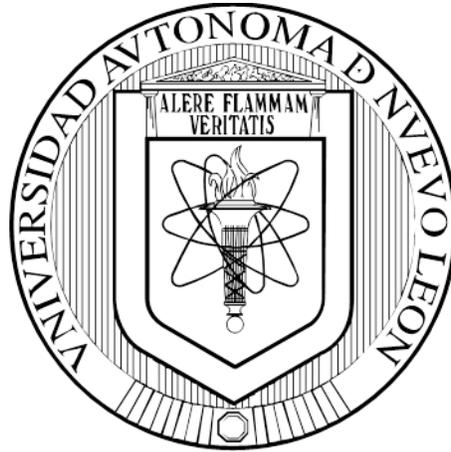


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**“DETERMINACIÓN DE SEXO CROMOSÓMICO POR DOSIS GÉNICA EN  
MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PAPEL FILTRO COMO UN  
MÉTODO PARA EL TAMIZ NEONATAL DE ANEUPLOIDÍAS SEXUALES”**

**POR  
LUIS DANIEL CAMPOS ACEVEDO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**SEPTIEMBRE, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**“DETERMINACIÓN DE SEXO CROMOSÓMICO POR DOSIS GÉNICA EN  
MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PAPEL FILTRO COMO UN  
MÉTODO PARA EL TAMIZ NEONATAL DE ANEUPLOIDÍAS SEXUALES”**

**POR  
DR. LUIS DANIEL CAMPOS ACEVEDO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**SEPTIEMBRE, 2016**

**“DETERMINACIÓN DE SEXO CROMOSÓMICO POR DOSIS GÉNICA EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PAPEL FILTRO COMO UN MÉTODO PARA EL TAMIZ NEONATAL DE ANEUPLOIDÍAS SEXUALES”**

**Aprobación de la tesis:**

\_\_\_\_\_  
**Dra. med. LAURA ELIA MARTÍNEZ DE VILLARREAL**  
**Director de la tesis**

\_\_\_\_\_  
**Dr. C. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA**  
**Miembro**

\_\_\_\_\_  
**Dr. med. ABEL GUZMÁN LÓPEZ**  
**Miembro**

\_\_\_\_\_  
**Dr. med. MANUEL ENRIQUE DE LA O CAVAZOS**  
**Miembro**

\_\_\_\_\_  
**Dr. med. JOSÉ FÉLIX VILCHEZ CAVAZOS**  
**Miembro**

\_\_\_\_\_  
**Dra. med. RAQUEL GARZA GUAJARDO**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

A Dios por el regalo de la vida y la dicha de disfrutarla.

A mis padres Guadalupe Acevedo y Fernando Campos por traerme a este mundo y que con su gran amor, eterno e incondicional apoyo he podido alcanzar mis metas y continúan siendo guía de esta aventura llamada vida. A mis Hermanos Pepe, Nancy y Andy por su apoyo y ejemplo de superación a mis TJ's y prim@s por su compañía y ser parte de mi vida.

A mí amada esposa Ale Aguirre que gracias a su gran apoyo, cariño, amor y cuidado me permiten ser mejor persona día con día y trazar un futuro juntos.

A mis hermosas, preciosas y amadas hijas Vale y Maryfer que son mi motor y motivo de seguir creciendo. Además de ponerle el toque divertido a la vida.

Existe mucha gente con la que me siento en deuda y quiero agradecerles. A Dra. med Laura Elia Martínez de Villarreal, tutora y directora de este trabajo, guía en la vida profesional y personal además por su siempre tratar de enseñar. A Marisol Ibarra por la idea original del trabajo y su apoyo en la realización de este. A José Lugo por su capacidad de resolver en el laboratorio. A Dra Roble, Luz Rojas Iris Torres por su apoyo en el laboratorio.

A mis compañeros de Trabajo Arellí, Dra. Bety, Vivi, Chayo, Consuelo, Gloria, Carmen, Hugo, Michelle, Iram así como a mis residentes de Genética Médica, médicos pasantes y alumnos de pregrado que me fomenta a estudiar.

A todo el equipo del Departamento de Genética por su apoyo

# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESÚMEN. ....	1
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN. ....	3
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS. ....	12
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS. ....	13
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS. ....	14
Capítulo VI	
6. RESULTADOS. ....	30
Capítulo VII	
7. DISCUSIÓN. ....	33
Capítulo VIII	
8. CONCLUSIÓN. ....	39

Capítulo IX

9. ANEXOS. ....	40
9.1 Dosis Génica de los controles. ....	40
9.2 Diagrama de Cajas y Bigotes. ....	42
9.3 Carta Consentimiento Informado. ....	45

Capítulo X

10. BIBLIOGRAFÍA. ....	52
------------------------	----

Capítulo XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO. ....	55
----------------------------------	----

## INDICE DE TABLAS Y CUADROS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Principales características clínicas de las aneuploidías sexuales.....	6
2. Diseño de los ensayos para los genes <i>SHOX</i> y <i>VAMP7</i> .....	22
3. Reactivos necesarios para la PCR.....	24
4 Programación del termociclador.....	25
5 Comparación de los valores de dosis génica de los genes <i>VAMP7</i> , <i>SHOX</i> y <i>SRY</i> de hombres y mujeres y su relación con el cariotipo.....	30
6 Pacientes detectados por dosis génicas .....	31
7 Resultados de dosis génica y cariotipo en neonatos con sospecha de aneuploidía sexual.....	31

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Segregación en la meiosis de un único par de cromosoma.....	4
2. Localización de los genes de estudio utilizados como marcadores para la cuantificación de la dosis génica.....	17
3 Esquema del diseño general. Etapa 1 y 2.....	26
4 Esquema del diseño general. Etapa 3.....	27
5 Fórmulas utilizadas para determinar el $\Delta\Delta CT$ y establecer la RQ de la dosis génica.....	28
6 Cariotipo de los neonatos con aneuploidía sexual identificados por dosis génica anormal.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADNg:** Ácido Desoxirribonucleico Genómico

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

**RQ:** cuantificación relativa

**PARs:** Regiones Pseudo Autosómicas

**Pb:** Pares de Bases

**SHOX:** short-stature homeobox

**CAP:** Colegio americano de Patología

**CNV:** Variación en el Número de Copias

**AR:** androgen receptor

**ARSE:** arylsulfatase E

**VAMP7:** vesicle-associated membrane protein 7

**µl:** Microlitros

**ml:** Mililitros.

# CAPITULO I

## 1. RESUMEN

Antecedentes: Las alteraciones en el número normal de cromosomas (46 o 2n) que no sean múltiplos del número haploide (23 o n) se les conoce como aneuploidías, las que involucran los cromosomas 1 al 22 se les llama Aneuploidías Autosómicas y las que comprenden el par 23 o cromosomas X o Y reciben el nombre de aneuploidías sexuales. Sólo un pequeño porcentaje de aneuploidías cromosómicas sexuales se detectan de manera oportuna; esto puede obstaculizar las intervenciones tempranas que podrían mejorar la calidad de vida de las personas que padecen este tipo de trastornos. En el presente trabajo se muestran los resultados de un estudio que tiene como propósito determinar las dosis de los genes *SHOX*, *VAMP7* y *SRY*, en hombres y mujeres sanos con la finalidad de proponer un método para la determinación del sexo cromosómico y detección de aneuploidías sexuales en recién nacidos.

Materiales y métodos: Se cuantificó la dosis génica de *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR), en sujetos de ambos sexos, establecido por cariotipo sin aneuploidías. Los valores promedio y desviaciones estándar se obtuvieron para cada uno de los genes analizados. Se estableció la cuantificación relativa (RQ) usando el método de comparación de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) y se hicieron comparaciones entre ambos sexos.

Resultados: Se cuantificó la dosis génica en un total de 32 sujetos (15 hombres y 17 mujeres). No se encontraron diferencias significativas en los valores de  $\Delta\Delta C_T$  de los genes entre hombres y mujeres para los genes *SHOX* y *VAMP7*. Sin embargo, hombres y mujeres difieren en la dosis génica del gen *SRY*. Una vez establecido los valores de referencia se monitoreo la estrategia en 1000 muestras de papel filtro obtenidas del programa de tamiz neonatal habiéndose identificado dos casos de aneuploidía los cuales fueron confirmados por cariotipo: síndrome de Turner y síndrome 47, XYY.

Conclusiones: Nuestros resultados establecen que es factible la determinación del sexo cromosómico mediante la cuantificación de las dosis de los genes *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* así como para la detección temprana de las aneuploidías sexuales mediante el tamiz neonatal.

## **CAPITULO II**

### **2. INTRODUCCIÓN**

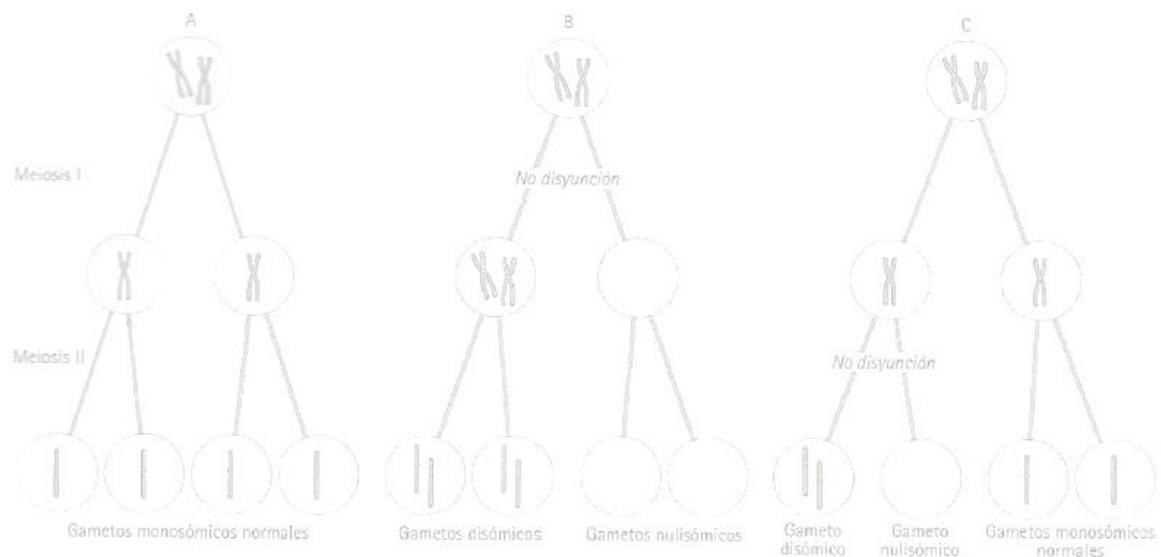
En el humano, la determinación del sexo genético tiene lugar al momento de la fecundación y depende del complemento cromosómico sexual de la célula germinal masculina (X o Y). Sin embargo, pueden ocurrir alteraciones que dan lugar a aneuploidías cromosómicas sexuales las cuales se definen como anomalías numéricas de los cromosomas X o Y; estos trastornos, junto con el síndrome de Down, son las cromosomopatías más frecuentes en el humano. A diferencia de las alteraciones numéricas autosómicas, las sexuales no muestran un fenotipo tan característico al nacimiento y solamente un porcentaje bajo es detectado de manera oportuna, como en el caso de la trisomía XXY o Síndrome de Klinefelter, el cual solo se detecta el 10% de los casos al nacimiento [1] mientras que el Síndrome de Turner entre el 30-50% [2, 3], retrasando la oportunidad de una intervención temprana y mejorar la calidad de vida de los individuos que las padecen [4].

#### **2.2 Epidemiología**

Las aneuploidías sexuales son un grupo de alteraciones cromosómicas numéricas siendo además las más frecuentes en el humano, afectando a uno de cada 400 recién nacidos vivos [5]

## 2.2 Etiología

Las aneuploidías resultan de una inapropiada segregación de los cromosomas a las células hijas, fenómeno conocido como “no disyunción”, lo cual puede ocurrir en las células masculinas o femeninas, ya sea durante la mitosis o meiosis. En los seres humanos la mayor parte de las no disyunciones son de origen materno (~90-95%). La no disyunción meiótica puede suceder en meiosis I, si fallan al separarse los cromosomas homólogos o en meiosis II, si las cromátides hermanas no logran separarse adecuadamente (figura 1).



**Figura 1. Segregación en la meiosis de un único par de cromosomas A) Meiosis normal, B) No disyunción en meiosis I. C) No disyunción en meiosis II.** (Modificado de Emery Elementos de Genética

Médica. Elsevier 2009)

Los factores de riesgo asociados a estas condiciones reportados en la literatura son: edad materna >35 años, errores en la recombinación, ausencia de la misma, así como otros mecanismos propuestos tal como la localización donde se lleve a cabo la recombinación [6].

### **2.3 Características Clínicas**

El fenotipo de las aneuploidías sexuales es muy variable y es reconocible en algunos síndromes como Turner, Klinefelter principalmente en la en la vida adulta.. Los principales signos y síntomas que se pueden presentar son: infertilidad, hipogonadismo hipergonadotrófico, talla baja y talla alta para síndrome de Turner y de Klinefelter respectivamente; sin embargo, en la mayor parte de los casos presentan fenotipos sutiles; en el cuadro 1 se muestran las características clínicas de las diferentes aneuploidías sexuales.

Características Clínicas	47,XXY	48,XXYY 48,XXXYY 49,XXXXYY	47,XYY	47,XXX	48,XXXX 49,XXXXX	45,X
<b>Genitales Externos Masculinos</b>	X	X	X			
<b>Genitales Externos Femeninos</b>				X	X	X
<b>Hipogadismo Hipergonadotrófico</b>	X	X				X
<b>Infertilidad</b>	X	X				X
<b>Cardiopatía</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Nefropatía</b>		X		X	X	X
<b>Ginecomastia</b>	X	X				
<b>Estrabismo</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Alergias</b>	X	X	X	X	X	
<b>Talla Alta</b>	X	X	X	X	X	
<b>Talla Baja</b>						X
<b>Diabetes Mellitus II</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Hipotiroidismo</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Falla Ovárica Precoz</b>				X	X	
<b>Alteraciones esqueléticas</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Anomalías Dentales</b>	X	X	X	X	X	X
<b>Mayor riesgo a desarrollar:</b>						
• Epilepsia	X	X	X	X	X	
• Hipotonía	X	X	X	X	X	
• Retraso psicomotor/ incoordinación	X	X	X	X	X	X
• Temblor	X	X	X	X	X	
• Paladar hendido /Ojival	X	X	X	X	X	X
• Insuficiencia Velofaríngea	X	X	X	X	X	
• Apnea obstructiva del sueño	X	X	X	X	X	
• Asma	X	X	X	X	X	
• Constipación	X	X	X	X	X	X
• Displasia congénita de Cadera				X	X	X
• Malformaciones Uterinas				X	X	
• Lupus Eritematoso Sistémico	X	X				
• Artritis Reumatoide	X	X				
• Enfermedad Celiaca						X
• Trombosis venosa profunda	X	X				
• Varices	X	X				
• Cáncer de mama	X	X				
• Linfoma no Hodgkin		X				
• Tumores germinales (testiculares o extragonadales)	X	X				

Cuadro 1. Principales características clínicas de las aneuploidías sexuales

## **Regiones Pseudo Autosómicas (PARs)**

El cromosoma X tiene 155 Millones de pares de bases (pb) de longitud y contiene más de 1000 genes mientras que el cromosoma Y tiene una longitud de 55 millones de pb y alrededor de 200 genes codificantes. La inactivación de uno de los cromosomas X en la mujer permite un equilibrio en la dosis génica con respecto a los hombres, no siendo así para las regiones denominadas pseudoautosómicas (PAR 1 y 2), las cuales escapan a la inactivación del cromosoma X y cuentan con genes homólogos en el cromosoma Y. Estudios recientes han demostrado que aproximadamente el 15% de los genes se expresan normalmente a partir de los dos cromosomas X y que otro 10% puede hacerlo de forma variable [7]. Las PAR 1 y 2, son las únicas regiones que realizan recombinación meiótica entre los cromosomas X y Y.

La PAR1 comprende 2,6 Mb del brazo corto de los cromosomas X y Y en humanos [8,9]. Todos los genes en PAR1 se escapan a la inactivación X contiene por lo menos 24 genes como, *PLCXD1*, *P2RY8* y *DHR SX*, recientemente identificados. El gen *SHOX* (short-stature homeobox) localizado en Xp22.33, también localizado en PAR1, pertenece a una familia de genes homeobox, reguladores transcripcionales que son controladores clave de procesos del desarrollo. La PAR2 se encuentra en el extremo distal de los brazos largos y es una región mucho más pequeña, que abarca sólo 320 kb. presenta una frecuencia menor de recombinación y está compuesta en su mayoría por pseudogenes. En esta región se han identificado 4 genes localizados en dirección centro-telomérica: *HSPRY3*, *VAMP7*, *IL9R* y *CXYorf1*.

## **Diagnóstico**

El estándar de oro para el establecimiento del sexo genético es el cariotipo de bandas GTG con los requerimientos establecidos por el Colegio americano de Patología (CAP). Ésta es una técnica que requiere de la toma de una muestra de sangre venosa, se requiere de una metodología compleja y su proceso dura aproximadamente 10 días.

Desde que McCabe y cols [10] reportó que el ADN genómico (ADNg) podría ser extraído de manchas de sangre en papel filtro y ser utilizado para la búsqueda de genes de ciertas enfermedades, algunos grupos de trabajo comenzaron a desarrollar métodos para la extracción y amplificación del ADNg en papel filtro [11, 12].

En la actualidad, los diversos métodos de extracción permiten obtener material genómico de cualquier muestra biológica, aunque aún no es factible el análisis de Variación en el Número de Copias (CNV), debido a que las casas comerciales no lo establecen dentro de sus alcances; sin embargo en el año 2012 Harahap y cols. [23] y Askglæde et al. [16] demuestran su utilidad para en el diagnóstico clínico de dosis génica, cabe mencionar que los estudios fueron retroactivos, es decir ya conocían el diagnóstico de los pacientes.

Mediante la cuantificación de la dosis génica de genes localizados en los cromosomas sexuales, es posible identificar el sexo cromosómico de un

individuo, ya que el hombre es hemicigoto para la mayoría de los genes localizados en el X en relación a la mujer, lo cual hace posible diferenciar ambos sexos, aunque en las regiones pseudoautosómicas contiene genes homólogos y se mantiene la homocigosidad [13].

Diversos autores han reportado el uso de la dosis génica como una herramienta para el diagnóstico de aneuploidías de los cromosomas sexuales. En el año 2005 Rocha y cols. [14] utilizaron los genes *AR* (androgen receptor) y *DAX1* (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1) y en el 2010, el gen *ARSE* (arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1), para el diagnóstico de síndrome de Turner [15] mientras Aksglaede y cols. [16] en el 2012, utilizando los genes *AR* y *SHOX* (short stature homeobox), lograron el diagnóstico de pacientes con el síndrome de Klinefelter.

Recientemente Ibarra-Ramírez y cols. [17] establecieron que mediante la cuantificación de la dosis génica de los genes pseudoautosómicos *SHOX* (PAR1) y *VAMP7* (vesicle-associated membrane protein 7) (PAR2), es factible identificar alteraciones en los cromosomas sexuales.

Es importante mencionar que en los casos anteriores ya se contaba con el diagnóstico de las aneuploidía en los pacientes, el cual fue realizado mediante el cariotipo de bandas GTG y lo que los autores evaluaron fue la factibilidad de hacerlo mediante el análisis de genes en muestras de sangre periférica.

## **Tamiz Neonatal**

El tamiz neonatal, es una estrategia de salud pública que se lleva a cabo para identificar a individuos en riesgo de desarrollar alguna enfermedad mediante la cuantificación de marcadores metabólicos y genéticos; éste se realiza en una muestra de sangre periférica obtenida por punción del talón la cual es colocada en papel filtro. El procedimiento es considerado no invasivo para el neonato.

Por lo anteriormente mencionado, no es factible ni ético utilizar el cariotipo en el recién nacido como una estrategia de tamiz, para la detección temprana de aneuploidías sexuales. Es entonces que el poder contar con una metodología, como la cuantificación de dosis génica, permitiría tener una herramienta sensible y útil que se podría utilizar para la identificación de individuos con aneuploidías sexuales y así poder brindar un diagnóstico oportuno, ya que se cumpliría con los criterios Wilson y Jungner [8], para tamiz neonatal, en los que se establece que la enfermedad a detectar, debe tener una incidencia elevada, posibilidad de un tratamiento médico efectivo, existencia de una prueba económica con alta sensibilidad y especificidad para un gran volumen de muestras y una relación costo-beneficio, entre otros.

En el presente trabajo se presentan los resultados de un estudio realizado para la obtención de parámetros de referencia de la dosis génica de los genes *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* obtenida mediante qPCR, en sujetos sanos y su aplicación en muestras de papel filtro, con la finalidad de establecer un protocolo para su uso en el tamiz de aneuploidías sexuales en neonatos,

analizando su utilidad en la determinación del sexo mediante la correlación con el cariotipo.

La perspectiva de éste trabajo es obtener información que permita la identificación de los sujetos con una aneuploidía sexual y su posterior aplicación en el tamiz neonatal de estas enfermedades, que como se mencionó anteriormente, podrían estar sub-diagnosticadas en la población general.

### **Justificación**

Las aneuploidías sexuales además de estar sub-diagnosticadas, cuando se logra la identificación de individuos con estas patologías, se ha perdido un valioso tiempo para realizar un manejo oportuno. El diagnóstico temprano mediante técnicas de biología molecular permitiría mejorar la calidad de vida de los que las padecen.

## CAPITULO III

### 3. HIPÓTESIS

#### Hipótesis alterna

- La cuantificación de la dosis génica de *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* en sangre tomada en papel filtro se correlaciona con el sexo cromosómico establecido por cariotipo.
- Hipótesis nula

La cuantificación de la dosis génica de *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* en sangre tomada en papel filtro NO se correlaciona con el sexo cromosómico establecido por cariotipo.

## CAPITULO IV

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Determinar el sexo cromosómico de hombres y mujeres, por dosis génica de *VAMP7*, *SHOX* y *SRY* en muestras de sangre periférica colocadas en papel filtro y correlacionar con el estándar de oro (cariotipo).

#### 4.2 Objetivos particulares

1. Obtener los valores de referencia de dosis génica de los genes *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* de sangre periférica en papel filtro, de hombres y mujeres sanos.
2. Correlacionar el género obtenido por dosis génica con cariotipo (estándar de oro)
3. Implementar la metodología utilizando muestras obtenidas de sangre periférica de pacientes conocidos con aneuploidías sexuales.
4. Analizar 1,000 muestras de tamiz neonatal para la identificación de pacientes con aneuploidías sexuales.
5. En los casos positivos correlacionar con cariotipo.

## **CAPITULO V**

### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1 Tipo del estudio**

- Observacional
- Transversal
- Descriptivo
- Prospectivo
- Ciego
- Tipo de estudio: Prueba diagnóstica

#### **5.2 Población de Estudio**

El estudio consta de tres etapas: Para la primera etapa del estudio se invitó a participar a hombres y mujeres mayores de 18 años de edad aparentemente sanos. En la segunda etapa, se invitaron sujetos con diagnóstico de aneuploidías sexuales previamente confirmados por cariotipo y en la tercera etapa se analizaron muestras del tamiz neonatal ampliado que se lleva a cabo en los hospitales de los Servicios de Salud de Nuevo León y Hospital Universitario “Dr. José E. González” para lo cual se solicitó la participación a las madres o tutores de los menores. Todos los individuos firmaron una carta de consentimiento informado.

El estudio fue previamente evaluado y aprobado por el comité de ética de la sub-dirección de investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Registro GN14-006).

### **5.2.1 Criterios de inclusión**

Primera etapa:

- Sujetos voluntarios sanos con fenotipo de hombre y mujer, mayores de 18 años de edad.

Segunda etapa:

- Pacientes con diagnóstico clínico y por laboratorio (cariotipo) de aneuploidía sexual, (grupo control positivo).

Tercera etapa:

- Recién nacidos vivos aparentemente sanos (validación de la metodología).

### **5.2.2 Criterios de Exclusión**

Individuos que hayan recibido una transfusión en los últimos tres meses.

Imposibilidad de tomar muestras de sangre.

### **5.2.3 Criterios de eliminación**

Muestra inadecuada

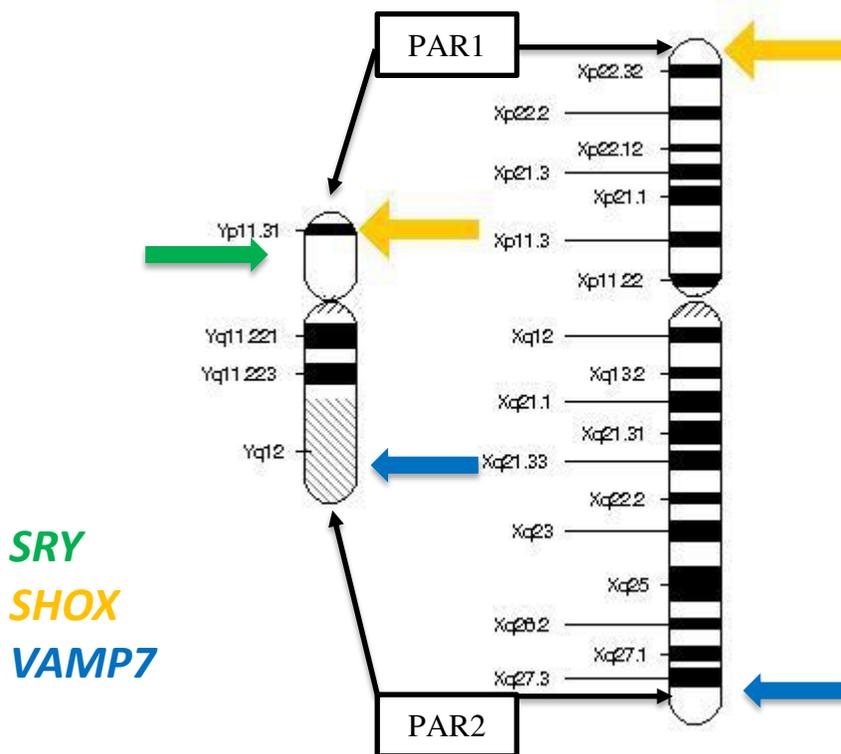
Individuos que retiren su consentimiento para participar en el estudio

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  $\Delta\Delta CT$ , que nos permite a través del uso de un gen de referencia endógeno establecer la dosis génica de un gen de estudio determinado.

Se utilizaron tres genes como probables marcadores que permitan una detección sensible y específica de los cromosomas sexuales, de acuerdo al reporte de Ibarra et al. [17], los genes que se analizaron fueron: **SHOX** (Xp22.32) dentro de la región pseudoautosómica 1 (PAR1), escapa a la inactivación del X y se encuentra en forma bialélica tanto en hombres como en mujeres. **VAMP7** (Gen Vesicle-associated membrane protein 7) (Xq28) perteneciendo a PAR2 y cuenta con un homólogo en la PAR2 del cromosoma Y (Yq12). **SRY** localizado en Yp11.13 exclusivo del cromosoma Y (Figura 2).



**Figura 2. Localización de los genes de estudio utilizados como marcadores para la cuantificación de la dosis génica.**

### 5.3.1 Colección de muestras

A todos los sujetos adultos se les tomó una muestra de 5 cc de sangre venosa periférica en un tubo conteniendo heparina (tapa verde) y una muestra de gotas de sangre obtenida por punción digital y colocada en tarjetas de papel filtro (Whatman FTA elute micro card wb120410) dichas muestras fueron obtenidas en la sala de toma de muestras del departamento de Genética del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las muestras de recién nacidos se obtuvieron por punción del talón después de 24 horas de vida y colocadas en papel filtro, en los hospitales

Universitario “Dr. José Eleuterio González” y Hospital Regional de Alta Especialidad Materno Infantil de los Servicios de Salud de Nuevo León.

### **5.3.2 Cariotipo**

Se realizó una toma de sangre periférica en condiciones de máxima esterilidad, en tubo heparinizado que posteriormente se sometió a cultivo durante 72 horas.

Se realizó el proceso de siembra en un medio de cultivo RPMI. Se cosecharon las células en metafase, utilizando colchicina para inhibir la anafase, posteriormente se sometieron a un choque hipotónico con KCL, posteriormente se fijaron con Carnoy para la extensión y obtención de las metafases.

El bandeo se realizó tratando a los cromosoma con tripsina y tiñéndolos con Giemsa.

#### **Equipo**

- Microscopio tipo Olympus BXS1
- Analizador de imágenes CITOVISION ver 3.9
- Incubadora de CO2

#### **Reactivos**

- Medio cultivo RPMI
- Cloruro de potasio
- Fijador Carnoy (Cloroformo, etanol y ácido acético)

## **Material**

- Guantes
- Jeringa BD plastipak TM 5ml
- Tubo BD Vacutainer Heparinizado TM (Tapa verde) 5ml

### **5.3.3 Extracción automatizada de ADN**

La extracción de ADN se realizó de forma automatizada con el uso del equipo QIAcube® y el kit de extracción QIAamp® ADN Mini and Blood Mini que realiza la purificación del ADN de muestras de sangre periférica, basado en el uso de columnas de sílica que facilitan la eliminación de inhibidores, lo cual permite tener una buena calidad y concentración de ADN. Este método se realiza en tres pasos: la ruptura de la membrana celular usando una combinación de actividad enzimática y lisis mecánica (calor y agitación); la unión del ADN a una membrana a base de sílica que se encuentra en una columna por donde pasa la muestra para eliminar los contaminantes y un último paso de elución donde se obtiene el ADN para su posterior cuantificación.

## **Equipo**

- QIAcube. Qiagen (EUA)

## **Reactivos**

- Etanol grado Biología Molecular
- QIAamp® ADN Mini and Blood Mini

## **Material**

- Tubos CB (2ml) especiales para el QIAcube.
- Tubos de elusión de 1.5mL
- Micropipeta de 20—200uL
- Puntas con filtro, 200 µl especiales para el QIAcube.
- Puntas con filtro, 1000 µl especiales para el QIAcube.
- Adaptadores del Rotor.
- Porta adaptadores del Rotor.

## **Procedimiento**

- Se agregan 200 µL de la muestra de sangre periférica en los tubos CB previamente identificados y se colocan en el QIAcube siguiendo el protocolo del proveedor
- Se seleccionó el nombre del Kit, el tipo de muestra así como el protocolo y, se procedió a realizar la extracción. El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría (NanoDrop® ND-1000).

### 5.3.4 Cuantificación y calidad del ADN

#### Fundamento

Una concentración adecuada (aproximadamente 10-100 ng/ $\mu$ l) y una óptima calidad, de la muestra de ADN, para una PCR en tiempo real (qPCR), son datos cruciales para la obtención de los resultados. La estimación de la calidad de una muestra de ADN es obtenida por la relación de absorbancia 260/280 nm. En una muestra pura de ADN, la relación de absorbancia 260/280 nm debe ser de 1.8 a 2, valores inferiores indican contaminación de la muestra con proteínas y valores superiores hasta 2.0 indican preparaciones altamente purificadas, si los valores son todavía mayores a 2.0 indica que el ADN se encuentra contaminado con fenol.

### 5.3.5 Metodología general

Se utilizó el ensayo personalizado Custom Plus TaqMan® Copy Number Assays que contiene una mezcla de primers forward, reverse, y la sonda TaqMan®. Los ensayos se diseñaron para los genes *SHOX* (SHOXXY\_CC0IW4G), *VAMP7* (VAMP7HG\_CCQJBQO) y *SRY* (Hs01079437\_cn), marcadas con el fluorocromo FAM™ y las siguientes secuencias (Cuadro 2).

Assay ID	Assay Mix Concentration	Reporter 1 Dye	Reporter 1 Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Reporter 1 Quencher	Forward Primer Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Reverse Primer Concentration ( $\mu\text{M}$ )
SHOXXY_CC0IW4G	60x	FAM	15	NFQ	54	54
VAMP7HG_CCQJBQO	60x	FAM	15	NFQ	54	54

Assay ID	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence	Reporter 1 Sequence
SHOXXY_CC0IW4G	GAGACCAGTAATTGCACCAGACA	GCTGTTATTTACGCCTTTCCATTGG	CCAGCCCCCATGCGCT
VAMP7HG_CCQJBQO	AGAGAACAAGGAGTTAAAAGCAATCCA	AGTGAGAAGAGGGTTGAAGAGACT	CCTTTCACATACTGACAGATGGTATCT

Cuadro 2. Diseño de los ensayos para los genes SHOX y VAMP7. No se incluye SRY por ser secuencia patentada de Applied Biosystems.

Este ensayo se corre simultáneamente con TaqMan® Copy Number Reference Assay (RNAseP) 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  $C_T$  ( $\Delta C_T$ ) entre el gen de interés y la secuencia del gen de referencia y compara el valor de  $\Delta C_T$  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. El análisis se llevó a cabo en un equipo StepOnePlus™ System (applied, EUA)

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.

### **Equipos**

- StepOnePlus™ System (Applied Biosystem)

### **Reactivos**

- TaqMan® Copy Number Assay
- 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 – 0.5 ml)

### Calidad de ADN

Se deben diluir las muestras de ADN para que todas se encuentren en la misma concentración (5ng/μl), con una absorbancia ( $A_{260}/A_{280}$ ) mayor a 1.7.

### Protocolo

- Cada PCR debe incluir la muestra de ADN de pacientes y/o controles, un control negativo y la muestra de ADN de referencia. (Cuadro 3).

Reactivos	Vol final (20μl)
2X TaqMan® Genotyping Master Mix	10
TaqMan® Copy Number Assay, 20X	1
TaqMan® Copy Number Reference Assay, 20X	1
Agua libre de nucleasas	4
ADN	4
Volumen Total	20

*Cuadro 3. Reactivos necesarios para la PCR.*

Proceso:

Mezclar y agregar a una placa de 96 pozos los 16  $\mu$ l de mix de reacción a cada pozo y 4  $\mu$ l 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 con el siguiente programa (Cuadro 4):

Paso		Temperatura	Tiempo
1		95°C	10 min
2	40 ciclos	95°C	15 seg
3		60°C	60 seg

**Cuadro 4. Programación del termociclador.**

Extraer los tubos de reacción una vez que la PCR ha terminado.

## 5.4 Esquema de la estrategia general

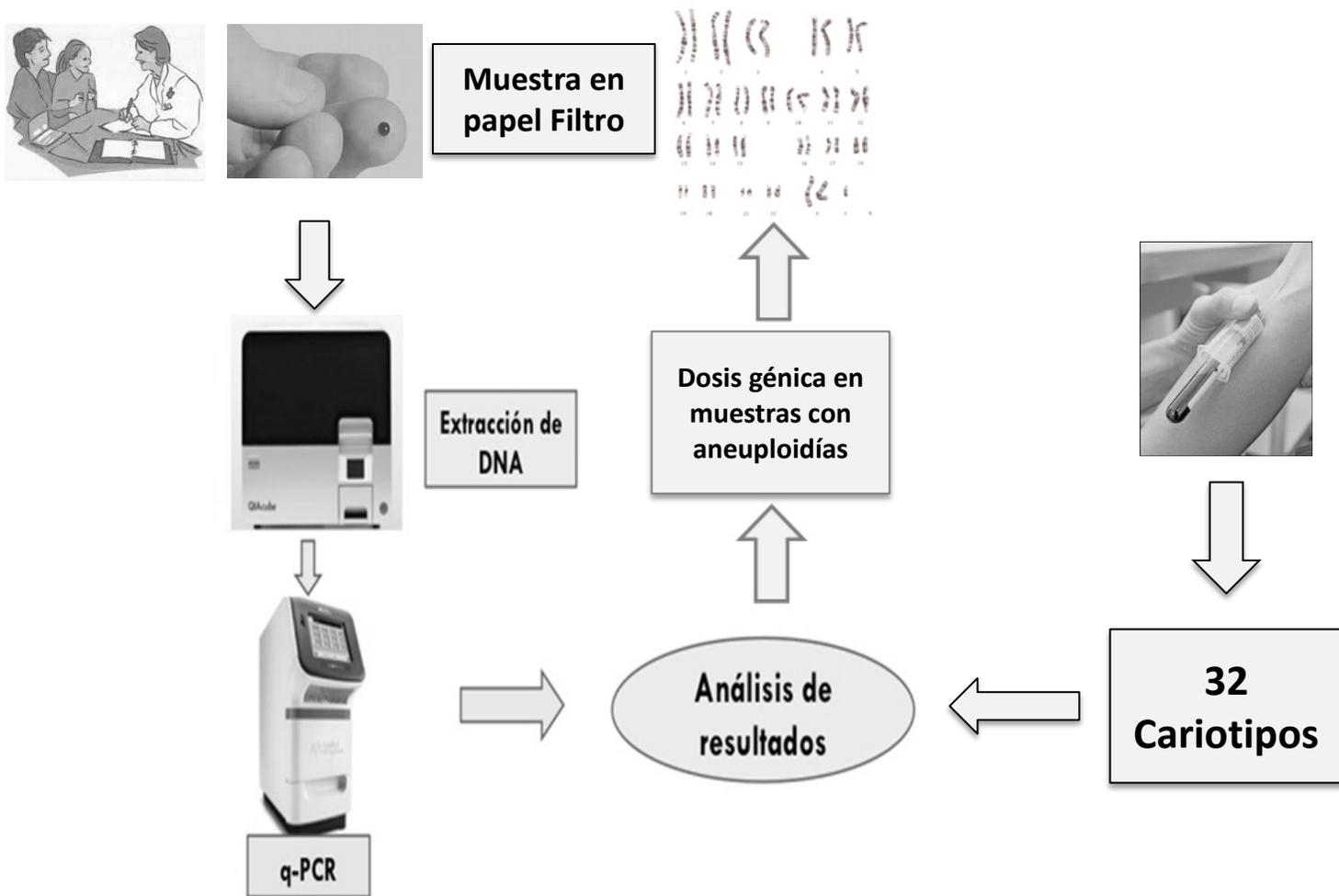


Figura 3. Esquema del diseño general. Etapa 1 y 2

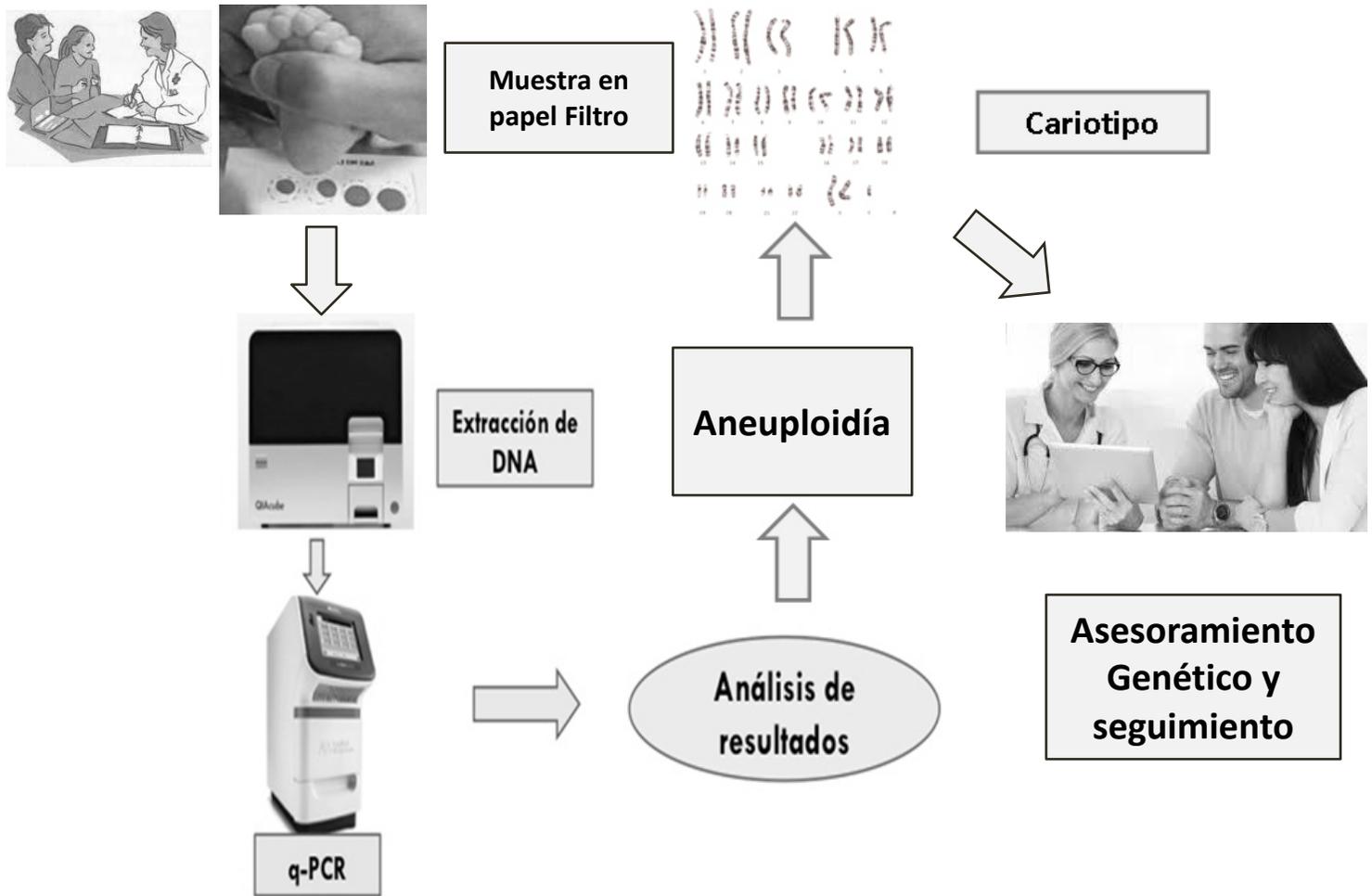


Figura 4. Esquema del diseño general. Etapa 3

## 5.5 Análisis estadístico

La cuantificación de los cambios relativos en la dosis génica mediante PCR en tiempo real requiere ciertas ecuaciones establecidas en el método  $\Delta\Delta C_T$  que ha demostrado ser una herramienta muy útil para calcular cambios relativos en la expresión génica y en la cuantificación de ADN. El número de copias de la secuencia de interés en cada muestra es determinado por la cuantificación relativa (RQ) usando el método de comparación de  $C_T$  ( $\Delta C_T$ ) [16]. Este método mide la diferencia de  $C_T$  ( $\Delta C_T$ ) entre el gen de interés y la secuencia del gen de referencia (Figura 5).

$$\Delta C_{T=} C_{T \text{ gen estudio}} - C_{T \text{ gen referencia}}$$

$$\Delta\Delta C_{T=} \Delta C_{T \text{ gen estudio}} - \Delta C_{T \text{ gen referencia}}$$

**Figura 5. Fórmulas utilizadas para determinar el  $\Delta\Delta C_T$  y establecer la RQ de la dosis génica**

Los archivos que contienen los valores  $C_T$  de cada muestra son exportados al software del equipo (*Step One Plus de Applied Biosystem*<sup>®</sup>) para el análisis de los datos post-PCR en experimentos de cuantificación de número de copias.

Con los resultados obtenidos de la cuantificación relativa de la dosis génica para cada uno de los genes marcadores, se realizó un análisis descriptivo con el programa estadístico IBM® *SPSS* versión 21, se estableció el cálculo de una *t* de Student de dos colas, para establecer si los valores entre los diferentes grupos presentan diferencias significativas para cada uno de los diferentes genes estudiados.

## CAPITULO VI

### 6. RESULTADOS

Se reclutaron 32 adultos jóvenes sanos (15 mujeres y 17 hombres). Se obtuvieron los valores promedio y desviaciones estándar para cada uno de los genes analizados (Anexo1); los valores  $\geq$  o  $\leq$  3 desviaciones estándar se consideraron fuera de rango (anormales). Los valores obtenidos se presentan en el cuadro 5 donde se muestra, mediante la prueba de Shapiro-Wilk, que éstos presentan una distribución normal. No se observaron diferencias significativas de los valores entre hombres y mujeres de los genes *VAMP7* y *SHOX*, únicamente se observaron diferencias en el *SRY*. En el anexo se muestran las gráficas de cajas y bigotes entre de las dosis génicas del grupo XY contra el grupo XX.

Genes	Cariotipo	N	Media	DS	Min/Max	Shapiro-Wilk	T Student
<b>RQVAMP7-a</b>	46,XX	15	0.9545	0.109 0	0.803 /1.212	0.387( p<0.05)	0.938 (p>0.05)
	46,XY	17	0.9922	0.077 3	0.884/1.06 2	0.542(p<0.05)	
<b>RQSHOX-b</b>	46,XX	15	0.9772	0.052 3	0.847 /1.038	0.162 ( p>0.05)	0.264 (p>0.05)
	46,XY	17	0.9757	0.059 2	0.880/1.06 2	0.362 (p>0.05)	
<b>RQSRY-c</b>	46,XX	15	0.0	0.0	0/0	0 (p<0.05)	0.0 (p<0.05)
	46,XY	17	0.9888	0.085 8	0.796/1.18 1	0.679(p< 0.05)	

a *VAMP*

Coefficiente de correlación  $r^2= 0.9989$  , PCR eficiencia = 1.9704

b *SHOX*

Coefficiente de correlación  $r^2= 0.99835$  , PCR eficiencia = 1.9129

c *SRY*

Coefficiente de correlación  $r^2= 0.99916$  , PCR eficiencia = 1.9724

Cuadro 5. Comparación de los valores de dosis génica de los genes *VAMP7*, *SHOX* y *SRY* de hombres y mujeres y su relación con el cariotipo.

En el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos de pacientes con aneuploidías sexuales: Síndrome de Turner (45, X) n= 2 y Síndrome de Klinefelter (47,XXY) n = 2, donde se puede discriminar la patología mediante los valores de dosis génica.

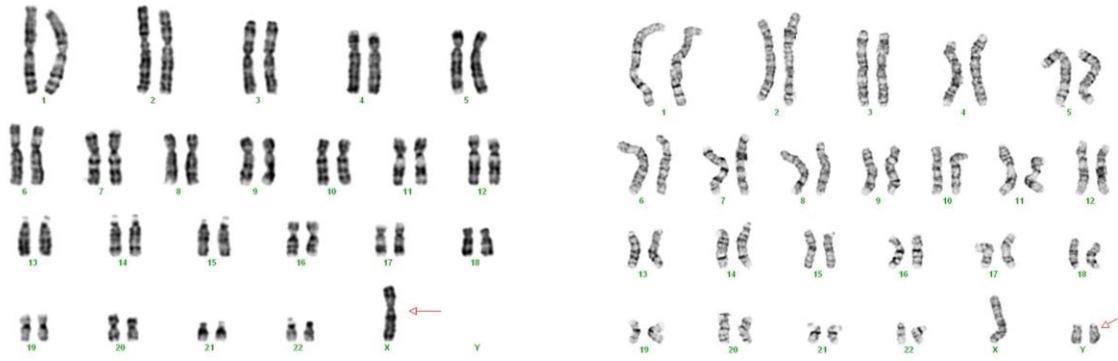
<b>Pacientes</b>	<b>Cariotipo</b>	<b>SHOX</b>	<b>VAMP7</b>	<b>SRY</b>
<b>Sd Turner 1</b>	45,X	0.6 (-7DS)	0.53 (-13DS)	0
<b>Sd Turner 2</b>	45,X	0.39 (-11DS)	0.41 (-4.9DS)	0
<b>Sd Klinefelter 1</b>	47,XXY	1.32 (+5.8DS)	1.28(+3.7DS)	0.96(+1.1DS)
<b>Sd Klinefelter 2</b>	47,XXY	1.52(+9.1DS)	1.52(+6.8DS)	1.1(+1.4DS)

Cuadro 6. Pacientes detectados por dosis génicas

En el análisis de las 1000 muestras de sangre periférica en papel filtro de recién nacidos (Fenotipo: 487 femeninos y 513 masculinos) se detectaron dos con valores fuera de rango sugestivos de: monosomía del X y polisomía del Y (Cuadro 7), los cuales se corroboraron con el cariotipo de bandas GTG (Figura 6).

<b>Genes</b>	<b>Fenotipo Femenino</b>	<b>Cariotipo</b>	<b>Fenotipo Masculino</b>	<b>Cariotipo</b>
<b>SHOX</b>	0.59 (-7.4DS)	45,X	1.71 (+12DS)	47,XY
<b>VAMP7</b>	0.62(-3.06DS)		1.56(+7DS)	
<b>SRY</b>	0		1.80(+9.5DS)	

Cuadro 7. Resultados de dosis génica y cariotipo en neonatos con sospecha de aneuploidía sexual



45,X (Síndrome de Turner)

47,XYY

Figura 6. Cariotipo de los neonatos con aneuploidía sexual identificados por dosis génica anormal

## CAPITULO VII

### 7. DISCUSIÓN

La necesidad de contar con estrategias que permitan la detección temprana de distintas enfermedades, ha impulsado el desarrollo de técnicas, que a la fecha, permiten el diagnóstico oportuno de un gran número de padecimientos, favoreciendo la intervención temprana y mejorando la calidad de vida de quien las padece [18]. El tamiz neonatal existe en la actualidad para una serie de enfermedades del metabolismo e incluso en algunos casos de trastornos genéticos; sin embargo, a la fecha no se cuenta con un tamiz neonatal para anomalías cromosómicas [1].

Diversos estudios han sido realizados para la identificación de las aneuploidías sexuales por medio de qPCR determinando la dosis génica, como los reportados por Rocha y cols. [13, 14], Aksglaede L y cols. [15], Ibarra y cols. [17], los cuales, de manera retrospectiva han tenido altas tasas de correlación diagnóstica de las alteraciones numéricas sexuales, con el estándar de oro que es el cariotipo. En el trabajo de Ibarra y cols [17], a diferencia de los anteriores, utiliza la dosis génica de ambos cromosomas sexuales, lo que permite discriminar el número de cromosomas X y Y presentes en un individuo. Todos ellos realizados en ADN de sangre periférica.

En el presente estudio, se implementó exitosamente una estrategia, mediante la cuantificación de dosis génica, para la identificación de aneuploidías sexuales a través de muestras de sangre colocadas en papel filtro. El análisis de CNV en qPCR es una metodología sencilla y costo-eficiente para los diferentes laboratorios de diagnóstico, haciendo posible analizar de manera simultánea hasta 96 muestras, con alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, esta técnica no había sido empleada con ADN obtenido de una muestra de sangre en papel filtro. Pocos estudios llevados a cabo en papel filtro han permitido pensar en la utilización de este blanco biológico como material para que el análisis de CNV sea posible [20] proporcionando una manera fácil y barata de recolectar y almacenar muestras de sangre periférica de neonatos, especialmente en entornos de bajos recursos, donde el almacenamiento y envío de muestras congeladas son difíciles, permitiendo ser una opción para el tamiz genético.

Siempre que se aplican nuevas tecnologías, los laboratorios deben establecer sus propias condiciones de análisis y valores de referencia para la población en estudio, de tal modo que cumplan con los requisitos pre-establecidos de aseguramiento y control de la calidad [19].

El contar con muestras de pacientes con alteraciones cromosómicas ya conocidas permitió la validación de los valores de corte establecidos con los controles sanos. En el caso muestras de pacientes con síndrome de Turner o monosomía del X mostraron en *SHOX* y *VAMP7* una dosis génica por debajo

de 3DS y ausencia de *SRY* mientras que en los pacientes con Síndrome de Klinefelter, se determinó que la dosis de *SHOX* y *VAMP7* estaban por arriba de 3DS y *SRY* dentro de valores normales. Los valores obtenidos fueron los esperados dependiendo de alteración numérica sexual, disminución de la dosis ( $\leq 3DS$ ) en *SHOX* y *VAMP7* para síndrome de Turner y elevación de la dosis ( $\geq 3DS$ ) para *SHOX* y *VAMP7* con dosis normal de *SRY* para Síndrome de Klinefelter. Ambos diagnósticos fueron corroborados por cariotipo. Siendo una ventaja el contar con genes que cuantifiquen genes de ambas PAR en los cromosomas sexuales y teniendo un gen exclusivo del cromosoma Y (*SRY*) sobre los trabajos previamente reportados.

En las 1000 muestras de papel filtro de sangre periférica de recién nacidos analizadas, se detectaron dos que mostraron una dosis génicas fuera de los rangos establecidos. El primer caso fue un neonato femenino con dosis génicas disminuidas de *SHOX*: 0.59 (-7.4DS) y *VAMP7*: 0.62 (-3.06DS), que no presentaba dismorfias ni alteraciones a la auscultación cardiaca al momento de la exploración física, o algún dato en ese momento que evidenciara la ausencia de un cromosoma sexual, y a al realizarle un cariotipo se reportó fórmula cromosómica 45,X, corroborando la sospecha molecular de síndrome de Turner.

Este síndrome tiene una tasa de diagnóstico del 50% de los casos al nacimiento cuando las características clínicas son sugestivas del cuadro y el 50% restante se hace diagnóstico en la adolescencia principalmente por la amenorrea. El

retraso del diagnóstico tiene implicaciones sociales, cognitivas y físicas como lo es la talla baja, osteoporosis, hipoplasia uterina, función sexual y socialización [3].

Los programas de tamiz neonatal se utilizan sólo para trastornos para los cuales existe una fuerte evidencia de beneficio, para el recién nacido, de un régimen de tratamiento que esté disponible [8]. El detectar de manera oportuna los casos de síndrome de Turner permitirá mejorar la talla final con el uso de terapia sustitutiva con hormona de crecimiento y microdosis continuas de estrógenos, lo que permite obtener una talla incluso normal para algunas de las pacientes y sustituir la función gonadal para conseguir el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios. A estos objetivos se debe incluir de forma individual el manejo de otras co-morbilidades detectadas como son las cardiopatías congénitas, malformaciones renales y control endocrinológico, teniendo en cuenta otros aspectos importantes como los trastornos psicológicos y emocionales que conlleva la ausencia de maduración sexual y la talla baja de la niña [21].

El segundo caso fue un neonato masculino con elevación de la dosis génica en los tres genes estudiados *SHOX*: 1.71 (+12DS), *VAMP7*: 1.56 (+7DS) y *SRY*: 1.80 (+9.5DS), a la exploración física presentaba hipertelorismo y micropene, la fórmula cromosómica fue 47, XYY, explicando la elevación de la dosis génica en todos los genes y confirmando el diagnóstico de síndrome XYY. Ambos pacientes actualmente están bajo vigilancia y seguimiento médico oportuno. El porcentaje de diagnóstico de los pacientes con síndrome 47, XYY en etapa

neonatal es desconocida ya que no presenta un cuadro clínico tan característico y más del 85% de los casos nunca se diagnosticarán [22], sin embargo, la falta de un diagnóstico oportuno afectará su calidad de vida al no atender adecuadamente los trastornos de conducta y presentar mayor susceptibilidad de desarrollar asma y epilepsia.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una frecuencia mayor que la reportada en la literatura para algunas aneuploidías sexuales, se detectó un caso de síndrome de Turner en 487 neonatos fenotípicamente femeninos cuando en la literatura lo reportado es uno en 2500 [13] y un caso de polisomía del Y en 513 neonatos del sexo masculino, lo reportado en la literatura es de uno en 1000 [22], sin embargo se requiere aumentar el tamaño de la muestra para establecer la incidencia de estos casos para corroborar estos hallazgos.

La frecuencia reportada es en función de aquellos que presentan manifestaciones al nacimiento o que son identificados después de una búsqueda intencional de las características clínicas, el hacer un tamiz de este tipo podrá arrojar una frecuencia al nacimiento más confiable.

Es importante señalar que en esta fase del estudio no se ha evaluado su utilidad para la detección de las alteraciones estructurales en el síndrome de Turner. Además se tendrá que ver la utilidad del método en la detección de aneuploidías en mosaico, lo cual, en el caso del síndrome de Turner es de gran relevancia la detección de mosaicos 45,X/46,XY, por el riesgo en estas

pacientes para desarrollar gonadoblastoma y una detección temprana de la cromosomopatía permitiría una intervención oportuna de esta complicación.

Dentro de las condiciones que pueden ocasionar una discrepancia en la correlación de sexo genotípico y cromosómico modificando la interpretación de la dosis génica podría estar los desórdenes testiculares DSD (hombres 46,XX). Las aneuploidías sexuales que se presenten a manera de mosaico pueden ser detectados dependiendo la cantidad de líneas celulares afectadas sin embargo están fuera del alcance del presente estudio.

## **CAPITULO VIII**

### **8. CONCLUSIÓN**

En el presente estudio, se demostró que la cuantificación de la dosis génica de genes específicos localizados en las regiones pseudoautosómicas de los cromosomas sexuales, a través de muestras de sangre obtenidas en papel filtro, es un método viable y eficaz para la identificación de pacientes con aneuploidías sexuales. Por lo anterior, se propone como un método factible para su aplicación como una técnica rápida y a gran escala como una prueba de tamiz para la detección neonatal de las aneuploidías sexuales.

## CAPITULO IX

### 9. ANEXOS

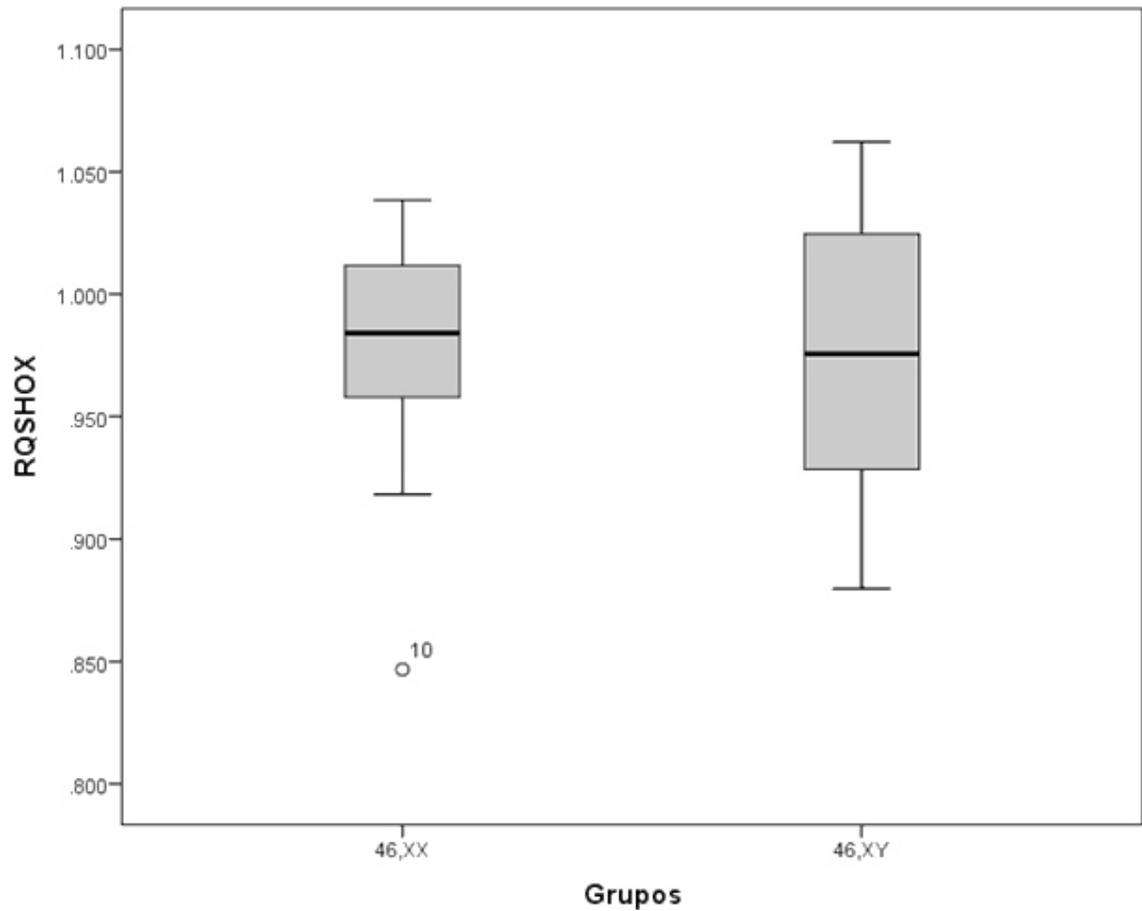
#### Dosis Génica de los controles

<b>Individuo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Cariotipo</b>	<b>SHOX</b>	<b>VAMP7</b>	<b>SRY</b>
1	Mujer	46,XX	.98	1.21	.00
2	Mujer	46,XX	.98	.99	.00
3	Mujer	46,XX	1.03	.80	.00
4	Mujer	46,XX	1.03	.99	.00
5	Mujer	46,XX	1.00	.96	.00
6	Mujer	46,XX	1.00	.87	.00
7	Mujer	46,XX	.84	.84	.00
8	Mujer	46,XX	.91	1.05	.00
9	Mujer	46,XX	.96	.88	.00
10	Mujer	46,XX	.95	.97	.00
11	Mujer	46,XX	.92	1.09	.00
12	Mujer	46,XX	.96	.88	.00
13	Mujer	46,XX	1.03	.98	.00
14	Mujer	46,XX	1.01	.84	.00
15	Mujer	46,XX	.98	.91	.00
16	Hombre	46,XY	.90	.95	.92
17	Hombre	46,XY	.88	.91	.93
18	Hombre	46,XY	.92	1.01	1.03
19	Hombre	46,XY	1.00	1.00	1.01
20	Hombre	46,XY	.90	.89	1.05

<b>21</b>	Hombre	47,XY	.93	.97	.94
<b>22</b>	Hombre	46,XY	.95	.97	.93
<b>23</b>	Hombre	46,XY	1.03	1.16	1.18
<b>24</b>	Hombre	46,XY	1.06	.94	1.04
<b>25</b>	Hombre	46,XY	.91	1.05	.95
<b>26</b>	Hombre	46,XY	1.06	1.00	1.01
<b>27</b>	Hombre	46,XY	1.00	1.06	.95
<b>28</b>	Hombre	46,XY	1.04	1.12	.91
<b>29</b>	Hombre	46,XY	1.00	1.03	.79
<b>30</b>	Hombre	46,XY	.97	.90	1.10
<b>31</b>	Hombre	46,XY	1.02	.96	1.00
<b>32</b>	Hombre	46,XY	.94	.88	.98

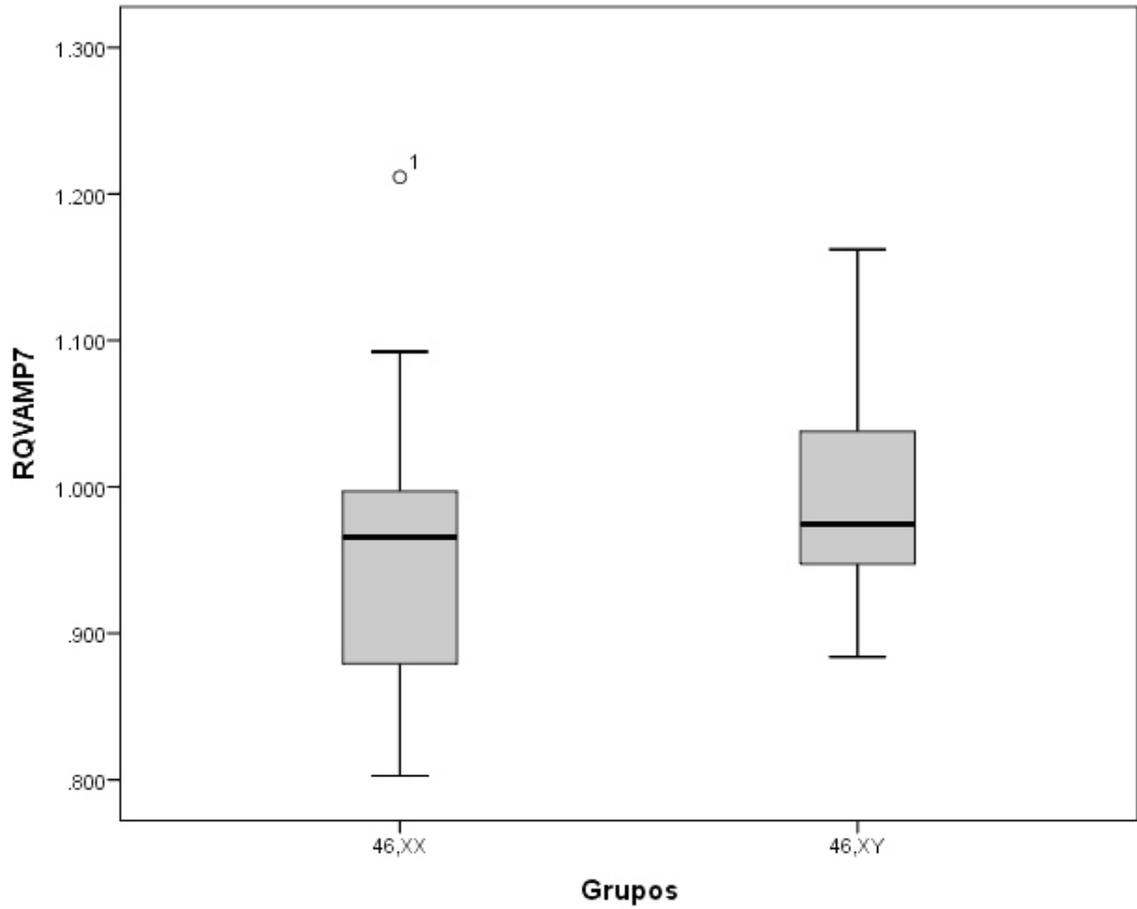
## Diagrama de Cajas y Bigotes

### *SHOX*



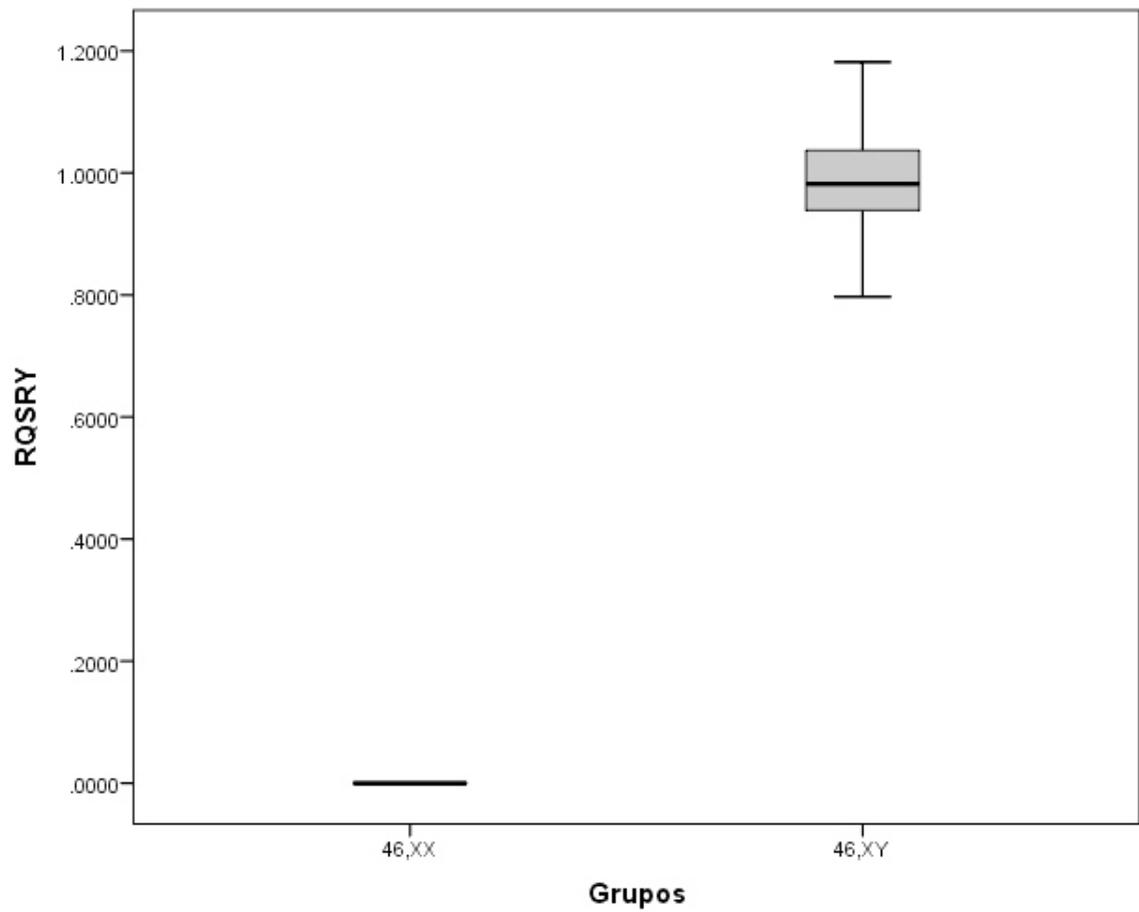
Representación visual de los valores mínimos y máximos de la dosis génica del gen *SHOX* entre los grupos controles, divididos por sexo cromosómico.

## VAMP7



Representación visual de los valores mínimos y máximos de la dosis génica del gen *VAMP7* entre los grupos controles, divididos por sexo cromosómico.

## ***SRY***



Representación visual de los valores mínimos y máximos de la dosis génica del gen *SRY* entre los grupos controles, divididos por sexo cromosómico.

## 9.1 Carta de consentimiento informado



Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"  
UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**CONSENTIMIENTO INFORMADO**FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

---

**"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"**

El propósito del presente estudio es cuantificar la dosis génica de *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* que son genes localizados en los cromosomas X y Y por la metodología de qPCR y evaluar su utilidad como un método para el diagnóstico temprano de las aneuploidías de los cromosomas sexuales (alteración en el número de los cromosomas sexuales), con el objetivo de ofrecer atención oportuna de los casos y mejorar la calidad de vida de los pacientes, además permitirá estimar con mayor precisión la incidencia de estos padecimientos en la población del estado de Nuevo León. Los datos obtenidos serán analizados para conocer la factibilidad de esta metodología como una prueba que pueda ser incluida en el tamiz neonatal ampliado y así aumentar el número de patología detectadas desde el periodo neonatal.

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, 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.

Si usted permitió que se analice la muestra de su hijo (a) de manera voluntaria, se le pedirá que responda a un formulario breve de datos generales del recién nacido en la consulta de tamiz neonatal y se obtendrá una muestra de sangre del talón que se impregnara en una boleta de papel filtro. Su participación tendrá una duración aproximada de 15 minutos y se le solicitará una segunda evaluación del recién nacido, en caso de que los resultados sugieran una alteración en el número de sus cromosomas sexuales, con el objetivo de realizar una evaluación clínica por un médico especialista en Genética Médica y de ser necesario realizar un estudio confirmatorio (Cariotipo bandas GTG en sangre periférica), que implicaría la toma de una segunda muestra en sangre venosa la cual se obtiene a través de una punción en una vena periférica para obtener 3 ml de sangre, todos estos servicios se ofrecen de forma gratuita y voluntaria.

Los resultados de estas pruebas serán manejados bajo estricta confidencialidad y solamente serán compartidos por el equipo responsable del 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.

---

Título abreviado del Protocolo \_\_\_\_\_

Forma de Consentimiento de Investigación \_\_\_\_\_

Colocar Fecha y versión del mismo \_\_\_\_\_

Identificación del Participante: \_\_\_\_\_

**DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ**

Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, Monterrey, N.L., México. C.P. 64460, Conm. Fac. Medicina 83-29-40-50 Ext. 2647, 2649  
Tel/fax. 83-29-42-17, 83-48-37-02; Genética Clínica: 83-33-51-38 y 83-48-37-04

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



Sello y firma de la Subdirección de Investigación.

**COMITÉ DE ÉTICA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**

Formato ICF 00

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE MEDICINA UANL

80  
ANIVERSARIO  
1933 - 2013

- 45 -



**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**Detección temprana de las aneuploidias 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.**

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, 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 4º 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) estas alteraciones incluyen los Sd. De Turner que se genera por la pérdida total o parcial del Segundo cromosoma sexual 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, infertilidad, entre otras alteraciones y por último la polisomía del X que puede generar falla ovárica prematura así como déficit cognitivo y talla alta. Estas cromosomopatías por lo general no se diagnostican en etapas neonatales, el diagnóstico de la mayor parte de los pacientes con aneuploidias sexuales se realiza en la vida adulta por problemas de fertilidad y/o alteraciones en la talla.

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Título abreviado del Protocolo

Forma de Consentimiento de Investigación

Colocar Fecha y versión del mismo

Iniciales de Participante: \_\_\_\_\_

BICENTENARIO



2013

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro,  
Monterrey, N.L., México. C.P. 64460, Conm. Fac. Medicina 83-29-40-50 Ext. 2647, 2649  
Tel/fax: 83-29-42-17, 83-48-37-02; Genética Clínica: 83-33-51-38 y 83-48-37-04



Formato\_ICF\_00  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE MEDICINA UANL





UANL

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"  
UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

La detección tardía de aneuploidías de los cromosomas sexuales retrasa o impide tratar las comorbilidades asociadas a estos síndromes en un tiempo oportuno como cardiopatías, malformaciones renales, alteraciones esqueléticas, alteraciones endocrinológicas y metabólicas. Algunas de las cuales pueden afectar su sobrevivencia. El manejo de las aneuploidías de los cromosomas sexuales es una tarea multidisciplinaria, por lo tanto, lo adecuado es 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 su familia. Se han diseñado metodologías basadas en el análisis molecular para su aplicación en la detección temprana de las aneuploidías (alteraciones en el número normal de cromosomas) más frecuentes, que cumpla con las características que requiere una prueba de tamiz, como: una alta sensibilidad, fácil de procesar y económica, que sea de fácil acceso para toda la población.

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

El propósito de este estudio es cuantificar de la dosis génica de *SHOX*, *VAMP7* y *SRY* que son genes localizados en los cromosomas X y Y por qPCR, como un método para el diagnóstico temprano de las aneuploidías sexuales (alteración en el número de estos cromosomas), para la atención oportuna de los casos y mejorar la calidad de vida de los pacientes además permitirá estimar con mayor precisión la incidencia de estas aneuploidías en la población del estado de Nuevo León. Los datos obtenidos serán analizados para conocer la factibilidad de esta metodología como una prueba que pueda ser incluida en el tamiz neonatal ampliado y así aumentar el número de patología detectadas desde el período neonatal.

**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.

- Criterios de exclusión
- Recién nacidos transfundidos.
- Imposibilidad de tomar muestras de sangre.
- Criterios de eliminación
- Muestra inadecuada
- Rechazo a participar en la evaluación clínica
- Cariotipo con fórmula cromosómica normal

**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 una historia clínica por un médico de la consulta de la consulta de tamiz neonatal y se obtendrá una muestra de sangre de talón que se impregnara en una boleta de papel filtro. Su participación tendrá una duración aproximada de 15 minutos y se le solicitará una segunda

Título abreviado del Protocolo

Forma de Consentimiento de Investigación

Colocar Fecha y versión del mismo

INICIALIA

Iniciales del Participante: \_\_\_\_\_

ELEUTERIO

GONZÁLEZ

2013

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Miras Centro,

Monterrey, N.L., México. C.P. 64460, Conm. Fac. Medicina 83-29-40-50 Ext. 2647, 2649

Tel/fax. 83-29-42-17, 83-48-37-02; Genética Clínica: 83-33-51-38 y 83-48-37-04



COMITÉ DE ÉTICA

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

Formato\_ICF\_00

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE MEDICINA UANL

BICENTENARIO



2013





evaluación en caso de que los resultados sugieran una alteración en el número de sus cromosomas sexuales, para realizar un estudio confirmatorio (Cariotipo bandas GTG en sangre periférica) de forma gratuita, que implicaría la toma de una segunda muestra en sangre venosa la cual implica una punción periférica para obtener 3 ml de sangre, así como una evaluación clínica por un medico 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, los cuales no ponen en peligro su salud.

**8.- ¿QUIÉN PAGARÍA LAS CUENTAS DEL HOSPITAL O DEL MÉDICO EN CASO DE QUE ME PASE ALGO?**

Es poco probable que la participación en este proyecto dará como resultado un daño a los participantes. Si existe una lesión secundaria al el estudio, el sujeto deberá notificar al Investigador Principal para que reciba la atención médica necesaria en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" en conjunto con el Departamento de Genética Médica.

**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 aneuploidias con el fin de ofrecer un manejo oportuno a las complicaciones más frecuentes observadas en estos casos, en el caso de que sea detectado alguna aneuploidia cromosómica en el participante se realizará el estudio confirmatorio de forma gratuita.

**10.-¿QUÉ OTRAS OPCIONES DE TRATAMIENTO TENGO EN CASO DE NO ACEPTAR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?**

N/A

**11.- ¿CÓMO PROTEGERÁ MI PRIVACIDAD?**

Los resultados de estas pruebas únicamente se compartirán con la Dra. Marisol Ibarra Ramírez quien el investigador principal, el director de tesis: Dr. Luis Daniel Campos Acevedo y los co-directores: M.C. Michelle Zamudio Osuna, M.C. Viviana Gómez Puente, QCB Rosario Torres, Dra. Patricia Arredondo, Dr. Ricardo Cerda Flores y Dra. med Laura Martínez Garza.

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 obtenido 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.

La toma de fotografías clínicas con el fin de documentar las características fenotípicas de las pacientes serán totalmente voluntarias y no es un requisito para la participación de este estudio por lo cual se le solicita que agregue sus iniciales en las siguiente línea \_\_\_\_\_ en caso de autorizar la toma de

Título abreviado del Protocolo

Forma de Consentimiento de Investigación

Colocar Fecha y versión del mismo

Iniciales del Participante: \_\_\_\_\_

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro,  
Monterrey, N.L., México. C.P. 64460, Conm. Fac. Medicina 83-29-40-50 Ext. 2647, 2649  
Telfax. 83-29-42-17, 83-48-37-02; Genética Clínica:83-33-51-38 y 83-48-37-04



BICENTENARIO



100<sup>o</sup> ANIVERSARIO  
ELEUTERIO  
GONZÁLEZ  
2013

Formato\_ICF\_00  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE MEDICINA UANL





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"  
UANL



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

fotografías, las cuales pueden ser usadas en publicaciones médicas donde la identidad de la paciente no será revelada por los autores.

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 o al 044-811 069 71 82 en cualquier horario

**15.- SI TENGO PREGUNTAS, ¿A QUIEN 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.

Título abreviado del Protocolo

Forma de Consentimiento de Investigación

Colocar Fecha y versión del mismo

BICENTENARIO



100<sup>o</sup> ANIVERSARIO  
DR. JOSÉ  
ELEUTERIO  
GONZÁLEZ  
2013

Iniciales del Participante: \_\_\_\_\_  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro,  
Monterrey, N.L., México. C.P. 64460. Conm. Fac. Medicina 83-29-40-50 Ext. 2647, 2649  
Tel/fax. 83-29-42-17, 83-48-37-02; Genética Clínica: 83-33-51-38 y 83-48-37-04

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Sello y firma del Comité de Ética y el Comité de Investigación.

COMITÉ DE ÉTICA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

Formato\_ICF\_00

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
FACULTAD DE MEDICINA UANL







UANL

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

aceptó que el ADN obtenido a partir de la muestra, sea 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.

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.

Fecha	Firma de la Sujeto	Nombre en letra de molde
Fecha	Firma de la Sujeto	Nombre en letra de molde

Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio	Dirección
---	-----------

Fecha	Firma de la Sujeto	Nombre en letra de molde
-------	--------------------	--------------------------

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.

Fecha	Firma y Nombre en letra de molde persona que obtuvo consentimiento / investigador principal
-------	---

Título abreviado del Protocolo

Forma de Consentimiento de Investigación

Colocar Fecha y versión del mismo



BICENTENARIO 1825-2025  
181 años de natalicio  
DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ  
2013

Indicados del Participante:  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, Col. Mitras Centro, Monterrey, N.L., México, C.P. 64460, Com. Fac. Medicina 83-29-40-50 Ext. 2647, 2649 Tel/fax. 83-29-42-17, 83-48-37-02; Genética Clínica:83-33-51-38 y 83-48-37-04

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Sello y firma de autorización.

COMITÉ DE ÉTICA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA FACULTAD DE MEDICINA UANL

Formato ICF-00



## CAPITULO X

### 10. BIBLIOGRAFIA

1. Bojesen A, Juul S, Gravholt CH. (2003) Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:622–626.
2. Massa G, Verlinde F, De Schepper J, *et al.* (2005) Trends in age at diagnosis of Turner syndrome. *Arch Dis Child* 90:267–268.
3. Lee MC, Conway GS. (2014) Turner's syndrome: challenges of late diagnosis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2:333–338.
4. Radicioni AF, De Marco E, Gianfrilli D, *et al.* (2010) Strategies and advantages of early diagnosis in Klinefelter's syndrome. *Mol Hum Reprod* 16:434–440.
5. Bardsley MZ, Kowal K, Levy C, *et al.* (2013) 47,XXY syndrome: clinical phenotype and timing of ascertainment. *J Pediatr* 163:1085–1094.
6. Bondy CA, Turner Syndrome Study Group. (2007) Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 92:10–25.
7. Flaquer A, Rappold GA, Wienker TF, *et al.* (2008) The human pseudoautosomal regions: a review for genetic epidemiologists. *Eur J Hum Genet* 16:771–779.
8. Burns D, Brunner L, Rajendran S, Johnson B, Ma M, Wang J. (2013). Validation of a ligand binding assay using dried blood spot sampling. *AAPS J* 15:123-131.
9. McCabe ER. (1991) Utility of PCR for DNA analysis from dried blood spots on filter paper blotters. *PCR Methods Appl* 1:99–106

10. Caggana M, Conroy JM, Pass KA. (1998) Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper. *Hum Mutat* 11:404–409.
11. Cantsilieris S, Western PS, Baird PN, White SJ. (2014). Technical considerations for genotyping multi-allelic copy number variation (CNV), in regions of segmental duplication. *BMC Genomics* 15:329.
12. Chaisomchit S, Wichajarn R, Chowpreecha S, *et al.* (2003) A simple method for extraction and purification of genomic DNA from dried blood spots on filter paper. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34:641–645.
13. Chitayat D, Langlois S, Wilson RD, *et al.* (2011) Prenatal screening for fetal aneuploidy in singleton pregnancies. *J Obstet Gynaecol Can* 33:736–750.
14. Rocha MN, Melo MR, Longui CA, *et al.* (2005) A three-step molecular protocol employing DNA obtained from dried blood spots for neonatal screening for 45,X Turner syndrome. *Genet Mol Res* 4:749–754.
15. Rocha MN, Longui CA, Kochi C, *et al.* (2010) Applicability of real-time PCR methodology in the neonatal detection of Turner syndrome. *Horm Metab Res* 42:677–681.
16. Aksglaede L, Garn ID, Hollegaard MV, *et al.* (2012) Detection of increased gene copy number in DNA from dried blood spot samples allows efficient screening for Klinefelter syndrome. *Acta Paediatr* 101:e561–e563.
17. Ibarra-Ramirez M, Zamudio-Osuna MJ, Campos-Acevedo LD, *et al.* (2015) Detection of Turner syndrome by quantitative PCR of SHOX and VAMP7 genes. *Genet Test Mol Biomarkers* 19:88–92

18. Choi EH, Lee SK, Ihm C, Sohn YH. (2014). Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. *Osong Public Health Res Perspect* 5:351-357.
19. Torres-Sepúlveda M, Martínez-de Villarreal L, Esmer C, *et al.* (2008) Expanded newborn screening using tandem mass spectrometry: two years' experience in Nuevo León, Mexico. *Salud Publica Mex* 50:200–206.
20. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20:613-616.
21. Seabright M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972.
22. Wilson JM, Jungner YG. (1968) [Principles and practice of mass screening for disease]. *Bol Oficina Sanit Panam* 65:281–393.
23. Harahap NI, Harahap IS, Kaszynski RH, *et al.* (2012) Spinal muscular atrophy patient detection and carrier screening using dried blood spots on filter paper. *Genet Test Mol Biomarkers* 16:123–129.

## **CAPITULO XI**

### **11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Luis Daniel Campos Acevedo

Candidato para el grado de Doctor en Medicina

**Tesis: “DETERMINACIÓN DE SEXO CROMOSÓMICO POR DOSIS GÉNICA EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PAPEL FILTRO COMO UN MÉTODO PARA EL TAMIZ NEONATAL DE ANEUPLOIDÍAS SEXUALES”**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Ciudad de México, el 17 de mayo de 1980, hijo de Fernando Manuel Campos Sánchez y Guadalupe Acevedo Ojeda

**Educación: Egresado de la Universidad Nacional Autónoma de México con grado de Médico Cirujano en 2004.**

**Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León con grado de Especialista en Genética Médica en 2009.**