AMENORREA PRIMARIA

HALLAZGOS CLINICOS Y CITOGENETICOS EN 15 PACIENTES

Dr. Jorge E. Medina Murillo (1)

Dr. Efraim Otero Ruiz (2)

Dr. César Mendoza Posada (3)

Dr. Julio Enrique Ospina L. (3)

Srta. María Cristina Ardila (4)

La AMENORREA PRIMARIA es un síntoma de gran importancia para el ginecólogo, puesto que ordinariamente es el motivo de consulta de muchas jóvenes con diversas anomalías. Solo un estudio ordenado y sistemático establece un diagnóstico correcto, el cual es muy importante para una terapéutica precisa o para una orientación adecuada en lo referente al futuro matrimonial de estas pacientes.

Las causas de amenorrea primaria son múltiples; van desde alteraciones funcionales, como factores psico-ambientales, hasta trastornos en el desarrollo del aparato reproductor que comprometen en forma definitiva la fertilidad. Entre estas encontramos las alteraciones cromosómicas que son responsables del 25 al 50% (6) (27) de las amenorreas primarias. Gracias a los avances de la citogenética en las dos últimas décadas, se han abierto nuevos campos en la investigación y comprensión de estos desórdenes.

Hoy día se consideran procedimientos indispensables en el estudio de pacientes con amenorrea primaria

la elaboración del cariotipo y el examen de la cromatina sexual.

Material y Métodos

El grupo de nuestras pacientes está constituido por jóvenes entre 16 y 31 años referidas para estudio citogenético al Laboratorio de Investigación del Instituto Nal. de Cancerología, del mismo Instituto y del Hospital Universitario San Ignacio, aprovechando la afiliación del Instituto a la Universidad Javeriana y la vinculación de uno de nosotros (J.E.M.) a las dos Instituciones. Para esta presentación seleccionamos únicamente aquellas pacientes cuya queja principal era "Amenorrea Primaria". En nuestra ficha citogenética registramos la edad, la talla, el desarrollo de caracteres sexuales secundarios y los

(1) Profesor Asistente de Obst. y Ginec. Universidad Javeriana. Hosp. San Ignacio, y Asociado Sección Investigación, Instituto Nal. de Cancerología.

(2) Jefe, Sección de Investigación, Instituto Nal. de Cancerología, afiliado a la Universidad Javeriana.

(3) Médicos Asociados, Sección de Investigación, Inst. Nal. de Cancerología.

(4) Citotécnica. Sección de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología.

hallazgos operatorios en las pacientes que han sido sometidas a exploración quirúrgica.

A todas las pacientes se les tomaron extendidos de mucosa bucal y sangre periférica para estudio de la cromatina sexual. Se utilizaron las técnicas de Guard (13) y de Papanicolaou para la coloración de los extendidos de la mucosa bucal y la de Wright para los extendidos de sangre. Se estudiaron 200 células en promedio por paciente. Valores por encima de 15% de corpúsculos de Barr los clasificamos como Positivos y valores inferiores a 5% como Negativos. Cuando obteníamos valores entre 5 y 15% repetíamos el examen. En los últimos meses hemos complementado estas técnicas con el método descrito por Caspersen (4) (5) (23) para identificación del cromosoma "Y" con fluorescencia utilizando Hidroclorhidrato de Quinacrina.

Para la elaboración del cariotipo básicamente hemos seguido la técnica de Moorhead (20) modificada por Jacobson (17) en la cual cultivamos los leucocitos estimulados con Phito-hemaglutinina durante 72 horas, para luego tratarlos con Colchicina. Los extendidos se prepararon por el método de secado al aire y se colorearon con Giemsa. Un promedio de 30 metafases por paciente se estudiaron al microscopio y se tomaron fotografías para elaboración de cariotipos en un promedio de 5 por paciente.

Resultados

Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla N° 1. Las 15 pacientes estudiadas las podemos agrupar de acuerdo con el examen citogenético en cuatro grandes grupos:

Primer Grupo. Cromatina NEGATIVA, Cariotipo XO.

Este grupo está integrado por tres pacientes, 20% de los casos estudiados. Además de la amenorrea primaria todas presentaban retraso pondoestatural marcado, estando entre 14 y 28% por debajo de la talla ideal para Colombia (29), cuello palmeado, cubitas valgus y a la laparotomía se demostraron gónadas rudimentarias. Estas pacientes se pueden clasificar dentro del Síndrome de Gónadas Rudimentarias Variedad Turner.

FIGURA N° 1 — Paciente con Síndrome de Turner. Obsérvese la baja estatura (1.27 m.), el cubitus valgus, las gónadas rudimentarias y el infantilismo sexual. El cariotipo revela un complemento cromosómico 45, XO. La cromatina sexual es Negativa.

Segundo Grupo. Cromatina NEGATIVA, Cariotipo XX.

Este grupo estaba integrado por tres pacientes, (20% de los casos estudiados), dos de ellas tenían retraso pondoestatural marcado, 29 y 31% por debajo de la talla ideal, la tercera paciente tenía estatura nor-

AMENORREA PRIMARIA

HALLAZGOS CLINICOS Y CITOGENICOS

H. CL. HOSR	EDAD	TALLA	TALLA IDEAL	DEFICIT %	GENITALES EXTER.	GONADAS	CROMATINA	CARIOTIPO
105-714.I INC	16	124	160	28	INFANTILES	RUDIMENTARIAS	NEGATIVA	45,XO
83-375 H.S.I	21	127	162	22	INFANTILES	RUDIMENTARIAS		
PRIV- EOR.	16	136	160	15	HIPERT. CLITORIS.			
51561- H.S.I.	18	112	162	31	INFANTILES	—	NEGATIVA	46,XX
81580- H.S.I.	18	116	162	29	INFANTILES	RUDIMENTARIAS		
83.176- H.S.I.	27	162	162	0	NORMALES	RUDIMENTARIAS		
88.928- H.S.I	18	163	163	0	INFANTILES	TESTICULOS	NEGATIVA	46,Xy
88.870- H.S.I	16	158	162	3	INFANTILES	TESTICULOS		
88.871- H.S.I	20	164	164	0	INFANTILES	TESTICULOS		
55.097- H.S.I	21	161	161	0	INFANTILES	TESTIC. ABD. E INGU.		
63.235- H.S.I	16	137	160	15	INFANTILES	—	POSITIVA	46,XX
59.192- H.S.I	17	134	161	17	INFANTILES	—		
105481- INC.	17	154	161	5	INFANTILES	x		
106389- INC.	31	158	162	3	NORMALES	Ovarios Normales. Agnesia Uterina.		
66066- H.S.I.	17	159	162	3	NORMALES	Ovarios Normales. Agnesia Uterina. Riñon Pelvico.		

TABLA I

mal. Esta junto con otra de las primeras fueron sometidas a laparotomía, encontrándose útero y trompas infantiles y ovarios rudimentarios. El cariotipo se elaboró únicamente en cultivo de leucocitos de manera que no se conocen otras líneas celulares como gónadas o fibroblastos, pero el hecho de tener cromatina sexual negativa nos hace pensar que posiblemente se trate de un mosaicismo XO/XX. Estas pacientes también las clasificamos como una variedad del Síndrome de Gónadas Rudimentarias.

FIGURA N° 2 — Paciente con Síndrome de Gónadas rudimentarias. Obsérvese la baja estatura (1.16 M.) y el infantilismo sexual. Cromatina sexual Negativa. Complemento cromosómico 46, XX.

Tercer Grupo. Cromatina NEGATIVA, Cariotipo XY.

Cuatro pacientes (27%) integran este grupo. Tres de ellas son hermanas. La fluorescencia con Quinacrina fue POSITIVA para el cromosoma Y. El desarrollo somático era normal en

todas, los senos bien desarrollados (ver fotografías Nos. 4 y 5) llamando la atención la ausencia del vello axilar y púbico y el aspecto infantil de los genitales. En la exploración quirúrgica se comprobó en las tres hermanas presencia de testículos intraabdominales y ausencia de útero; la otra paciente tampoco tenía útero y los testículos estaban localizados uno en el abdomen y el otro en la región inguinal derecha. Estas pacientes corresponden al llamado "Síndrome de Feminización Testicular".

FIGURA N° 3 — Paciente con Síndrome de Gónadas Rudimentarias. Presenta estatura normal (1.62 M.) y escaso vello pubiano. Cromatina Sexual Negativa, complemento cromosómico 46, XX.

Cuarto Grupo. Cromatina POSITIVA, Cariotipo XX.

En este grupo no se demostraron alteraciones cromosómicas ni antagonismos entre el genotipo y el fenotipo. Está integrado por 5 pacientes: una de ellas tenía enfermedad de

FIGURA Nº 4 — Paciente con Síndrome de Feminización Testicular. Obs-rvese el buen desarrollo de los senos y la ausencia de vello axilar y pubiano. Un testículo se encontró en región inguinal derecha y el otro intra abdominal. Cromatina sexual Negativa, complemento cromosómico 46, XY.

FIGURA Nº 5 — Tres hermanas con Síndrome de Feminización Testicular. Cromatina Sexual Negativa, fluorescencia con Quinacrina Positiva para el cromosoma Y. Complemento cromosómico 46, XY.

Hodgkin, dos presentaban agenesia uterina pero tenían ovarios de características normales, en una de ellas se encontró además riñón pélvico. Las otras dos pacientes están en estudio y aún no se ha establecido la etiología de la amenorrea.

Discusión

Diez, 67%, de nuestras pacientes presentaban cromatina sexual negativa; de estas, 3 presentaban complemento cromosómico XO, 3 complemento XX y 4 complemento XY.

Para el estudio de estas pacientes además de la elaboración del cariotipo, el estudio de la cromatina sexual nos proporciona una informa-

ción valiosa, puesto que hoy está ampliamente demostrado que el corpúsculo de Barr corresponde a él o a los cromosomas X inactivados, y su número está en relación directa al número de cromosomas X, de manera que se puede decir que el número de corpúsculos de Barr es igual al número de cromosomas X menos uno (3) (16) (18) (19). Cuando encontramos que hay divergencia entre el cariotipo y el estudio de la cromatina sexual, ésta se debe a que posiblemente existen dos líneas celulares diferentes entre las que se emplearon para la elaboración del cariotipo y las que se utilizaron para el estudio de la cromatina sexual, lo cual nos indica que probablemente existe un "Mosaicismo".

Recientemente Casperson (4) (5) y otros (23) utilizando derivados de la quinacrina, han demostrado con fluorescencia el cromosoma Y en metafase, lo mismo que en células en interfase un corpúsculo fluorescente que corresponde al cromosoma Y. Este nuevo método nos presta una valiosísima ayuda en la interpretación de los hallazgos citogenéticos principalmente en los trastornos relacionados con los cromosomas sexuales. Así por ejemplo, en casos cromatino sexual negativos y fluorescente negativos, podemos suponer que se trata de una monosomía del cromosoma X, mientras que cromatino negativos y fluorescente positivos nos hace suponer que se trata de un complemento XY, cromatino positivo y fluorescente negativos indica un complemento XX, cromatino positivos y fluorescente positivos revela un complemento XXY, etc. (Fig. N° 6).

En el grupo de pacientes con amenorrea primaria que presentan alteraciones cromosómicas debemos considerar en primer lugar las pacientes que presentan el síndrome descrito por Turner en 1938 (28) el cual se caracteriza por baja estatura, infantilismo sexual, cúbito valgus y cuello palmeado. En 1944 (30) se demostró la ausencia de ovarios normales en estas pacientes, encontrándose estos reemplazados por una banda fibrosa compuesta de estroma sin células germinales. En 1959 (15) se describieron una serie de malformaciones congénitas asociadas a este síndrome: tórax en escudo, linfodema periférico al nacimiento, IV metatarsianos cortos, uñas hipoplásicas, múltiples naevus pigmentados y coartación de la aorta; que se han denominado como "Los Estigmas del Turner". La incidencia de este síndrome es de 1 por cada 5.000 recién nacidos.

Se han descrito en los últimos años pacientes que presentan varias características en común con el Síndrome de Turner, pero que no llenan todos los requisitos para poderlas clasificar dentro de este síndrome; así algunas pacientes presentan estatura normal, algunas amenorrea secundaria, otras no presentan los estigmas del Turner y hasta se han descrito algunas con signos de virilización (1) (9). A estas pacientes se les ha llamado como "Variantes del Síndrome de Turner".

En 1954 Polani y col. (24) demostraron que muchos pacientes con el síndrome de Turner tenían Cromatina sexual negativa. En 1959 Ford y col. (10) demostraron por primera vez que estas pacientes tenían una monosomía del cromosoma X, es decir un complemento cromosómico 45, XO. Sin embargo, se han descrito una variedad de pacientes que presentan cromatina sexual positiva, diferentes tipos de anormalidades de los cromosomas sexuales, incluyendo alteraciones estructurales del cromosoma X y varios tipos de mosaicismos, siendo la característica más sobresaliente para todo el grupo la baja estatura y las gónadas rudimentarias.

Las alteraciones cromosómicas responsables de la disgenesia gonadal se pueden resumir en tres grupos importantes (12) (18).

A - Monosomía de los cromosomas sexuales, encontrándose complemento cromosómico XO.

B - Alteraciones en la estructura de los cromosomas sexuales, bien sea del cromosoma X o del cromosoma Y, las cuales pueden ser formaciones de isocromosomas, cromosomas pequeños por pérdida parcial de material genético, translocaciones o formación de cromosomas en anillo.

CARIOTIPO	FLUORESCENCIA	CROMATINA SEXUAL
XO
XX
$X\gamma$
XXY

FIGURA Nº 6 — Correlación entre Cromatina Sexual, Fluorescencia y Cariotipo.

C - Mosaicismo, es decir la presencia de diferentes líneas celulares del mismo origen genético, debidas posiblemente a falta de separación en la segunda división meiótica o en las primeras divisiones mitóticas encontrándose siempre una línea XO, con frecuencia una línea normal XX y en ocasiones diversas combinaciones de los grupos anteriores.

El complemento cromosómico XO con cromatina sexual negativa lo encontramos en tres de nuestras pacientes, dos de ellas fueron sometidas a laparotomía, se confirmó la presencia de útero y trompas infantiles y de gónadas rudimentarias, las cuales al estudio histológico revelaron la presencia de estroma ovárico rudimentario sin folículos. Tres pacientes las interpretamos como mosaico XO/XX, dos de ellas presentan las mismas características fenotípicas del primer grupo y en la tercera aunque también se demostraron gónadas rudimentarias a la laparotomía, tenía estatura normal.

Investigaciones recientes (16, 25) han demostrado que individuos XO desarrollan normalmente su gónada ovárica durante los tres primeros meses de vida intrauterina, luego presentan un mayor desarrollo del estroma, pudiendo presentar al nacimiento unos pocos folículos, los cuales van atrofiándose durante el primer año de vida. Parece probable que en el humano el normal proceso de atresia de las células germinales es controlado por el cromosoma X heterocromático. En ausencia de este cromosoma la atresia se acelera sin ningún control y para el tiempo en que la niña llega a la pubertad ya se han degenerado todas las células germinales. Sin embargo, se han informado algunos casos (1) (22) en que mujeres con complemento XO han llegado a ser fértiles, han tenido amenorrea se-

cundaria o menopausia precoz, esto debido muy posiblemente a que el proceso de atrofia de estas células germinales se ha demorado. En estos casos tampoco se puede excluir por completo la presencia de un mosaicismo XO/XX.

De los signos pertenecientes al Síndrome de Turner o a sus variantes, la baja estatura es el único asociado invariablemente al complemento cromosómico XO. Este déficit en la estatura parece debido a una monosomía del locus del brazo corto del cromosoma X, el cual tiene su homólogo en el cromosoma Y (9), (16). La baja estatura la encontramos en 7 de nuestras pacientes; todas las que tenían complemento XO, dos de las que tenían cromatina negativa con complemento XX, y menos marcada en dos pacientes del cuarto grupo (cromatina positiva y complemento XX). En 4 el déficit era severo variando entre 22 y 31% por debajo de la talla ideal. Solo encontramos una paciente de las 6 que presentaban Disgenesia Gonadal con estatura normal, ella tenía cromatina negativa y cariotipo XX, lo que interpretamos como posible mosaico XO/XX. Se han descrito un 20% de pacientes XO/XX con estatura normal, lo mismo que se han informado casos de disgenesia gonadal con complemento cromosómico XX y cromatina sexual positiva que no presentan déficit de crecimiento (2) (7).

Nuestro tercer grupo de pacientes corresponde al Síndrome de Feminización Testicular. El motivo de consulta de todas fue la amenorrea primaria. Esta entidad ha recibido diferentes denominaciones, ha sido llamada pseudohermafroditismo masculino con calificativos como el de "Familiar", "Hereditario", con "Feminización Total", siendo la más aceptada hoy día la dada por Morris (21)

de Síndrome de Feminización Testicular, del cual él describe dos variedades: completa e incompleta. La completa es la más frecuentemente encontrada y se caracteriza por una feminización total. En cuanto a su etiología está comprobado que no existe defecto cromosómico sino que se trata de un defecto enzimático; tiene carácter familiar que sigue la línea materna, siendo la madre portadora de un gene anormal, el cual puede estar ligado al cromosoma X o ser un gene dominante autosómico con limitación al sexo masculino. En cuanto a el por qué se feminizan estas pacientes se han emitido diferentes hipótesis: 1) Que se trate de una incapacidad de la gónada para producir andrógenos de alta actividad biológica por deficiencia de la 3 Beta dehidrogenasa o de la 17 Beta hidroxí esteroide dehidrogenasa; 2) Alteración del metabolismo de los andrógenos, produciéndose una conversión rápida de estos a estrógenos en sitios como el hígado, riñón, etc. y, 3) Defecto enzimático que se traduce aparentemente en una resistencia periférica a las sustancias androgénicas producidas endógenamente y aún las administradas exógenamente (11), (14) y (21). Esta última hipótesis es la más aceptada.

El complemento cromosómico XY con cromatina sexual negativa y fluorescencia positiva para el cromosoma "y" en pacientes con feminización total establece el diagnóstico de esta entidad. Los testículos deben ser extirpados porque se ha demostrado que estas gónadas disgenéticas tienen alto potencial maligno (2), (26).

Aunque el genotipo es masculino, estas pacientes son somática, social y psicológicamente mujeres y como tales deben ser tratadas.

Resumen y Conclusiones

Se presentan 15 pacientes con Amenorrea Primaria las cuales fueron estudiadas y clasificadas de acuerdo con el examen físico y citogenético, incluyendo estudio de la cromatina sexual, cultivo de leucocitos para elaboración de cariotipo e identificación del cromosoma "y" con fluorescencia utilizando Quinacrina.

Se encontró que 10 pacientes, (67%) tenían cromatina sexual negativa, de estas 6 se clasificaron como Disgenesis Gonadal o Síndrome de Gónadas Rudimentarias, presentando 3 de ellas cariotipo XO y las otras 3 XX. Solo una de estas pacientes tenía estatura normal, se clasificó como Disgenesis Gonadal Pura, las demás tenían déficit pondoestatural marcado y se clasificaron como Disgenesis Gonadal Variedad Turner.

Las otras 4 pacientes con cromatina sexual negativa se clasificaron como Síndrome de Feminización Testicular, ellas tenían estatura normal, complemento cromosómico XY y la fluorescencia fue positiva para el cromosoma Y.

Las 5 pacientes restantes (33% del grupo estudiado) tenían cromatina positiva y cariotipo XX. Dos de ellas están en estudio y aún no se ha establecido la causa de la amenorrea; otra tenía enfermedad de Hodgking y las otras dos agenesia de útero con ovarios normales y caracteres sexuales secundarios bien desarrollados.

Se concluye que en el estudio de pacientes con Amenorrea Primaria la cromatina sexual, la elaboración del cariotipo y la identificación del cromosoma Y con fluorescencia son procedimientos paraclínicos de gran valor para establecer el diagnóstico etiológico.

Summary and Conclusions

The presentation covers 15 patients with Primary Amenorrhea, studied and classified in agreement with the physical and cytogenetical examination, including a study of the sexual chromatin, culture of leukocytes for preparation of the karyotype and identification of the Y chromosome through fluorescence and the use of quinacrine.

It was found that ten patients (67%) had negative sexual chromatin; 6 of these were classified as Gonadal Dysgenesis or Rudimentary Gonadal Syndrome, 3 of whom showed XO karyotype and the other 3 XX karyotype. Only one of these patients had a normal height and was classified as Pure Gonadal Dysgenesis; the others suffered from a marked weight height deficit and were classified as Turner Variety Gonadal Dysgenesis.

The other 4 patients with negative sexual chromatin were classified as Testicular Feminization Syndrome; these had a normal height, the XY chromosomal complement and the fluorescence was positive for Y chromosome.

The 5 remaining patients (33% of the group studied) had positive chromatin and XX karyotype. Two of them are under study and the cause of their amenorrhea has not yet been determined. Another suffered from Hodgking disease and the other two from uterine agenesis with normal ovaries well developed secondary sexual characteristics.

It may be concluded that the study of patients with Primary Amenorrhea, the sex chromatin, the preparation of the karyotype and the identification of the Y chromosome through fluorescence constitute para-clinical procedures of great value for the de-

termination of the ethiological diagnosis.

BIBLIOGRAFIA

- 1 ARMENDARIS, S. "Citogenética Humana". Editorial Interamericana, 1968.
- 2 BARAKAT, B. T. and JONES, H. W. "Gynecologic and Cytogenetic Aspects of Gonadal Agenesis and Dysgenesis". *Obst. and Gynec.* 36: 368, 1970.
- 3 BARR, M. L. y CARR, D. H. "Sex chromatin, sex chromosomes and sex anomalies". *Can. Med. Assoc. J.* 83: 979, 1960.
- 4 CASPERSSON, T., ZECH, L., JOHANSSON, C. and MODEST, E. J. "Identification of Human Chromosomes by DNA - Binding Fluorescent Agnts". *Chromosoma* 30: 215, 1970.
- 5 CARPERSSON, T., ZECH, L., JOHANSSON, C. and MODEST, E. J. "Fluorescent Labeling of Chromosomal DNA: Superiority of Quinacrine Mustard to Quinacrine". *Science.* 170: 762, 1970.
- 6 CLAVERO, J. A. "Estudios de los cariotipos en las amenorreas esenciales". *Acta Ginec.* 15: 153, 1964.
- 7 DEL CORRAL, F., PRADILLA, A., NIÑO, C. A., y FERNANDEZ, F. "Disgenesis Ovárica, Variedad no Turner, con Eunocoidismo". (Presentación de cinco casos). *Rev. Col. de Obst. y Ginec.* XVI: 379, 1965.
- 8 ENGEL, E. and FORBES, A. P. "Cytogenetic and clinical findings in 48 patients with congenitally defective or absent ovaries". *Medicine*, 44: 135, 1965.
- 9 FERGUSON, SMITH, M. A. "Karyotype phenotype correlations in gonadal dysgenesis and their bearing on the pathogenesis of malformations". *J. Med. Genet.* 2: 142, 1965.
- 10 FORD, C. E., JONES, K. W., POLANI, P. E., DE ALMEIDA, J. C. and BRIGGS J. H. "A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis". *Lancet.* 1: 711, 1959.
- 11 CABOS, P. "Testicular feminization, hormonal evauación. Report of a case". *Obst. & Gynec.* 36: 713, 1970.
- 12 GERMAN, J. "Abnormalities of human sex chromosomes. V. A. Unifying concept in relation to the gonadal dysgenesis". *Clin. Genet.* 1: 15, 1970.

- 13 GUARD, H. R. "A new technic for differential staining of sex chromatin and the determination of its incidence in exfoliated vaginal epithelial cells". *Amer. J. Clin. Pathol.* 32: 145, 1959.
- 14 GOWNUP, G., WIELAND, G. R. and HAMWI, J. C. "Studies on the Mechanism Production of Testicular Feminization Syndrome". *Am. J. of Med.* 41: 448, 1966.
- 15 HADDAD, H. M., and WILKINS, L. "Congenital anomalies associated with gonadal aplasia". *Pediatrics*, 23: 885, 1959.
- 16 HAMERTON, J. L. "Sex chromosomes and their abnormalities in man and mammals". *Handbook of Molecular Cytology*. A. Lima de Faria. North-Holland. 1969, pág. 851.
- 18 MILLER, O. J. "The Sex Chromosome Anomalies". *Am. J. Obst. & Gynec.* 90: 1078, 1964.
- 19 MITTWOCH, U. "Sex Chromatin". *J. of Med. Genetics*, 1: 50, 1964.
- 21 MORRIS, J. M., and MAHESH, V. B. "Further Observations of the Syndrome Testicular Feminization". *Am. J. Obst. & Gynec.* 87: 731, 1963.
- 22 NAKASHIMA, I., and ROBINSON, A. "Fertility in a 45, X female". *Pediatrics*, 47: 770, 1971.
- 23 PEARSON, P. L., BORRON, M. and VOSA C. G. "Technique for Identifying Y Chromosomes in Human Interphase Nuclei". *Nature*. 226: 78, 1970.
- 24 POLANI, P. E., HUNTER, W. F. y LENOX, B. "Chromosome sex in Turner's Syndrome with coarctation of the aorta". *Lancet*. 2: 120, 1954.
- 25 SINGH, R. P. and CARR, D. H. "The anatomy and histology of XO human embryos and fetuses". *Anat. Rec.* 155: 369, 1966.
- 26 TETER, J. BOCZKOWSKI, K. "Occurrence of tumors in Dysgenetic Gonads". *Cancer*. 20: 1301, 1967.
- 27 THORBURN, M. J., and PATHAK, U. N. "Cytogenetic and Clinical Observations on Two Indian Patients with Primary Amenorrhea". *International J. Obst. & Gynec.* 8: 43, 1970.
- 28 TURNER, H. H. "A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus". *Endocrinology*, 23: 566, 1938.
- 30 WILKINS, L., FLEISCHMANN, W. "Ovarian agenesis: pathology, associated clinical symptoms and the bearing on the theories of sex differentiation". *J. Clin. Endoc.* 4: 357, 1944.