de copias de los genes localizados en las regiones pseudoautosómicas esto es un aumento en el número de copias. La cuantificación relativa determinada por el método $\Delta\Delta C_T$ el cual mide la diferencia de C_T (ΔC_T) entre el gen de interés (*SHOX*, *VAMP7* y *SRY*) contra la secuencia del gen de referencia (*RNASE P*).

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen estudio} - C_T \text{ gen referencia.}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ gen estudio} - \Delta C_T \text{ gen referencia.}$$

La cuantificación relativa (RQ) normal en un individuo con dos alelos para un gen es igual a 1 ya que es una proporción entre el número normal de copias del gen de estudio y el número normal de copias del gen de referencia es decir $2/2 = 1$ y al existir una pérdida o ganancia en el número de cromosomas sexuales se verá reflejado en un aumento o disminución del valor de RQ (<0.8 o >1.3). El uso de

SRY nos permite determinar la presencia del cromosoma Y el cual es exclusivo de este cromosoma y discrimina entre hombres y mujeres. Por lo tanto, los resultados esperados para individuos con Polisomía del X son valores de >1.3 para *SHOX* y *VAMP7* y la ausencia de *SRY*. Al azar, se integró 1 muestra de papel filtro con sangre de paciente previamente diagnosticada con Polisomía del X, esto para determinar el límite superior e inferior de detección.

Los archivos que contienen los valores C_T de cada muestra son exportados al software del equipo (StepOne Plus de AppliedBiosystem®), para el análisis de los datos post-PCR en experimentos de cuantificación del número de copias.

A la par que se analizaron las muestras de los pacientes se decidió introducir una muestra control de una paciente ya conocida con el diagnóstico de Polisomía del X, a la cual se le tomó muestra en papel filtro y se sometió a todo el procedimiento descrito hasta este momento, con la finalidad de corroborar la sensibilidad del procedimiento de qPCR.

Posterior al resultado de qPCR aquellos resultados con dosis génica >1.3 se buscaron los nombres correspondientes al paciente y se localizaron vía telefónica o visita domiciliaria para la segunda toma de la muestra confirmatoria, la cual consistió en el estudio de cariotipo.

Cariotipo

El estudio citogenético en linfocitos se basa en cultivar las células para la obtención de metafases en las que se analiza tanto el número como la estructura de los cromosomas, esto mediante la técnica de bandeo cromosómico GTG donde se utiliza Tripsina y Giemsa como colorante, cada par de cromosomas tiene un patrón de bandas claras y oscuras ya establecido y descrito en el ISCN 2016³³. La sangre periférica es el tejido más usado para determinar el cariotipo constitucional, por tal motivo la muestra debe ser de 1 a 3 ml de sangre venosa periférica obtenida mediante técnica aséptica, no es necesario el ayuno, y el paciente no debe de haber tenido transfusiones sanguíneas en por lo menos tres meses anteriores a la toma. Normalmente los linfocitos de sangre periférica no se dividen en los adultos sanos, por lo que tienen que ser estimulados con exposición de mitógenos como la fitohemaglutinina.

Equipo

- Agitador vortex
- Analizador de imágenes.
- Balanza analítica.
- Bomba de vacío.
- Campana de flujo laminar.
- Centrífuga.
- Estufa (37°)
- Incubadora con 5% de CO₂ a 37°C (+/- 0.5°C) con cilindro de gas CO₂ y manómetro.

- Microscopio de campo claro.
- Microscopio invertido de contraste de fases.
- Potenciómetro.

Reactivos

- Aguas destilada.
- Ácido acético glacial.
- Alcohol 70%.
- Cloruro de Potasio.
- Cloruro de sodio.
- Colcemid o colchicina.
- Colorante Giemsa.
- Colorante Wright.
- Fosfato de potasio monobásico anhidro.
- Fosfato de sodio dibásico heptahidratado
- Medio de cultivo PBmax.
- Metanol grado HPLC.
- Pastillas para buffer pH 6.8.
- Tripsina 1:250.
- Resina.

Material

- Bulbos de látex.

- Cubreobjetos (24x50mm).
- Gasas.
- Gradilla.
- Guantes.
- Tubos cónicos estériles desechables de 15mL.
- Pipetas de 5 y 10mL estériles desechables.
- Micropipeta 100-1000 μ L.
- Pipeteador automático.
- Portaobjetos esmerilado.
- Pipetas Pasteur.

Procedimiento

Siembra

- Antes de iniciar el proceso se descontamina el área de trabajo con etanol al 70%. Se realiza dentro de la campana, la muestra de sangre se colecta en un tubo vacutainer o jeringa con heparina sódica como anticoagulante.
- Agregar 0.5m (10 gotas con una jeringa sin aguja) de la muestra a un tubo cónico con 5ml de medio de cultivo PBmax (RPMI 1640, suero fetal bovino, antibiótico, fitohemaglutinina), se mezcla y se incuba a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 72hrs.

Cosecha

- Agregar 100microlitros de colcemid, sustancia que arresta a las células en metafase por la disrupción del citoesqueleto, se incuban a 37°C por 40 minutos.
- Centrifugar a 1200rpm por 10 minutos, retirar el sobrenadante dejando 0.5ml por encima del botón celular.
- Agregar 5ml de solución hipotónica (KCL 0.075M precalentada a 37°C) resuspender suavemente e incubar 20 minutos a 37°C. La función de esta solución es “hinchar la célula” con el fin de tener una adecuada dispersión de los cromosomas.
- Agregar 0.5ml de Sol. Carnoy (Solución fijadora metanol-ácido acético en proporción 3:1), centrifugar a 1200rpm por 10 minutos. En este paso las células se “fijan” y se puede preservar por días a 4°C.
- Retirar el sobrenadante dejando 0.5ml por encima del botón celular y resuspender en el agitador mecánico; agregar 5ml de solución fijador, centrifugar por 10 minutos a 1200rpm, repitiendo este paso 2 a 3 veces más para lavar el botón celular.

- El botón celular se resuspende en un volumen de 1ml de sobrenadante con pipeta Pasteur.

Goteo

- En un portaobjetos limpio y libre de grasa colocar una o dos gotas de solución Carnoy, al extenderse la gota, añadir una gota de suspensión celular. Dejar secar y “madurar” las preparaciones de 5 a 7 días a 37°C.

Tinción

- Las bandas GTG permite la identificación de los cromosomas por su patrón específico de bandeado, la tripsina hidroliza el componente proteico de la cromatina, permitiendo que los colorantes Wright y Giemsa reaccionen con ADN expuesto. El número de bandas depende del grado de compactación cromosómica y generalmente es de 550 bandas.
- Las laminillas se tratan con solución de tripsina al 0.02% por 15 a 20 segundos.
- Sumergir en una solución de amortiguador de fosfatos pH7.2 por 30 segundos.
- Sumergir en solución Wright al 10% por 1 minuto 15 segundos.

- Sumergir en solución Giemsa al 10% por 1 minuto 20 segundos.
- Enjuagar en agua.
- Secar y observar al microscopio.

Análisis

- Conservar las preparaciones con resina y un cubreobjetos. Observar las preparaciones bandeadas al microscopio, detectar cambios tanto en el número como en la estructura de los cromosomas, Observar y contar al menos 20 metafases, durante el análisis completo, cada cromosoma se compara críticamente banda por banda con su homólogo.

Todos los resultados obtenidos con reporte de 47, XXX confirmaron el diagnóstico de Polisomía del X.

Teniendo el diagnóstico confirmado por el estándar de oro (cariotipo) se citó a los pacientes a la consulta de genética, se les entregó el resultado, se realizó exploración física completa y se brindó asesoramiento genético.

5.6 Diagrama general del estudio:

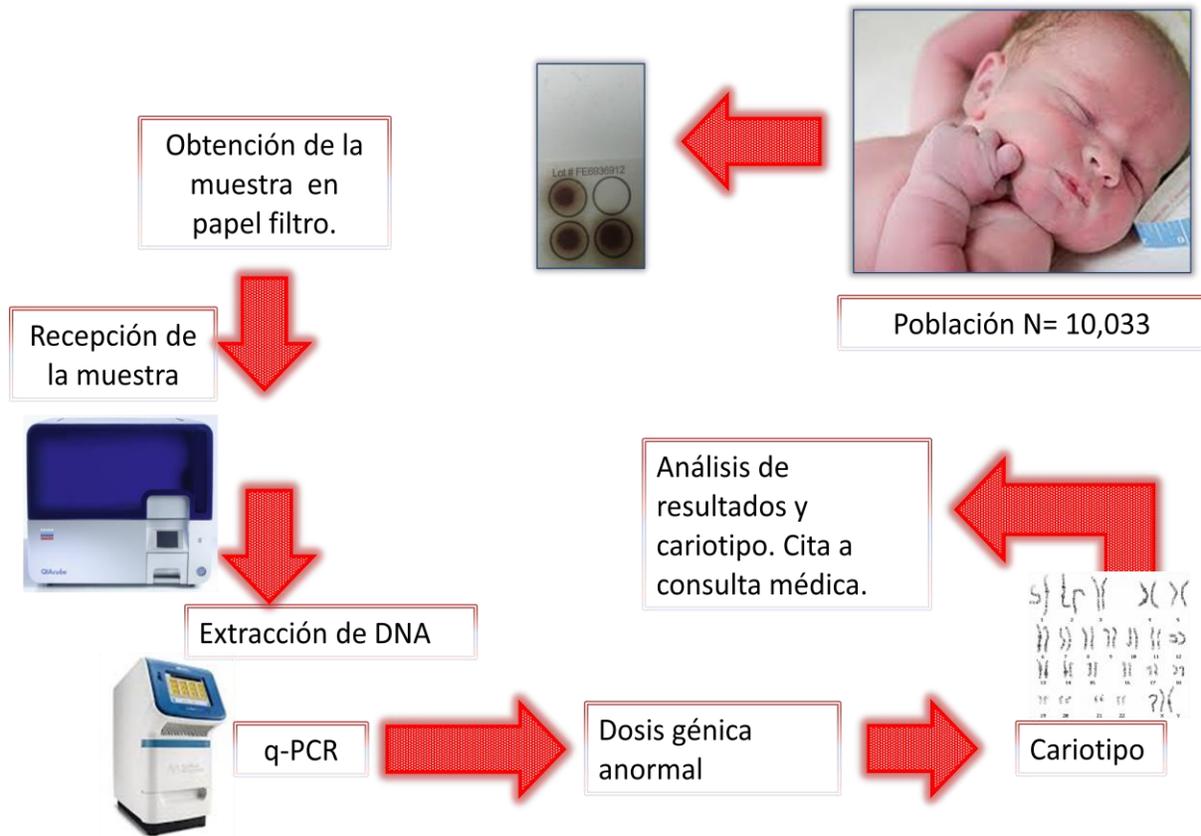


Figura 4. Esquema del diseño general.

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 10,033 muestras en papel filtro, de las cuales 4945 correspondieron a mujeres y 5088 a hombres. Del total se identificaron 3 pacientes con perfil de aneuploidía para Polisomía del X en la Tabla 3 se compara los valores de la dosis génica con un paciente control.

Caso	Registro	Dosis génica		
		SHOX	VAMP7	SRY
1	GEP12678	1.85	1.20	-
		1.44	1.31	-
		1.29	1.49	-
2	GEP14150	1.51	1.59	-
		1.39	1.55	-
		1.37	1.36	-
3	GEP015487	1.44	1.53	-
		1.31	1.38	-
		1.39	1.38	-
*4	GEP 13805	1.37	1.21	-
		1.33	1.59	-
		1.37	1.26	-

Tabla 3. Dosis génica con probable Polisomía del X. *Paciente control, confirmada previamente con cariotipo con Polisomía del X. Cada muestra se procesó en 3 ocasiones, por ello se muestran 3 valores de cada gen.

Se citaron para la toma de muestra a las tres recién nacidas, para confirmar mediante un cariotipo en sangre periférica, obteniendo en cada uno de ellos los 22 autosomas más 3 cromosomas X en cada metafase, lo cual es compatible con Trisomía del X. No se detectó ninguna línea celular 46, XX o con otra fórmula cromosómica, tampoco se observaron alteraciones estructurales.

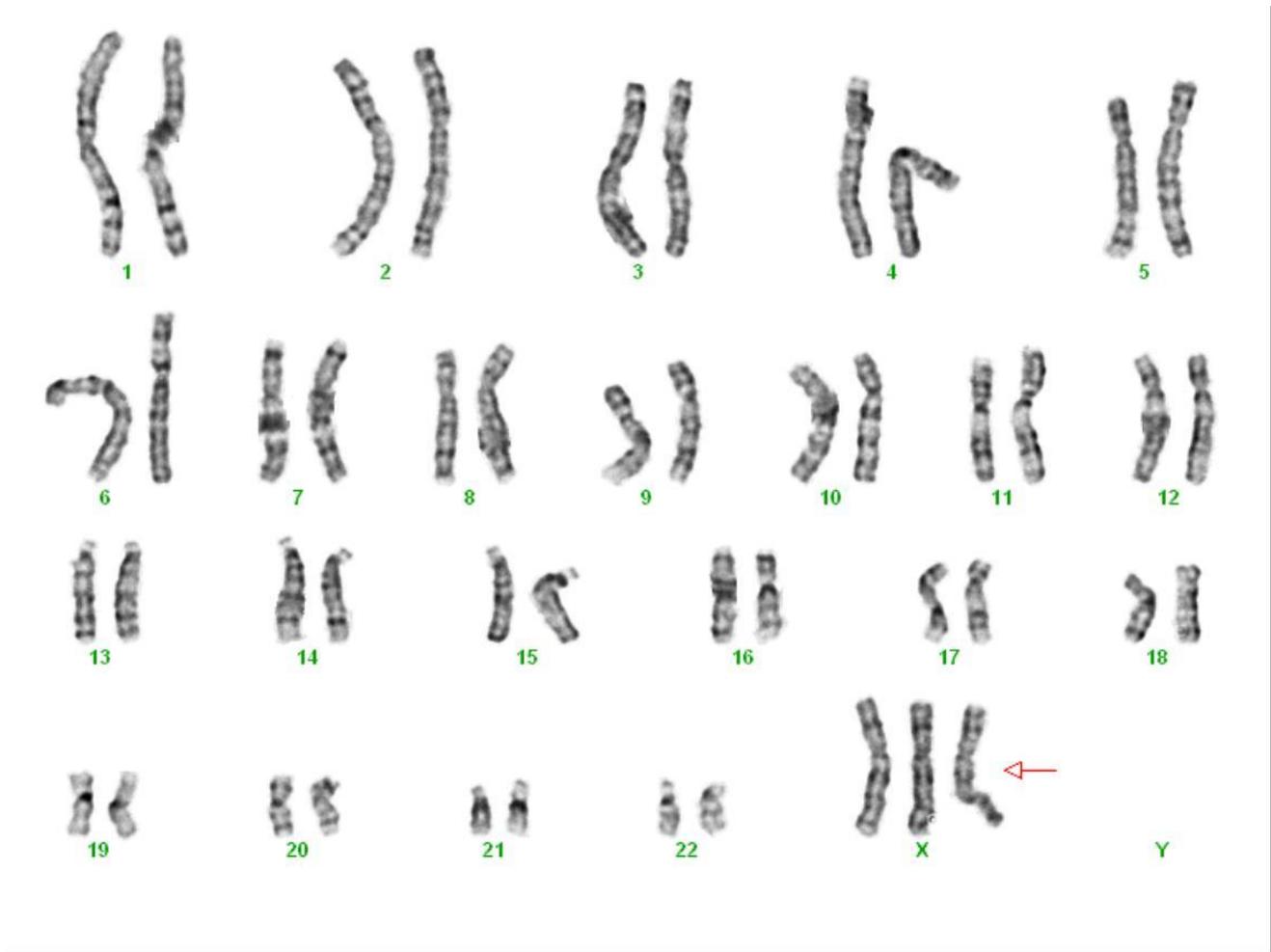


Figura 5. Cariotipo de caso 1. 47, XXX

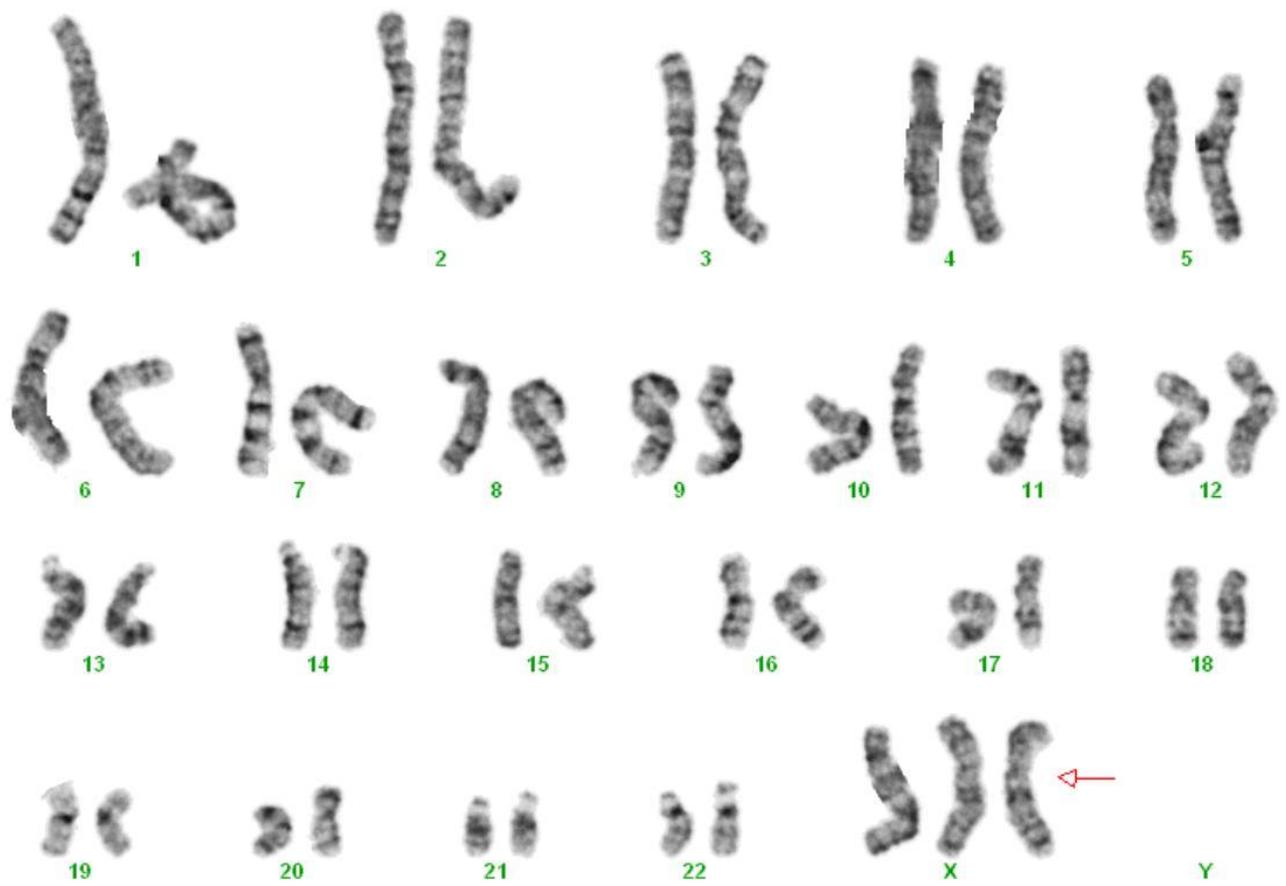


Figura 6. Cariotipo caso 2. 47, XXX

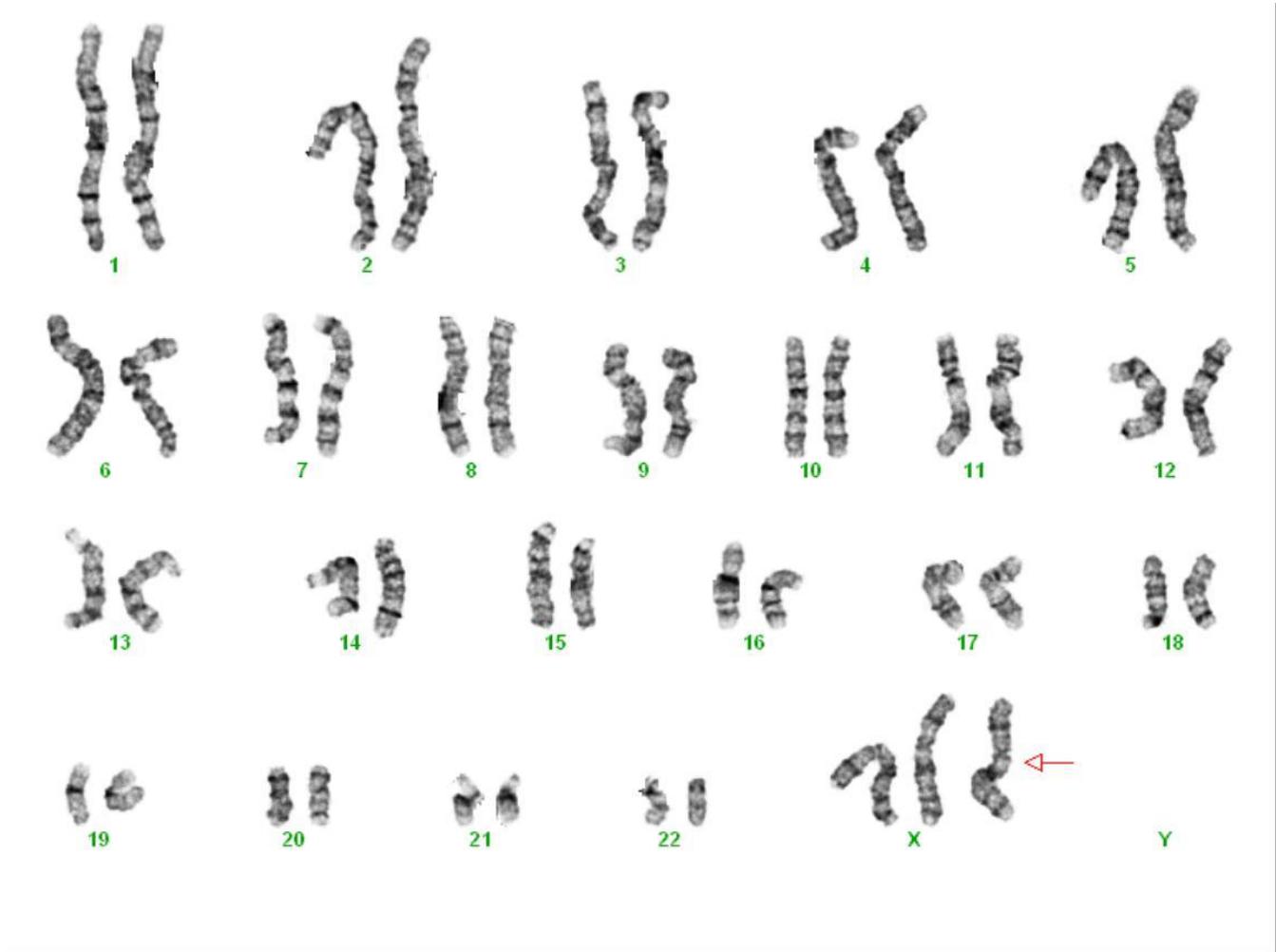


Figura 7. Cariotipo caso 3. 47, XXX

De los 3 casos encontrados en el estudio sólo la mamá del Caso 1 presentó elevación de la presión arterial a la cual se le descartó preeclampsia, además a las 8 SDG presentó actividad uterina la cual cedió con tratamiento de reposo.

Del total de las muestras tomadas el rango de edad entre las mamás es de 13 a 53 años. En el caso de las pacientes encontradas con Polisomía del X las edades fueron de 19, 37 y 41 años de edad.

Resumen clínico al momento de la consulta de los 3 casos:

Caso 1: Femenino de 7 meses de edad, producto de cuarta gesta de mamá de 37 años, papá de 35 años ambos sanos, no consanguíneos. Madre con antecedente de aborto previo a las 20SDG, control prenatal regular, presentó amenaza de aborto a las 8SDG con actividad uterina, indicándose tratamiento de reposo. Movimiento fetal al 4º. Mes referidos adecuados en intensidad y frecuencia. Ultrasonidos reportados normal. A las 34SDG presentó elevación de la presión arterial la cual se estudió descartándose preeclampsia, la mamá recibió ingesta de vitamínicos para el embarazo. Nació a las 37SDG por parto vaginal eutócico, APGAR 8/9, peso 2,360kg, talla 46cm, PC33cm. Se egresa el binomio como sano. Reflejos primarios adecuados, hitos del desarrollo de acuerdo a edad. Detalles de la exploración en Tabla 4 e imagen 8.

Caso 2: Femenino de 10 meses de edad, producto de primera gesta de mamá de 41 años, papá de 39 años ambos sanos, no consanguíneos. Control prenatal regular, no presentó amenaza de aborto ni de parto pretérmino, no patológicos

durante el embarazo, ingesta de ácido fólico preconcepcional y multivitamínicos. Ultrasonidos reportados normales. Nace vía cesárea por producto transverso a las 39SDG, APGAR 8/9, peso 3,760kg, talla 53cm, PC 34cm. Se egresa el binomio en conjunto como sano. Reflejos primarios referidos adecuados, hitos de desarrollo de acuerdo a edad. Detalles de la exploración en Tabla 4 e imagen 9.

Caso 3: Femenino de 9 meses de edad, producto segunda gesta de mamá de 19 años, papá de 24 años ambos sanos, no consanguíneos. Control prenatal regular, no presentó amenaza de aborto ni amenaza de parto pretérmino, movimiento fetal a partir del 6º. Mes de gestación referidos adecuados en intensidad y frecuencia, ingesta de ácido fólico y sulfato ferroso. Se realizó 2 ultrasonidos reportados como normales. Nace vía parto vaginal eutócico a las 36SDG, APGAR 8/9, peso al nacer 2,580, talla 47cm, PC31cm. Se egresa el binomio en conjunto como sano. Reflejo primarios adecuados. Hitos del desarrollo de acuerdo a edad. Detalles de la exploración en Tabla 4 e imagen 10.

	PACIENTE			
	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Literatura
Cariotipo	47,XXX	47,XXX	47,XXX	
Edad materna	37 años	41 años	19 años	
Complicación durante el embarazo	Amenaza de aborto a las 8 SDG.	No	No	
Semanas de gestación	37SDG	39SDG	36SDG	
Somatometría al nacer				
Peso	2,260 kg (p25)	3,760 kg(p>90)	2,580kg(p75)	
Talla	46cm(p25)	53cm(p>90)	47cm(p50)	
PC	33cm(p50)	34cm(p50)	31cm(p25)	
Edad de evaluación	7 meses	10 meses	9 meses	
Peso	6,560kg (p3)	8,260kg (p10)	7,450kg (p3)	
Talla	64cm (p10)	71.5cm (p25)	66cm (p3)	
PC	43cm (p50)	44cm (p50)	42cm (p3)	
Hitos del desarrollo	Adecuados	Adecuados	Adecuados	
Hoyuelo auricular/apéndice preauricular	Pit auricular derecho	Apéndice preauricular izquierdo	-	+
Epicanto	+	+	+	+
Atrofia óptica	-	-	-	+
Coriorretinitis	-	-	-	+
Raíz nasal de baja implantación	+	+	+	+
Pabellones auriculares de baja implantación/dislásicos	-	+	+	+
Mancha mongólica extensa	+	+	-	-
Clinodactilia	-	-	+	+
Hipotonía	-	-	-	+
Malformaciones genitourinarias	-	-	-	+
Atresia duodenal, atresia yeyunal	-	-	-	+
Crisis convulsivas	-	-	-	+
Anomalías en cerebro	-	-	-	+
Mácula hiperpigmentada	+	+	-	-
DCC	+	-	-	+
Estreñimiento	-	-	-	+
Cardiopatía	-	-	-	+

Tabla 4. Fenotipo de las pacientes encontradas con Polisomía del X y hallazgos encontrados en la literatura. DCC: Displasia congénita de cadera. CC: Crisis convulsivas. PC: perímetro cefálico SDG: semanas de gestación, P: percentil.

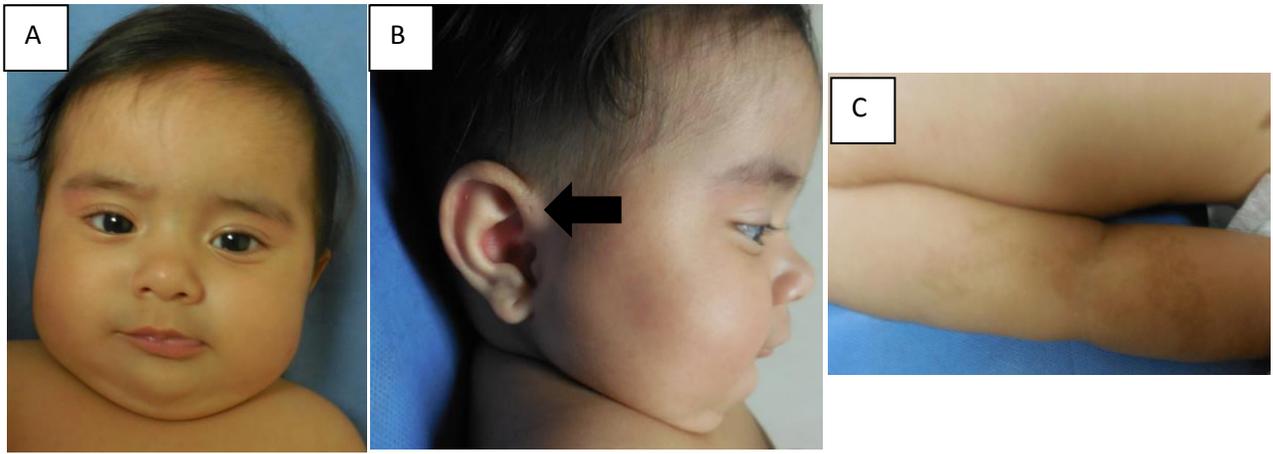


Figura 8. Caso 1. A. Obsérvese el hipertelorismo, raíz nasal de baja implantación. B. Vista lateral de paciente que muestra presencia de pit auricular derecho (indicado por la flecha). C. Mancha hiperocrómica en brazo y antebrazo derecho, extensa de bordes irregulares.

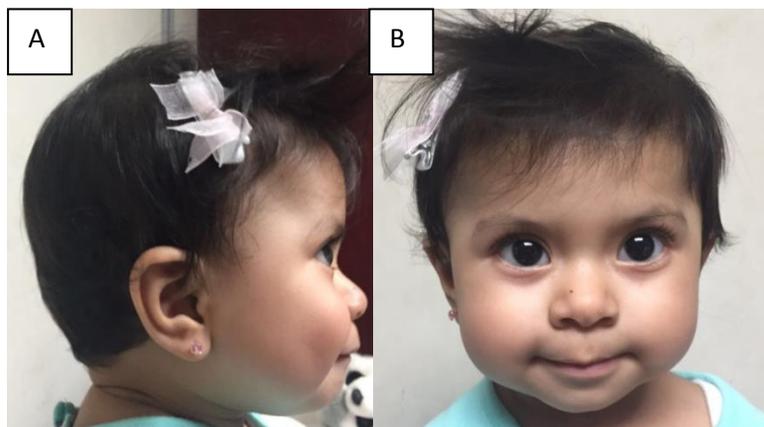


Figura 9. Caso 2. A. Vista lateral de paciente, muestra implantación baja de pabellones auriculares y raíz nasal de baja implantación. B. Obsérvese fisuras palpebrales hacia arriba, presencia de epicanto bilateral.



Figura 10. Caso 3. A. Muestra la presencia de epicanto bilateral. B. Pabellones auriculares de baja implantación y displásicos.

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN

Las Aneuploidías de los cromosomas sexuales como Polisomía del X son muy frecuentes, varían ampliamente en su fenotipo, por lo que son sub-diagnosticadas.

El tamizaje neonatal mediante la cuantificación de la dosis génica de *SHOX* y *VAMP7* localizados en las regiones pseudoautosómicas, mediante el análisis por qPCR, permitió determinar la cantidad normal de cromosomas X en cada caso enrolado, así mismo, permitió identificar los casos anormales como las Polisomías del X, por triplicado cada muestra obtuvo valores de *SHOX* y *VAMP7* elevados en las 3 pacientes reportadas. Por lo tanto el estudio permitió un diagnóstico temprano, lo cual raramente sucede en este síndrome.

La incidencia reportada en la literatura de Polisomía del X es de 1 en 1000 recién nacidas^{11,12}, en el estudio se encontró una incidencia de 1 en 1648 recién nacidas.

En 63% de los casos, la Polisomía del X es causada por una no disyunción materna durante meiosis I y en un 17.4% en meiosis II, asimismo se ha asociado con edad materna avanzada.^{10,12,16} Esto correlaciona con los hallazgos encontrados en donde 2 de los tres casos las mamás superaban los 35 años (37 y 41 años), mientras que la mamá del tercer caso tuvo 19 años.

El fenotipo de Polisomía del X es talla alta que supera el percentil 75 (80-89%). Talla baja se ha reportado que ocurre muy raramente.³⁴ En el estudio al evaluar cada caso se encontró que las tres pacientes tenían una talla dentro de percentiles. El fenotipo fue muy variable: fenotipo facial con dismorfias menores como pit/apéndice preauricular, pabellones auriculares de baja implantación y displásicos. Un caso presenta mancha mongólica extensa, mácula hiperpigmentada lo cual no había sido previamente reportado. En 100% de los casos se encontró un puente nasal bajo y pliegue epicanto, lo cual previamente se había reportado en el 32% de los casos. También se encontró clinodactilia en el 33.3% de los casos comparado a 42-65%. La displasia congénita de cadera se había reportado en un 2-12%, en el estudio se reportó en el 33.3%.

Otras condiciones como atrofia óptica, coriorretinitis, hipotonía, atresia duodenal, atresia yeyunal, epilepsia, constipación y cardiopatía que se han reportado en la literatura, no se encontró en algunos de las 3 pacientes.

Varios estudios han demostrado un volumen cerebral menor¹³, sin embargo, en los 3 casos no se encontraron alguna alteración neurológica para justificar un estudio de imagen. Así mismo, se han reportado casos de Trisomía del X con enfermedad autoinmune como lupus eritematoso sistémico³⁵, no se encontró algún dato sugerente de tal entidad, sin embargo, se les dará seguimiento periódicamente.

La importancia de la detección temprana de la Polisomía del X tiene el objetivo de ofrecer a las pacientes y sus familias un diagnóstico certero, con el posterior seguimiento y prevención de complicaciones, así como determinar una intervención temprana y terapia ocupacional según la necesidad de la paciente.

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIÓN

La determinación de la dosis génica en los genes *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* por q-PCR es un método efectivo para el diagnóstico de las Polisomías del X. Se logró evaluar dicha metodología en muestras de sangre en papel filtro en la población neonatal, obteniendo la incidencia de Polisomías del X en la población de noreste de país, además se obtuvo una caracterización del fenotipo encontrado en las pacientes en periodo de lactante.

CAPÍTULO IX

9. ANEXOS

9.1 Carta de consentimiento informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO

1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

Detección temprana de polisomía del X mediante la cuantificación de la dosis génica de SHOX y VAMP7 por qPCR en muestras de sangre de papel filtro.

1.- *Usted ha sido invitado (a) a participar en este estudio de investigación. Este documento tiene toda la información sobre este estudio. Tómese el tiempo necesario para que lo lea y haga cualquier pregunta que pudiera tener a su médico o personal del estudio de investigación.*

2.- LOS INVESTIGADORES

Los responsables de este estudio son: Dra. Med. Laura Elia Martínez Garza, jefe

del departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Dra. Marisol Ibarra Ramírez médico especialista en Genética Médica, profesor y médico adscrito al departamento de Genética, Dra. Isabel Moreno Vega Médico Residente de Genética, Dr. Luis Daniel Campos Acevedo profesor adscrito al departamento de Genética y coordinador del laboratorio de genética molecular, M.C. Michelle Zamudio Osuna profesor e investigador en el área de genética molecular, M.C. Viviana Gómez Puente profesor adscrito al departamento de Genética y coordinador del laboratorio de Citogenética, QCB Rosario Torres profesor adscrito al departamento de Genética y coordinador del laboratorio de Genética Bioquímica, Dra. Patricia Arredondo Coordinadora del departamento de Atención a la Salud del Recién Nacido, Infancia y Adolescencia, SSNL. Dr. Ricardo Cerda Flores profesor–Investigador de la Facultad de Enfermería El Departamento de Genética se localiza en el 4° piso del Centro Universitario Contra el Cáncer y se puede comunicar a los Tel. (81) 83 48 37 04, (81) 81 23 16 98 de lunes a viernes en horarios de 8:00 a 19:00 hrs.

3.- ACERCA DE ESTE ESTUDIO.

Las aneuploidias sexuales son alteraciones en el número de cromosomas sexuales (X o Y) las cuales son estructuras hechas de ADN (ADN es el encargado de transmitir la información hereditaria). Estas alteraciones incluyen los Sd. De Turner que se produce por la pérdida total o parcial del segundo cromosoma sexual (X o Y) y se caracteriza por talla baja y disgenesia gonadal (alteraciones en la función de los órganos reproductivos), el Sd. de Klinefelter el cual se presenta al tener uno más cromosomas X en un individuo varón y este

ocasiona talla alta, problemas de reproducción, entre otras alteraciones y por último la Polisomía del X (tres o más cromosomas X) en una mujer, que puede generar alteraciones en la fertilidad, problemas de aprendizaje y talla alta. Estas alteraciones lo general no se pueden diagnosticar al nacimiento. El diagnóstico de la mayor parte de los pacientes se realiza en la vida adulta cuando se presentan con problemas de fertilidad y/o alteraciones en la estatura.

Encontrar a los pacientes de forma tardía retrasa o impide tratar las complicaciones asociadas a estos síndromes en un tiempo oportuno, las cuales puede afectar su calidad de vida. El manejo de estos pacientes es una tarea multidisciplinaria (diferentes médicos especialistas deben atender al pacientes), por lo tanto, lo adecuado es detectar estos padecimientos en etapas tempranas, de esta manera, el individuo afectado tendrá una mejor atención, que permita su adecuada integración en la sociedad y un entorno de desarrollo más favorable para él y su familia. En base a este problema se ha buscado diferentes métodos de detección temprana en estos pacientes utilizando pruebas que sean económicas y fáciles de realizar.

4.- ¿PARA QUE SE LLEVA A CABO ESTE ESTUDIO?

El propósito de este estudio es encontrar una alteración en el número del cromosoma sexual X (X) utilizando ciertos genes (segmentos de ADN localizados en el cromosoma sexual X) que son SHOX y VAMP7 para el diagnóstico temprano de la polisomía del X (tres o más cromosomas X), para la atención oportuna de los casos y mejorar la calidad de vida de los pacientes además permitirá saber con mayor exactitud cuántos casos se presentan en la población

del estado de Nuevo León. Los resultados obtenidos serán analizados para saber si esta prueba puede ser incluida en el tamiz neonatal ampliado y así aumentar el número de padecimientos genéticos detectados desde el nacimiento.

5.- ¿CUÁLES SON LOS REQUISITOS PARA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Para participar en este estudio solo se requiere ser un recién nacido menor de dos semanas y que se autorice por consentimiento firmado su participación.

Quiénes no pueden participar:

Recién nacidos transfundidos.

Imposibilidad de tomar muestras de sangre.

Quiénes se eliminan de este estudio:

Muestra mal tomada.

Rechazo a participar en la evaluación clínica

6.- ¿QUÉ SE ME PEDIRÁ QUE HAGA?

Si usted permite que se analice la muestra de su hijo (a) de manera voluntaria, se le pedirá que responda a unas preguntas de los datos clínicos de su hijo (a) por personal de la consulta de tamiz neonatal y se tomará una muestra de sangre de talón (unas gota que se absorben en un papel filtro) utilizando unas lancetas que no generan ningún riesgo a la salud de su hijo (a). Su participación tendrá una duración aproximada de 15 minutos y sólo se pedirá una segunda evaluación en el caso de que los resultados fueran sospechosos de una alteración en el número del cromosoma sexual (X), se realizará un estudio confirmatorio que se llama Cariotipo bandas GTG (el cual permite contar el número de cromosomas y evaluar

su forma) de forma gratuita. Este estudio se realiza con una muestra de sangre periférica (3ml) que se toma por punción con aguja de alguna vena superficial del antebrazo así como una evaluación clínica por un médico especialista en Genética Médica.

7.- ¿QUÉ ME PODRÍA PASAR POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

La toma de la muestra se realiza a través de la punción de una lanceta sobre el talón del neonato, se pueden presentar molestias menores en el sitio donde se realice la punción como ligero dolor local o la presencia de un hematoma (moretón), eventos que NO ponen en peligro su salud.

9.- ¿QUÉ BENEFICIOS TENGO POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

En el presente estudio se busca establecer un método sensible, rápido y económico que permita la detección temprana de las pacientes con Polisomía del X (tres o más cromosomas sexuales X) con el fin de ofrecer un manejo oportuno a las complicaciones más frecuentes observadas en estos pacientes y en el caso de que sea detectado alguna Polisomía del X en el participante se realizará el estudio confirmatorio de forma gratuita.

11.- ¿CÓMO PROTEGERÁ MI PRIVACIDAD?

Los resultados de estas pruebas únicamente se compartirán con la Dra. Laura Martínez Garza, quien es el investigador principal y los colaboradores Dra. Marisol Ibarra Ramírez, Dra. Isabel Moreno Vega, Dr. Luis Daniel Campos Acevedo, M.C Michelle Zamudio Osuna, M.C Viviana Gómez Puente, QCB Rosario Torres, Dra

Patricia Arreondo, y el Dr. Ricardo Cerda Flores, utilizando una clave para el número de caso y donde se mantiene la identidad de la muestra protegida sin revelarse a personal que no participe en este estudio.

A cada muestra se le asignará un número de folio el cual permitirá su identificación para el resto del personal del laboratorio, impidiendo su acceso a la identidad de dicha muestra la cual únicamente conocerán los autores de este estudio, la información se almacenará en una base de datos de uso exclusivo del grupo de trabajo y los resultados obtenidos tienen como finalidad publicarse en una tesis y en un artículo de publicación médica y en ningún momento la identidad de los participantes será revelada.

_____ acepto que el ADN obtenido será almacenado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José E. González” de la U.A.N.L. y podrá ser empleado con motivos de investigación o educación La solicitud de estudios adicionales deben ser realizadas por los responsables de este estudio. Entiendo que tengo el derecho a revocar este consentimiento en cualquier momento. En caso de no aceptar que se utilice el ADN extraído con motivos de investigación en otro estudio de forma anónima, este será eliminado al concluirse este estudio.

12.- ¿TENDRE ALGO QUE PAGAR DURANTE LA INVESTIGACIÓN?

No habrá ningún cargo para el participante por ninguna de las pruebas requeridas y procedimientos realizados en este estudio.

13.- ¿RECIBIRÉ ALGUN PAGO O INCENTIVO POR MI PARTICIPACIÓN?

No recibirá ninguna compensación monetaria ni en especie por participar en este estudio.

14.- ¿QUÉ VA A PASAR SI ME ARREPIENTO DE PARTICIPAR?

Su participación en este estudio es voluntaria. Como participante, usted puede negarse a participar en cualquier momento. Para retirarse del estudio por favor contacte a la Dra. Marisol Ibarra Ramírez en el departamento de Genética el cual se localiza en el 4° piso del Centro Universitario Contra el Cáncer y se puede comunicar a los Tel. (81) 83 48 37 04, (81) 81 23 16 98 de Lunes a Viernes en horarios de 8:00 a 19:00 hrs.

15.- SI TENGO PREGUNTAS, ¿AQUIEN PUEDO LLAMAR O COMUNICARME?

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor hable con la Dra. Marisol Ibarra Ramírez en el departamento de Genética el cual se localiza en el 4° piso del Centro Universitario Contra el Cáncer o bien se puede comunicar a los Tel. (81) 83 48 37 04, (81) 81 23 16 98 de Lunes a Viernes en horarios de 8:00 a 19:00 hrs o al 044-811 069 71 82 en cualquier horario.

Recuerde que este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad de Autónoma de Nuevo León.

Se le ha dado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a su satisfacción. Si firma abajo indica que está de acuerdo para participar como voluntario en este estudio de investigación.

PARTE 2: FIRMAS QUE DOCUMENTAN EL ACUERDO

16.- ACUERDO

Su consentimiento para participar en la investigación será voluntario e informado. Si usted está de acuerdo en participar y si sus preguntas han sido contestadas a su entera satisfacción, usted deberá firmar esta forma. Una vez firmada la forma, usted está de acuerdo en participar en este estudio. En caso de que usted se rehúse a participar, usted podrá retirarse sin pérdida de alguno de sus beneficios médicos.

Una vez que usted haya consentido, usted aún tendrá el derecho de retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica. Para retirarse, lo único que usted deberá hacer es informar a su médico de su decisión.

Se le ha proporcionado una copia de esta forma para quedársela y para que haga referencia a ella cuando sea necesario.

_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma de la Sujeto</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>

_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma del Primer Testigo</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>

Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección

<i>Fecha</i>	<i>Firma del Segundo Testigo</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>
--------------	----------------------------------	---------------------------------

Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección

II. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

<i>Fecha Firma de la Persona que Obtuvo el</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>
<i>Consentimiento/Investigador Principal</i>	

9.2 Cuestionario para datos clínicos



PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:
“DETECCIÓN TEMPRANA DE LAS ANEUPLOIDÍAS DE CROMOSOMAS
SEXUALES A TRAVÉS DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA DOSIS GÉNICA POR
qPCR EN MUESTRAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO PARA TAMIZ
NEONATAL AMPLIADO”.

Hospital_____

Datos clínicos del participante

Fecha_____ No. De identificación _____

Nombre:_____

Edad: _____ Fecha de nacimiento_____ Sexo: F M

Domicilio actual y tel: _____

Lugar de origen:_____

G ___ P ___ C ___ A ___

ANTECEDENTES PRE Y PERINATALES:

Control prenatal:_____

Amenaza de aborto y/o parto prematuro (edad gestacional y síntomas): _____

Enfermedades durante el embarazo:

Diabetes Mellitus

Epilepsia

Hipertensión

Enf. Infecciosas con fiebre

Patología Genética _____

OTRA _____

Exposición a agentes teratógenos:

Alcohol

Tabaco

Drogas (alcohol, marihuana, cocaína)_____

Biológicos _____

Medicamentos _____

Pruebas de diagnóstico prenatal (semana de gestación y hallazgo):

Ultrasonido _____

Duración de la gestación: _____ Tipo de parto: _____

Complicaciones _____

ANTECEDENTES NEONATALES:

APGAR: _____ Peso _____ Talla _____ PC _____

¿Requirió manejo neonatal? ¿Por qué?

Enfermedades congénitas: _____

Transfusiones: _____

***Transfusiones positivas es criterio de exclusión para este estudio.**

Responsable de obtención de datos: _____

Departamento de Genética, Facultad de Medicina U.A.N.L.
Protocolo: *“Detección temprana de las aneuploidías de cromosomas sexuales a través de la cuantificación de la dosis génica por qPCR en muestras de sangre en papel filtro para tamiz neonata ampliado”*.
Aprobación por Subdirección de Investigación de la Facultad de Medicina U.A.N.L. y comité de Ética con número de registro: GN13-002

CAPÍTULO X

10. BIBLIOGRAFÍA

¹Barch M.J, Knutsen T, Spurbeck J. L. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*.1997; Thirdedition.

²Alberto Juan Solari. *Genética Humana: Fundamentos y aplicaciones en medicina*. 3ra. Edición. 2007.

³Neissa J.I, Guerrero C. Del código genético al código epigenético. Nuevas estrategias terapéuticas. *Revista de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Colombiana* 2004; 52(4):287-303.

⁴Turnpenny P, Ellard S. Emery *Elementos de Genética Médica*. 13ª edición. ElsevierEspaña. 2009; pág. 45-54.

⁵Nieschlag E. Klinefelter Syndrome. The Commonest form of Hypogonadism, but Often Overlooked or Untreated.*DeutschesArzteblatt International*. 2013; 110(20):347-53.

⁶ Nielsen J. Wohler M. Sex Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-years incidence study in Arhus, Denmark. *Birth Defects Original Article Series Journal*.1990; 26:209-223.

⁷Jeon Y, Sarma K, Lee J.T. New and Existing Regulatory Mechanisms of X Chromosome Inactivation. *Current Opinion Genetics Dev.* 2012. April; 22(2):62-71.

⁸Lyon MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.* 1961;190:372-373.

⁹ Payer B, Lee JT. X Chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annu Rev. Genetics.* 2008; 42:733-722.

¹⁰ Otter M, Schrander-Stumpel CTRM, Curfs LMG. Triple X syndrome: a review of the literature. *European Journal of Human Genetics.* 2010;18:265-271.

¹¹Lubs HA, Ruddle FH. Chromosomal abnormalities in the human population: estimation of rates based on New Haven newborn study. *Science.* 1970; 169: 495–497

¹²Tartaglia NR, Howell S, Sutherland A, Wilson R, Wilson L. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2010; 5:8

¹³Rhoshel K, Lenroot MJ. A case control study of brain structure and behavioral characteristics in 47,XXX syndrome. *Genes Brain and Behavior.* 2014;20:841-849.

¹⁴Lin F. One case of 48,XXXX. *Chinese Journal of Medical Genetics.* 1996;13:122

¹⁵Villanueva AL, Rebar RW. Triple-X syndrome and premature ovarian failure. *Obstetrics and Gynecology Journal*.1983; 62(3): 70-73

¹⁶Tennes T, Puck M, Bryant K, Frankenburg W, Robinson A. A Developmental Study of Girls with Trisomy X. *American Journal of Human Genetics*.1975; 27:71-80.

¹⁷Everest E. Tsilianidis LA, Haider A. Rogers DG, Raissouni N, Schweiger B. 45X/47,XXX Mosaicism and Short Stature. *Case Reports in Pediatrics*. 2015. Article ID263253, 3 pages. doi:10.1155/2015/263253

¹⁸Otter M, Schrandner-Stumpel CT, Didden R, Curfs LM. The psychiatric phenotype in triple X syndrome: New hypotheses illustrated in two cases. *Developmental Neurorehabilitation*. 2012; 15(3): 233-238

¹⁹Deborah A, Driscoll MD, Gross S. Prenatal Screening for Aneuploidy. *New England Journal of Medicine*. 2009;360:2556-2562

²⁰TAMIZ NEONATAL, DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DE LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO. Lineamiento técnico. 2010. Secretaria de Salud.

²¹NORMA Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2002. Para la prevención y control de los defectos al nacimiento.

²²Cirigliano V, Ejarque M, Fuster C, Adinolfi M. X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *Molecular Human Reproduction*. 2002; 11:1042-1045.

²³Longui CA, Rocha MN, Martinho LC, Gomes GG, de Miranda RE, Lima TA, Melo MB, Monte O. Molecular detection of XO-Turner syndrome. *Genetics and Molecular Research*. 2002;1(3):266-70.

²⁴Gicquel CS, Cabrol et al. Molecular diagnosis of Turner's syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 1992;29(8):547-551.

²⁵ Rocha MN, Longui CA, Kochi C, Correa CSA, Faria CDC, Richeti F, Melo MR. Applicability of Real-Time PCR Methodology in the Neonatal Detection of Turner Syndrome. *Hormone and Metabolic Research*. 2010; 42:677-681.

²⁶Ibarra-Ramirez M, Zamudio-Osuna MJ, Campos-Acevedo LD, Gallardo-Blanco HL, Cerda-Flores RM, Rodriguez-Sanchez IP, et al. Detection of Turner syndrome by quantitative PCR of *SHOX* and *VAMP7* genes. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2015;19:88–92.

²⁷Campos Acevedo LD, Ibarra Ramírez M, Lugo Trampe JJ, Zamudio Osuna M, Torres Muñoz I, Velasco Campos MR, et al. Dosage of Sex Chromosomal Genes in Blood Deposited on Filter Paper for Neonatal Screening of Sex Chromosome Aneuploidy. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2016; 20(12):1-5.

²⁸Kubista MJM. Andrade et al. The real time polimerasa chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*.2006;27(2-3):95-125.

²⁹Guía de introducción a Applied Biosystems Step One™ Real-Time PCR System para experimentos de cuantificación relativa y CT comparativos. © Copyright 2006. 2010 Applied Biosystems.

³⁰Livak KJ, and Schmittgen TD. Analysis of relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$.*Methods*. 2001;25(4):402-8.

³¹Mangs H, Morris BJ. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): origin, function and future. *Current Genomics*. 8(2):129-136.

³²Blaschke RJ and Rappold G. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2006;16(3):233-9.

³³ McGowan Jordan J, Simons A, Schmid M. ISNC An International System for Human Cytogenomic Nomenclature.Karger. 2016.pag. 7-57.

³⁴Li M, Zou C, Zhao Z. Triple X Syndrome with Short Stature: Case Report and Literature Review. *Iran Journal of Pediatrics*. 2012; 22(2): 269-273.

³⁵Kim H, Hwang SS, Uh Y, Kim J, Yoon KJ, Lee J. A case Associated with Comorbidities among cerebral infarction, Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, and Triple X syndrome. *Turkish Journal of Hematology*. 2014;31(2): 184-187.

CAPÍTULO XI

11. AUTOBIOGRAFÍA

Isabel Moreno Vega

Candidato para el grado de Especialista en Genética Médica

Tesis: **“DETECCIÓN TEMPRANA DE POLISOMÍA DEL X MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE LA DOSISGÉNICA DE *SHOX* Y *VAMP7* POR Q-PCR EN MUESTRAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO”**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Aguascalientes, Ags. el 30 de mayo de 1987 hija de José Manuel Moreno Santos y Eva Vega Solís.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Aguascalientes con grado de Médico cirujano en el 2012.