



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de
la Salud

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CIENCIAS MÉDICAS

**“Diferencia en los perfiles de expresión de miRNAs
localizados en Xp11.2-pter en niñas con síndrome de
Turner”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE;**

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA;

ALAN CÁRDENAS CONEJO

TUTOR;

Dr. Miguel Ángel Villasís Keever

Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del
Seguro Social, IMSS.

COTUTORA;

Dra. María del Carmen Palacios Reyes

Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud, SSA.

Ciudad universitaria, Ciudad de México, Noviembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

Resumen Estructurado.....	3
Marco Teórico.....	4
Justificación del Estudio.....	27
Planteamiento del Problema.....	28
Pregunta de Investigación.....	28
Hipótesis de Investigación.....	28
Objetivos.....	29
Material y Métodos.....	29
Elegibilidad de los Sujetos.....	30
VARIABLES de Estudio.....	31
Métodos Técnicos.....	38
Aspectos Éticos.....	47
Resultados.....	49
Discusión.....	68
Conclusiones.....	75
Bibliografía.....	76
Anexos.....	80

“Diferencia en los perfiles de expresión de miRNAs localizados en Xp11.2-pter en niñas con síndrome de Turner”

Antecedentes.- El síndrome de Turner (ST) describe a una amplia constelación de manifestaciones clínicas en individuos del sexo femenino ocasionada por la monosomía parcial o total de un cromosoma X con o sin mosaicismo y que se confirma mediante estudio citogenético convencional (cariotipo).

Esta pérdida de material hereditario conlleva a la haploinsuficiencia de genes normalmente expresados en ambos cromosomas X, produciendo el fenotipo clínico característico. La incidencia es de 1/2500 recién nacidas vivas. Mediante el análisis molecular de los genes codificantes para proteínas localizados en la región crítica Xp11.2-pter se ha logrado explicar de forma parcial el origen de las manifestaciones clínicas del ST, sin embargo aún no se ha explorado a profundidad la posible participación de otros mecanismos de regulación de la expresión génica postranscripcional. Uno de ellos corresponde a la función de pequeñas moléculas de RNA llamadas microRNAs (miRNAs). Se consideró de interés científico realizar un abordaje molecular inicial para establecer si existían diferencias en el perfil de expresión de miRNAs en niñas con ST y sin este diagnóstico para en el futuro proponer un diseño metodológico adecuado que permita conocer si pudieran estar implicados en el fenotipo de las mujeres afectadas.

Objetivo.- En niñas de 6-16 años de edad con el diagnóstico de ST (45,X) que acuden a consulta externa de Genética del Hospital de Pediatría de CMN Siglo XXI en comparación con niñas sanas (6-16 años) sin el diagnóstico de ST (46,XX): 1.-Medir y comparar las diferencias en la expresión de los 38 miRNAs localizados en Xp11.2-pter (arreglo de Applied Biosystems™ GeneChip™ miRNA 4.0 Array).

Material y Métodos.- Se realizó un estudio transversal analítico. La variable dependiente es la expresión de miRNAs y la variable independiente es la presencia o no del diagnóstico de ST. Por plausibilidad biológica relacionada a efecto de dosis génica (haploinsuficiencia de genes localizados en Xp11-pter) en pacientes con Turner en comparación con las controles se calculó un tamaño de muestra para diferencia de medias entre dos grupos independientes resultando 7 niñas por grupo, el análisis estadístico se realizó mediante t de Student. Se realizó un muestreo no probabilístico de casos consecutivos. El perfil de expresión de miRNAs se realizó mediante arreglo de Applied Biosystems™ GeneChip™ miRNA 4.0 Array.

Resultados.- Se analizó sangre periférica de un total de 15 niñas (6-16 años), 8 de ellas con el ST y cariotipo 45,X. Las 7 niñas restantes eran sanas y con cariotipo 46,XX. No existió diferencia en la edad de las participantes ($p=0.691$). De los 89 miRNAs con expresión diferencial entre los grupos, solo 2 de los 38 miRNAs localizados dentro de Xp11.2-pter se encontraron diferencialmente expresados, hsa-miR-221-5p (Xp11.3), fold change de -1.66 ($p=0.0491$) y hsa-miR-660-3p (Xp11.23) con fold change de -1.58 ($p=0.0021$).

Conclusiones.- De los 89 miRNAs que mostraron un perfil de expresión diferencial significativo entre los grupos, solo 2 de los 38 miRNAs localizados en Xp11.2-pter se encontraron sub expresados, estos fueron, hsa-miR-221-5p y hsa-miR-660-3p. Sugerimos que la sub expresión de hsa-miR-221-5p, podría mediar una posible disfunción de la regulación del metabolismo de la glucosa y predisponer al desarrollo de diabetes mellitus en mujeres con síndrome de Turner mediante la vía molecular de *KCNJ11* y *ENPP1*.

MARCO TEÓRICO

Síndrome de Turner

El síndrome de Turner (ST) describe a una amplia constelación de manifestaciones clínicas en individuos del sexo femenino ocasionada por la monosomía parcial o total de un cromosoma X con o sin mosaicismo y que se confirma mediante estudio citogenético convencional (cariotipo), esta pérdida de material hereditario conlleva a la haploinsuficiencia de genes normalmente expresados en ambos cromosomas X, produciendo el fenotipo clínico característico de este síndrome ^{1,2}.

La descripción original fue realizada por Henry Turner en 1938 con base en la falta del desarrollo puberal en mujeres, cuello alado y cúbito valgo bilateral³. En la actualidad, se acepta que el síndrome consiste en talla baja, estrías gonadales, cuello alado, tórax en escudo, coartación de la aorta/aorta bivalva, linfedema al nacimiento, uñas hipoplásicas, metacarpianos cortos y *nevi* pigmentados⁴. En la tabla número 1 se describen las características clínicas completas y sus porcentajes.

EPIDEMIOLOGÍA

El ST es una de las anomalías cromosómicas más comunes en los seres humanos⁵, la incidencia aproximada es de 1/2500 recién nacidos vivos del sexo femenino, no se han descrito diferencias en esta proporción por grupos étnicos⁶. En nuestro país aún no existe un informe final acerca de los indicadores epidemiológicos del padecimiento. En los últimos 10 años, el Departamento Clínico de Genética Médica de la UMAE CMN Pediatría Siglo XXI, ha otorgado alrededor de 300 consultas para atender a pacientes con síndrome de Turner, se ha registrado una frecuencia anual de 11 a 33 casos por año, con una mediana de 16.5. El número máximo de consultas por paciente es de 6 al año y las necesidades de hospitalización son bajas, principalmente por motivos quirúrgicos⁷.

1.- Manifestaciones Clínicas en Síndrome de Turner (tabla 1).

<i>Característica</i>	<i>Prevalencia (%)</i>
Crecimiento	90
<ul style="list-style-type: none"> • Recién nacidos pequeños para la edad gestacional • Talla baja con velocidad de crecimiento menor al percentil 10 para la edad 	
Ovario	90
<ul style="list-style-type: none"> • Retraso puberal • Amenorrea primaria • FSH elevada • Disgenesia gonadal • Insuficiencia ovárica 	
Dermatológicas	70
<ul style="list-style-type: none"> • Alopecia o hirsutismo • Linfedema en extremidades • Displasia o hipoplasia ungueal • Nevos pigmentados múltiples • Vitiligo 	
Cavidad oral	70
<ul style="list-style-type: none"> • Disgenesia dental • Alteración del desarrollo dental • Paladar alto arqueado u ojival 	
Mandíbula	70
<ul style="list-style-type: none"> • Micrognatia 	
Cuello	70
<ul style="list-style-type: none"> • Cuello alado (<i>Pterigium colli</i>) • Línea capilar posterior baja • Cuello corto 	
Tórax	70
<ul style="list-style-type: none"> • Teletelia (pezones separados) • Pezones invertidos • Tórax en escudo 	
Otorrinolaringológicas	50
<ul style="list-style-type: none"> • Otitis media crónica • Hipoacusia conductiva o sensorineural • Implantación baja de pabellones auriculares • Pabellones auriculares displásicos 	
Renales	50
<ul style="list-style-type: none"> • Agenesia renal • Riñón en herradura • Doble sistema colector • Alteraciones vasculares 	
Sistema vascular	50
<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión arterial sistémica • Coartación de la aorta • Estenosis de la aorta • Aneurismas de la aorta • Válvula aórtica bicúspide 	
Sistema osteoarticular	50
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cubitus valgus</i> • <i>Genu valgum</i> • Osteoporosis • Deformidad vertebral (escoliosis, xifosis) • Acortamiento del cuarto metacarpiano 	

<i>Característica</i>	<i>Prevalencia (%)</i>
Tiroides	50
<ul style="list-style-type: none"> • Hipotiroidismo • Autoanticuerpos tiroideos 	
Hígado	30
<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas hepáticas anormales • Hígado graso 	
Oftalmológicas	30
<ul style="list-style-type: none"> • Epicanto • Ptosis • Estrabismo • Nistagmo • Miopía 	

DIAGNÓSTICO Y HALLAZGOS CITOGENÉTICOS

De forma objetiva, en todos los individuos del sexo femenino en quienes se sospeche el diagnóstico de ST (con base en el espectro clínico descrito en la tabla 1) debe realizarse un cariotipo convencional en sangre periférica con una lectura mínima de 30 metafases según lo recomendado por el Colegio Americano de Genética Médica (ACMG) para establecer de forma definitiva el diagnóstico de ST⁸. Cerca del 45-50% de los pacientes muestran un resultado de cariotipo 45,X, del 20 al 30% muestran dos o más líneas celulares provenientes del mismo cigoto (mosaico) y el porcentaje restante corresponde a anomalías estructurales del cromosoma X⁹. En la tabla número 2 se describen los porcentajes de las diferentes fórmulas cromosómicas encontradas en pacientes con ST².

Tabla 2 Fórmulas Cromosómicas en ST

Alteraciones Numéricas	Alteraciones Estructurales
Monosomía regular (45,X) 50-55%	Isocromosoma de brazos largos, 17% <ul style="list-style-type: none"> • 46,X,i(Xq)
Mosaico 24% <ul style="list-style-type: none"> • mos 45,X/46,XX • mos 45,X/47,XXX • mos 45,X/46,XY • mos 45,X/47,XXX/46,XX 	Delección de brazo corto, 6% <ul style="list-style-type: none"> • 46,X,del(Xp)
	Anillo del cromosoma X, 7% <ul style="list-style-type: none"> • 46,X,r(X)
	Otras 1%

Modificado de López-Muñoz et al 2012.

Si existe la sospecha de un mosaicismo no identificado, la lectura de las metafases debe incrementarse, o en su caso, utilizar una técnica de citogenética molecular como el FISH (*fluorescence in situ hybridization*) con sonda específica para centrómero del cromosoma X así como de la región específica Xp22.33⁹. Si el resultado del cariotipo en sangre periférica es normal y la sospecha clínica del ST es fuerte, se sugiere explorar un segundo tejido corporal, ejemplo; piel (fibroblastos)⁹, en nuestro estudio nos limitamos a descartar mosaicismo solo con base en la lectura de 30 metafases en sangre periférica en cuyo caso es capaz de detectar 10% de mosaicismo con 95% de confianza.¹⁰ En sujetos con el diagnóstico de ST, mediante

técnicas de citogenética convencional y de biología molecular puede detectarse una segunda línea celular con la presencia de un cromosoma Y normal o estructuralmente afectado en alrededor del 6-11%, de acuerdo a la metodología utilizada. Esto resulta ser de importancia dado el incremento en el riesgo de desarrollar gonadoblastoma, neoplasia compuesta de células germinales con buen pronóstico si es detectada de forma temprana, pero que en caso de no identificarse, puede progresar a disgerminoma que posee alto potencial metastásico.¹¹ Canto P. et al en 2004 reportaron que el 9.3% de 107 mujeres mexicanas con ST con cariotipo 45,X presentaron al menos una secuencia del cromosoma Y (PABY, SRY, ZFY, Yc, Yqh) detectada mediante PCR tiempo real, y 33% de ellas desarrollaron disgerminoma¹¹.

ETIOLOGÍA

El ST es considerado en la mayoría de las veces una condición esporádica en la que en hasta el 60-80% de las veces el cromosoma X ausente es de origen paterno, esto debido a un rezago en la anafase al momento de la división celular¹². El ST es un trastorno multisistémico causado por la pérdida completa o parcial del cromosoma X. En condiciones fisiológicas, el cromosoma X, con excepción de la región pseudo-autosómica, es inactivado mediante un mecanismo de silenciamiento molecular. Se ha sugerido que las características clínicas presentes en ST presumiblemente se deben a la haploinsuficiencia de uno o más genes localizados en el cromosoma X que normalmente escaparían a la inactivación y estos representan alrededor de un 15% del total de los genes contenidos en este cromosoma, destacan *RPS4X*, *ZFX* y *SHOX*⁹. La fórmula cromosómica 45,X se observa en alrededor del 1-2% de todos los productos de la concepción, en 10% de los abortos y en 1% de los mortinatos. Más del 99% de los productos de la concepción 45,X resultan en un aborto espontáneo antes de la semana 20 de la gestación⁸. La razón por la cual el 1% sobrevive a término con anomalías somáticas de menor gravedad no se conoce a profundidad, sin embargo, se ha planteado que puede deberse a un mosaicismo no detectado de una línea celular que incluya un segmento o la totalidad de un cromosoma sexual así como una posible función placentaria de "línea celular de rescate" en embriones 45,X sin mosaicismo aparente¹³.

ASPECTOS GENÉTICOS Y MOLECULARES DEL SÍNDROME DE TURNER

El fenotipo solo se relaciona de forma parcial con la fórmula del cariotipo

El complemento cromosómico observado en el cariotipo no logra explicar totalmente la presentación clínica de las diferentes anomalías congénitas, de igual forma, no predice las posibles complicaciones futuras dentro de la historia natural del padecimiento¹⁴.

A continuación se sintetizan algunas distinciones clínicas según la fórmula cromosómica que presente la mujer afectada.

Tabla 3 Presentación clínica según resultado de cariotipo

Cariotipo	N. de Px	D. Intelectual	Cardiopatía	Renal	Edema	Menstruación	Talla	Número
45,X	241 (45)	19/230 (8)	94/154 (61)	84/181 (46)	141/217 (65)	13/128 (10)	147.3±6.0	64
46,X,i(Xq)	35 (7)	6/33 (18)	10/20 (50)	8/22 (36)	4/30 (13)	4/22 (18)	145.6±4.7	9
45,X/46,X,i(Xq)	40 (8)	3/34 (9)	7/24 (29)	10/38 (26)	0/26	4/26 (15)	143.4±7.9	14
45,X/46,X,+ring	32 (6)	10/30 (33)	14/22 (64)	6/27 (22)	3/27 (11)	2/16 (12)	145.7±4.9	7
45,X/46,X,+mar	5 (1)	4/5 (80)	1/2 (50)	1/3 (33)	1/4 (25)	0/1	—	
45,X/46,XY or 46,X,Yvar/Ydel	37 (7)	0/32	14/22 (64)	12/27 (44)	3/32 (9)	0/13	148.8±5.9	12
45,X/46,XX/47,XXX	17 (3)	0/24	1/10 (10)	3/12 (25)	1/17 (6)	5/9 (56)	144.9±7.7	6
45,X/47,XXX								
45,X/46,XX	70 (13)	5/65 (8)	17/43 (40)	17/44 (39)	9/61 (15)	14/35 (40)	149.7±7.5	22
46,X,Xp (short-arm deletions)	13 (2)	1/13 (8)	0/4	0/5	1/12 (8)	6/7 (86)	153±5.0	5
46,X,Xq (interstitial long-arm deletions)	9 (2)	0/9	ND	2/4 (50)	0/6	5/7 (71)¶	163±16.6	6
Other	33 (6)	7/32 (22)	11/18 (61)	4/20 (20)	2/29 (7)	6/20 (30)	149.9±7.4	15

Sybert y McCauley en 2004⁶

En general, se acepta que los pacientes con cariotipo 45,X cursan con más probabilidades de tener linfedema congénito. Aquéllas en quienes se observa un cariotipo 45,X/46,XX o 45,X/47,XXX tienen una probabilidad mayor de presentar menarca espontánea y fertilidad. En mujeres con 45,X/46,XX se ha observado una talla más alta en comparación con otros complementos cromosómicos. La presencia de 46,i(Xq) sugiere un incremento en el riesgo de desarrollar hipotiroidismo y enfermedad intestinal inflamatoria. Detectar un cromosoma X en anillo o un marcador cromosómico confiere un riesgo incrementado de cursar con discapacidad intelectual y características clínicas atípicas⁶. Sin embargo, otorgar predicciones fenotípicas a un

paciente basados en su resultado de cariotipo es poco confiable, pues, mujeres con 45,X han logrado concebir y mujeres con 45,X/46,XX con la línea celular 46,XX preponderante sobre la 45,X pueden mostrar todas las características clínicas distintivas del ST.⁶

Genes implicados en el origen del síndrome de Turner

En los humanos, como en otras especies de mamíferos, los individuos del sexo femenino (46,XX) igualan o compensan la dosis génica en relación al varón (46,XY) mediante la inactivación de uno de los dos cromosomas X, esto sucede en las células somáticas de las mujeres sanas en etapas tempranas del desarrollo embrionario, se logra mediante un proceso epigenético altamente regulado que involucra al Centro de Inactivación del cromosoma X (XIC), se localiza en Xq13.2 y contiene a *XIST* (por sus siglas en inglés: X-Inactive-Specific Transcript locus) que codifica para un RNA *XIST* no traducido, que al acumularse en *cis* cubre al cromosoma X que se inactivará, previo conteo y selección del cromosoma X a silenciar realizado por XIC^{15, 16}.

Cerca del 15-25% de los genes que se encuentran en el cromosoma X inactivo escapan a la represión transcripcional, se les conoce como genes pseudoautosómicos, cuentan con sus genes homólogos en PAR-1 (región pseudoautosómica) y PAR-2 del cromosoma Y¹⁶. El cuadro clínico del ST es resultado de una haploinsuficiencia de múltiples genes localizados en Xp11.2-22.3 que afectan el desarrollo embrionario, la talla y la función gonadal. Es por esta razón que se le conoce como “región crítica”, pues la ausencia de este segmento por la pérdida del cromosoma X homólogo ocasiona una dosis génica insuficiente, que de cierta forma explica la mayor parte de las manifestaciones clínicas de las mujeres afectadas¹⁷.

A continuación abordaremos generalidades de algunos de los genes responsables del fenotipo clínico localizados en esta región crítica.

Haploinsuficiencia de *SHOX* **(Short-stature Homeobox-containing gene On the X chromosome)**

La talla baja es el hallazgo físico más frecuente en mujeres con ST, está causada por la haploinsuficiencia de la expresión de *SHOX* en los condrocitos durante la embriogénesis¹⁸. Está localizado en la PAR1 del cromosoma X y Y (Xp22.3 y Yp11.3). Alrededor del 15-25% de los genes contenidos en el cromosoma X “inactivo” escapan del silenciamiento, *SHOX* es uno de ellos, es heredado de los padres como un par de copias funcionales y la pérdida de uno de ellos es suficiente para causar las anomalías esqueléticas del ST¹⁸.

Haploinsuficiencia de genes implicados en función ovárica

La disfunción ovárica en mujeres con ST probablemente está causada por una pérdida rápida de ovocitos después de la semana 18 de vida fetal (profase meiótica). Esto conlleva a disgenesia gonadal y estrías ováricas con ausencia parcial o completa del desarrollo puberal, por lo que la infertilidad es uno de los principales problemas en estas mujeres¹⁹. Estudios acerca de puntos de ruptura del cromosoma X han mostrado la existencia de tres *loci* distintos asociados significativamente al fenotipo ovárico, uno de ellos localizado en Xp11.2-22.1 y otros dos más en Xq13-q21 y Xq23-q27^{20,21}.

Haploinsuficiencia de genes implicados en defectos cardiacos

La válvula aórtica bicúspide (VAB) (30%) y coartación de la aorta (COA) (12%) representan los defectos cardiacos más frecuentes en ST²².

La elevada prevalencia de VAB y COA en sujetos con la pérdida del brazo corto del cromosoma X sugiere que la haploinsuficiencia de los genes localizados en Xp11.2-pter contribuye a un desarrollo embrionario anormal de la válvula y del arco aórtico²². Se han sugerido dos genes candidatos causales, *USP9X* y *DDX3* ya que ambos escapan a la inactivación del cromosoma X y tienen un homólogo en cromosoma Y²².

Avances en el establecimiento de una fisiopatología molecular del ST.

Las causas moleculares de la variabilidad fenotípica de las pacientes con síndrome de Turner aún no han sido explicadas por completo. Recientemente Rajpathak et al en 2013 evidenciaron alteraciones epigenéticas (desregulación de metilación de DNA) en genes localizados en el cromosoma X entre mujeres con ST y sin este diagnóstico²³. Sugirieron un patrón de metilación génica global diferencial en mujeres 45,X vs 46,XX, esto incluye tanto genes autosómicos como los localizados en cromosoma X. En general, las vías biológicas implicadas estuvieron relacionadas al desarrollo de células germinales, generación de gametos, desarrollo embrionario del aparato genitourinario, remodelamiento óseo, (SOX9 localizado en 17q24.3 es un factor de transcripción fundamental en la diferenciación osteoblástica y se encontró metilado en linfocitos 45,X vs 46,XX), regulación epigenética, entre otras, ver tabla 4.

Esto correlaciona con el fenotipo observado en pacientes con ST y se presumió que la desregulación de la maquinaria de la metilación del DNA en la monosomía del cromosoma X podría tener repercusión en el cuadro clínico²³.

Tabla 4.- Genes metilados (silenciados) en fibroblastos y linfocitos de mujeres 45,X vs 46,XX²³.

Gen	Locus	Función
ACVR1	2q24.1	Receptor 1 de activina A interacciona con la hormona inhibidora de mullerianos participando en la foliculogénesis.
BAHD1	15q15.1	Reprime la transcripción de <i>IGF2</i> por lo tanto disminuye la secreción de insulina mediada por glucosa
SAFB	19p13.3	El factor B de acoplamiento al andamiaje interacciona directamente con el receptor de alfa estrogénico funcionando como un co-represor del mismo.

Los autores sugirieron a futuro la necesidad de desarrollar más estudios dirigidos a la búsqueda de otros mecanismos moleculares que contribuyan a explicar las manifestaciones clínicas del ST²³.

Este mismo autor y sus colaboradores en Junio 2014²⁴, analizaron modificaciones genómicas en el transcriptoma de fibroblastos humanos obtenido de una mujer con síndrome de Turner (45,X) en comparación con fibroblastos de una mujer 46,XX. Utilizaron secuenciación de RNA de alto desempeño, exploraron alrededor de 58,000 genes (codificantes y no codificantes) de los cuales 116 mostraron una diferencia de expresión significativa, de entre ellos destaca *XIST*, un gen que codifica para un RNA largo no codificante (lncRNA) localizado en Xq13.2, su función está relacionada a la inactivación de uno de los dos cromosomas X en los humanos y su expresión fue nula en la línea celular de fibroblastos 45,X en comparación con la 46,XX²⁴. El análisis funcional reveló que los genes diferencialmente expresados están asociados con el desarrollo gonadal, óseo y con el metabolismo de la glucosa. Un ejemplo de ello es *BMP2* (gen de la proteína morfogénica ósea número 2, localizado en 20p12.3), su función es importante en la mineralización ósea y se encontró sub-regulado (6 veces) en células 45,X comparado con 46,XX. Esto supone una menor actividad y por lo tanto una implicación en el fenotipo esquelético de mujeres con ST²⁴.

En la monosomía del cromosoma X existe una expresión diferencial de genes contenidos en autosomas y en cromosomas sexuales. Un ejemplo de sobre expresión génica en 45,X vs 46,XX es *BMPER*, está localizado en 7p14.3 y se encontró sobre expresado (>5 veces), este gen codifica para un regulador endotelial de unión a BMP inhibiendo su función, por lo que al estar sobre expresado altera el crecimiento y el desarrollo óseo regulado por la vía de las proteínas morfogénicas óseas en pacientes con ST²⁴. Para más detalles ver mapa de calor de los 116 genes expresados diferencialmente en fibroblastos 45,X vs 46,XX en figura 1.

Los autores concluyeron que la monosomía del cromosoma X afecta el perfil transcriptómico global y que la regulación diferencial de genes codificantes y no codificantes podría ser un factor fundamental en la búsqueda de respuestas acerca de la complejidad en la expresión del fenotipo en las mujeres con síndrome de Turner²⁴.

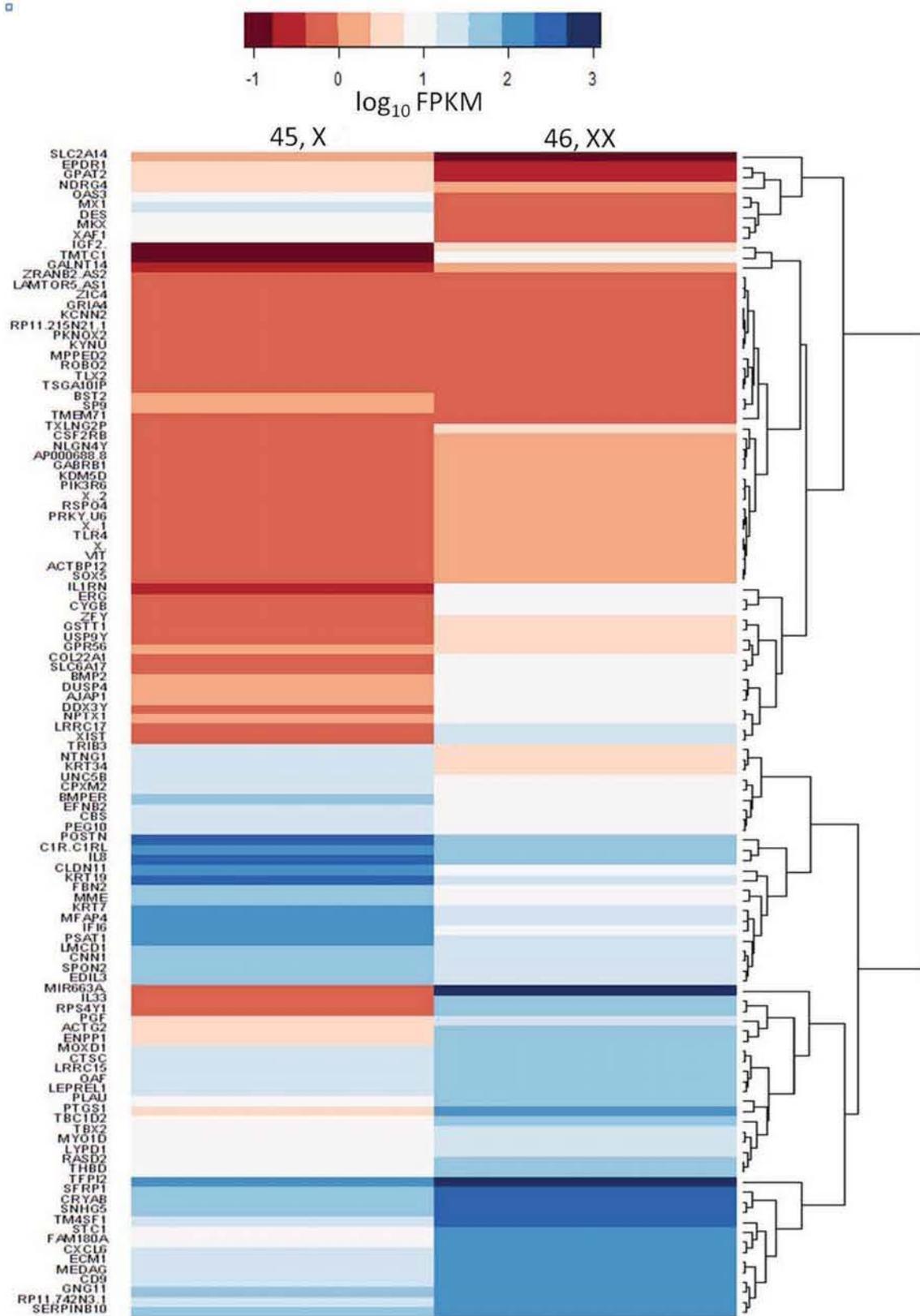


Figura 1. Mapa de calor de los 116 genes expresados diferencialmente en fibroblastos 45,X vs 46,XX²⁴

Trolle y colaboradores en 2016²⁵ analizaron leucocitos de sangre periférica de mujeres 45,X comparado con mujeres 46,XX y varones sanos 46,XY. Los resultados ilustraron que el perfil de expresión de RNA del cromosoma X, el perfil de metilación del DNA de los autosomas y del cromosoma X, claramente son distintos entre síndrome de Turner y los controles. Se concluyó un estado global de hipometilación del genoma, que incluso se extiende a secuencias altamente repetidas en mujeres 45,X. Propusieron nuevos genes candidatos que podrían explicar algunas de las manifestaciones del ST, *PRKX* localizado en Xp22.33 para las anomalías congénitas morfológicas del sistema urinario (incremento en el riesgo >8 veces, principalmente para riñón en herradura) y *KDM6A* localizado en Xp11.3 para la falla ovárica prematura y desarrollo cardiovascular anormal compartido con síndrome de Kabuki tipo 2²⁵.

Informaron que *ZFYVE9* y *TIMP1* localizados en 1p32.3 y Xp11.3 respectivamente, son candidatos en la predisposición de la formación de aneurismas aórticos²⁵, que en específico, la mortalidad de origen cardiovascular está incrementada en ST pues existe un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad arterial coronaria y además cursar con disección aórtica. Desde el punto de vista cardiológico, se ha demostrado que en pacientes con síndrome de Marfan y en sujetos con aorta bicúspide como en las mujeres con ST, existe una implicación de *SMAD2* en el desarrollo de aneurismas aórticos, estos investigadores demostraron que *ZFYVE9* regula a *SMAD2* y que al encontrarse diferencialmente expresado en 45,X podría contribuir a la dilatación aórtica en ST²⁵.

Más del 99% de los productos de la concepción 45,X se pierden en etapas embrionarias, este mismo grupo danés encontró 3 genes que normalmente escapan a la inactivación del cromosoma X expresados diferencialmente en linfocitos de mujeres 45,X, 46,XX y varones 46,XY. Los tres genes se localizan en Xp22.33 y codifican para proteínas implicadas en respuestas inmunitarias, *CD99* (adhesión celular), *IL3RA* (Receptor de Interleucina 3) y *CSF2RA* (Receptor 2 del Factor estimulante de colonias) que podrían explicar el fenómeno de la letalidad embrionaria temprana en 45,X, así como tener un papel importante en la predisposición de enfermedades autoinmunitarias en TS²⁵.

Para explorar la posible participación de otros mecanismos de regulación de la expresión génica postranscripcional en síndrome de Turner, a nuestro equipo de investigación le interesó analizar genes no codificantes, en particular de miRNAs contenidos en la región crítica Xp11.2-pter en sangre periférica de niñas con ST y niñas sin este diagnóstico confirmado por cariotipo.

miRNAs: Un mecanismo de regulación de expresión génica postranscripcional

El genoma humano alberga alrededor de 2000 genes que codifican para miRNAs, pequeñas moléculas de RNA no codificante de entre 20-22 nucleótidos que median silenciamiento génico transcripcional.²⁶ Se expresan de forma ubicua y están conservados en la evolución de las diferentes especies.

Un análisis genómico computacional mostró que los miRNAs componen cerca del 3% del genoma humano y regulan del 30-90% de los genes humanos. Se ha documentado el importante papel que juegan los miRNAs en la regulación de casi todas las vías biológicas, ya sean fisiológicas o patológicas.²⁷ Como ejemplo de ello, se han observado diferentes perfiles de expresión de miRNAs alterados en varias enfermedades del ser humano como las enfermedades neurodegenerativas, metabólicas, cáncer, enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y esclerosis múltiple), entre otras más. Incluso en el contexto de las enfermedades autoinmunes los miRNAs se encuentran diferencialmente expresados entre varones y mujeres lo que origina una susceptibilidad y gravedad distinta entre los dos sexos.^{26,27}

Biogénesis, Función e Implicaciones Patológicas de los miRNAs

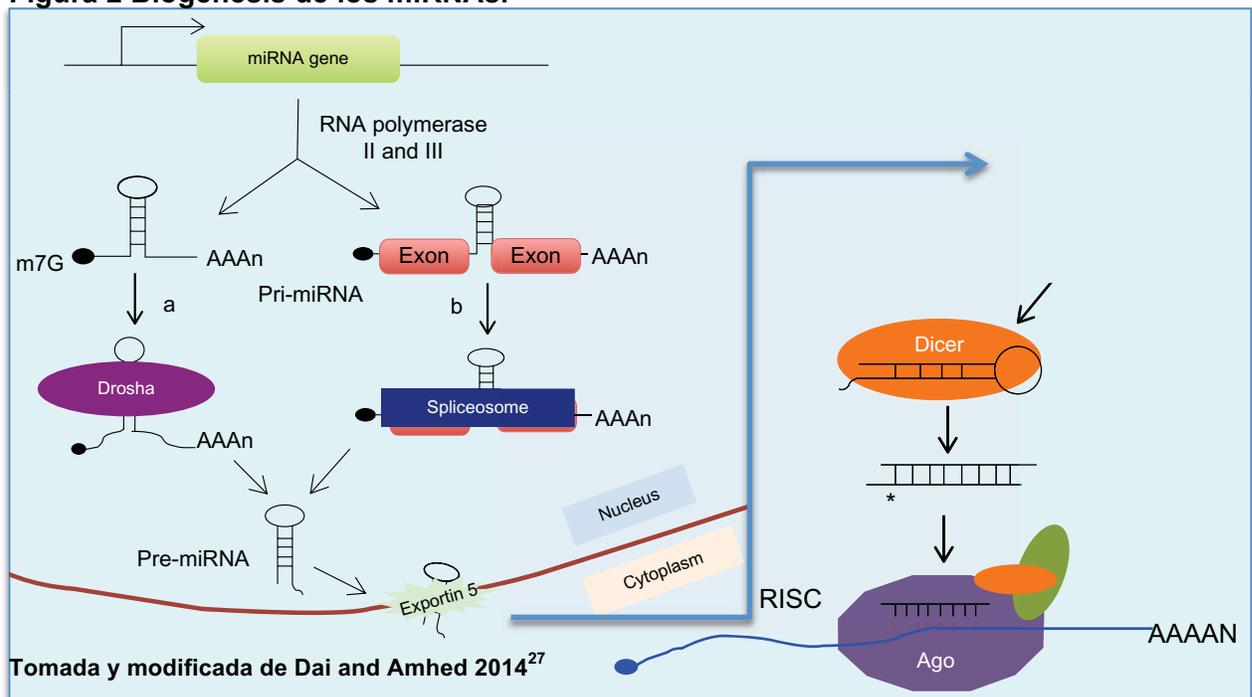
A la fecha se estima la existencia de 38,589 miRNAs maduros en 206 especies que se encuentran registrados en la base de datos de miRNAs (miRBase, <http://.mirbase.org>, versión 22, liberada en Marzo 2018). La mayoría de los genes de miRNAs (80%) están localizados en regiones intergénicas e intrónicas de los genes codificantes y no codificantes de proteínas. El 20% restante se encuentran en

regiones exónicas de transcritos no codificantes, de estos, algunos están considerados una mezcla (miRNAs tanto intrónicos como exónicos, según el patrón de corte y empalme alternativo)²⁷.

Como se observa en la figura 2, los genes de miRNAs son transcritos por una RNA polimerasa tipo II o III que produce un transcrito primario largo (pri-miRNA) el cual contiene estructuras horquilla-asa mono o policistrónicas. Este pri-miRNA es procesado en el núcleo por una RNAasa tipo III llamada DROSHA/DGCR8 que genera un precursor de miRNA (pre-miRNA) de unos 60-70 nucleótidos de largo con estructura intermedia de tallo-asa. Este pre-miRNA es transportado hacia el citoplasma por Exportina5/RanGTP donde es escindido por una RNAasa tipo III llamada DICER/TRBP generando un miRNA maduro de alrededor de 20-22 nucleótidos en forma de dúplex confrontados de forma imperfecta²⁷.

Para regular la expresión de un gen blanco, este dúplex es descargado en Argonauta (AGO), una proteína que une a los miRNAs maduros dentro de RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) a sus mRNAs blancos a través de la hibridación de la mitad proximal 5' del miRNA a la región 3'UTR del blanco específico, lo que resulta en degradación o represión de la traducción del mRNA.²⁷

Figura 2 Biogénesis de los miRNAs.



La expresión individual de cada miRNA está regulada de forma estrecha durante el desarrollo y se considera célula y temporal específica²⁸. Por lo que una expresión alterada de ciertos miRNAs por desequilibrio transcripcional y post-transcripcional, está asociada a la patogénesis de diferentes anomalías del desarrollo y enfermedades en la especie humana²⁶. Ver tabla número 5.

Tabla 5.- Lista de miRNAs asociados a patologías humanas, Kawahara 2014²⁶.

List of miRNA and miRNA-related genes associated with human diseases			
Disease	Involved miRNAs or miRNA-related genes	Abnormalities	Symptoms or features
DiGeorge syndrome	<i>DGCR8</i>	22q11.2 deletion	Behavioral and cognitive deficits, Immunodeficiency, Cardiac anomalies
Pleuropulmonary blastoma, Cystic nephroma, Ovarian Sertoli-Leydig-type tumors, Pineoblastoma	<i>DICER1</i>	Germline point mutation	
Nonepithelial ovarian tumors	<i>DICER1</i>	Somatic point mutation	
Colon tumors, Gastric tumors	<i>TARBP2</i>	Somatic point mutation	Malignancies with microsatellite instability
Colon tumors, Gastric tumors, Endometrial tumors	<i>XPO5</i>	Somatic point mutation	Malignancies with microsatellite instability
5q- syndrome	<i>miR-145, miR-146</i>	5q deletion	A subtype of myelodysplastic syndrome
Feingold syndrome 2	<i>miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a</i>	13q31.3 deletion	Microcephaly, Relative short stature, Digital anomalies
Chronic lymphocytic leukemia, Diffuse large B-cell lymphoma, Multiple myeloma, prostate tumors	<i>miR-15a, miR-16-1</i>	13q14.3 deletion	
Chronic lymphocytic leukemia	<i>miR-16-1</i>	Germline point mutation	
Severe deafness	<i>miR-96</i>	Germline point mutation	Nonsyndromic hearing impairment
EDICT syndrome	<i>miR-84</i>	Germline point mutation	Severe keratoconus, Endothelial dystrophy, Iris hypoplasia, Congenital cataract, Stromal thinning
Tourette's syndrome	<i>SLITRK1</i>	Variant in miR-189-binding site	Chronic vocal and motor tics, Obsessive-compulsive behaviors, Attentional impairment
Crohn's disease	<i>IRGM</i>	Variant in miR-196-binding site	Inflammatory bowel disease characterized by diarrhea, abdominal pain and ulcers
X-linked dominant chondrodysplasia	<i>HDAC6</i>	Point mutation in miR-433-binding site	Platyspondyly, Hydrocephaly, Facial dysmorphism, Microphthalmia, Mental retardation

En relación a esto último, en una revisión bibliográfica actual de los diferentes mecanismos que regulan la biogénesis de los miRNAs, se puntualiza como un aspecto fundamental, el control temporal y espacial de los procesos que interfieren en la expresión genómica y proteómica global de un individuo²⁹. Estos mecanismos están implicados a múltiples niveles, algunos son; la transcripción de los miRNA por la RNA polimerasa tipo II, el procesamiento por DROSHA y DICER, edición del RNA, metilación del RNA, expresión de Argonauta e incluso polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs) en los genes que codifican para miRNAs, pudiendo modificar la especificidad con la que se unen a sus RNAm blancos regulando así el silenciamiento transcripcional²⁹. Habiendo explicado lo anterior, es válido inferir que la información contenida en los ácidos nucleicos heredada de cada uno de los progenitores de un individuo, resulta esencial en la regulación de la biogénesis/función de los miRNAs en condiciones fisiológicas y en la forma en la que interacciona con los diversos factores ambientales a los que se está expuesto.

Se han propuesto diversos factores externos o ambientales que pueden modificar la expresión de miRNAs, algunos de ellos son: la exposición sistémica a fármacos, compuestos químicos naturales (alimentos) e incluso al nivel de luz captada por adenilato ciclasa VI en retina de ratones y *Drosophila melanogaster*, demostrándose así una regulación de la expresión de miRNAs mediante ciclo circadiano^{30, 31, 32}. En particular, Kelly et al 2014 demostraron 4 miRNAs diferencialmente expresados en sujetos que recibieron dosis terapéuticas de reemplazo de la hormona de crecimiento recombinante (somatostatina) al compararse con sujetos sanos³².

Algunas mutaciones en genes de miRNAs o en sitios de unión miRNAs--mRNAs pueden disminuir la función de los miRNAs causando enfermedades genéticas específicas²⁶. Existe una evidencia creciente que demuestra que la duplicación o eliminación de genes de miRNA o de genes que codifican para la maquinaria de procesamiento de los miRNAs contribuyen al fenotipo de los trastornos causados por anormalidades cromosómicas²⁶.

Debido a una posible relación entre una expresión alterada de miRNAs y el fenotipo de ST, expondremos inicialmente algunas condiciones patológicas en las que se ha demostrado su franca asociación y posteriormente se abordará un solo trabajo de investigación reciente que aporta información acerca de la expresión diferencial de miRNAs y el síndrome de Turner.

Enfermedades causadas por duplicación o eliminación (haploinsuficiencia) de genes que codifican miRNAs

Las regiones que se encuentran duplicadas, eliminadas o invertidas en individuos con anomalías cromosómicas, algunas veces albergan genes codificantes para proteínas y también genes que codifican para miRNAs. Por ejemplo, la región eliminada en sujetos con el síndrome de Feingold tipo 2, se considera un agrupamiento de miRNAs (cluster) miR-17-92 codificado por *MIR17HG* localizado en 13q31.3, su eliminación hemicigota causa disminución de la expresión de los miRNAs codificados en la región perdida y esta sub-expresión causa microcefalia, talla baja y braquimesofalangia³³. Otra condición cromosómica relacionada a la falta de función de un miRNA, es el síndrome de la microdelección 22q11.2, en donde se ha descrito que la haploinsuficiencia de *DGCR8* altera la expresión de múltiples miRNAs y contribuye al déficit cognitivo y los trastornos del comportamiento observados en este síndrome²⁶.

Palacios-Reyes MC y colaboradores en 2013³⁴ encontraron 14 miRNAs diferencialmente expresados mediante un ensayo de RT-qPCR en células derivadas de neuronas del epitelio olfatorio de sujetos con el diagnóstico de síndrome de Williams en comparación con muestras de sujetos sanos. Esta condición está causada por la ausencia (microdelección) de los genes localizados en la región crítica 7q11.23 y concluyeron que la haploinsuficiencia de estos genes está relacionada a la desregulación de miRNAs y sus RNAm blancos asociados a la disfunción neuronal descrita en sujetos con síndrome de Williams³⁴.

El cromosoma 21, que se encuentra triplicado de forma total o parcial en sujetos con síndrome de Down (SD), alberga a 5 genes de miRNAs (miR-99a, let-7c, miR-125b-2, miR-155 y miR-802) que se encuentran sobre-expresados 2-3 veces en la corteza prefrontal de sujetos con síndrome de Down³⁵. Profundizaremos en un trabajo de investigación publicado por Xu et al en 2013³⁶ pues consideramos que se relaciona de alguna manera con nuestra propuesta de tesis.

Los autores tomaron muestras de sangre periférica de 6 niños sanos y 6 niños con el diagnóstico por cariotipo de trisomía 21 de entre 5 y 12 años de edad, se extrajo RNA total mediante el método de TRIzol®, se construyeron 3 bibliotecas de RNA del pool del grupo de niños con trisomía 21 (grupo SD) y 3 de los niños sanos (grupo control), las muestras restantes se utilizaron para validación y confirmación de los patrones de expresión diferencial mediante la técnica de qRT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por retrotranscripción de RNA)³⁶.

Los miRNAs expresados de forma diferencial se identificaron por el método “fold-change” número de veces como se describe en un estudio por Vaz et al 2010³⁷. La significancia estadística (valor de p) fue inferida por el método Bayesiano desarrollado por Audic y Claverie en 1997.³⁸

Se determinó diferencialmente expresado un miRNA con un valor de p menor de 0.001 y con un cambio de al menos 2 veces en el conteo de las secuencias entre los dos grupos. Sus resultados indicaron que al comparar los perfiles de expresión entre los grupos la mayoría de los miRNAs identificados eran muy similares (miRNAs globales).

No todos los miRNAs derivados del cromosoma 21 estuvieron sobre-expresados con razón de significancia mayor de 2 veces en linfocitos de niños con SD. De los 114 miRNAs expresados diferencialmente con significancia estadística (globales), 5 de ellos se localizan en el cromosoma 21 (miR-99a, let-7c, miR-125b, miR-155 y miR-802) y mostraron estar implicados en el desarrollo de órganos hematopoyéticos, timo y diferenciación/activación de células T/B. Sugirieron que esta expresión anormal podría estar asociada con los mecanismos de pérdida de regulación de genes disómicos implicados en los defectos inmunológicos observados en la trisomía 21³⁶.

En cuanto al síndrome de Klinefelter, existe un reporte de alteraciones en la expresión de miRNAs. Sui et al en 2012³⁹ informaron la toma de sangre periférica de 7 sujetos sanos y de 7 sujetos con el diagnóstico citogenético de síndrome de Klinefelter (47,XXY). Mediante secuenciación de alto rendimiento, identificaron 89 miRNAs expresados de forma anormal de todo el genoma (71 miRNAs sobre expresados y 18 sub expresados). Sugirieron que algunos miRNAs que se encuentran localizados en el cromosoma X (let-7f-2, miR-19b-2, miR-92a-2, miR-98, miR-105, miR-221, miR-222, miR-363, miR-374a, y miR-374b) están implicados en vías del funcionamiento cerebral y que pudieran relacionarse a la regulación de la inteligencia general, sin embargo, no los pudieron identificar en células mononucleares de sangre periférica, indicando que la expresión de miRNAs es variable entre el tiempo y el tejido utilizado³⁹.

miRNAs localizados en el Cromosoma X

El cromosoma X posee una alta densidad de miRNAs en comparación con el resto de los autosomas y con el cromosoma Y, en quien solo se han descrito 2 miRNAs. Se ha determinado la existencia de alrededor de 118 miRNAs en el cromosoma X (ver tabla 6, lo cual representa cerca del 7% del total de los miRNAs en el humano⁴⁰, sin embargo, la función de la mayoría de ellos aún permanece sin ser aclarada. De los miRNAs localizados en el cromosoma X, algunos se han relacionado con diversas patologías humanas como enfermedades autoinmunes, miopatías, discapacidad intelectual y alteraciones cardiovasculares, entre otras^{26,41}.

En la tabla 7 se observan diferentes patologías asociadas a miRNAs localizados en Xp11.2-pter (región cromosómica crítica que contiene a un grupo de genes que al estar en una sola dosis -haploinsuficiencia- origina el ST del cual ya se ha profundizado con anterioridad). Con base a lo anterior, nuestro equipo de investigación decidió explorar si existen diferencias en los perfiles de expresión de los 38 miRNAs localizados en este locus Xp11.2-pter que se muestran a continuación en figura 3.

Tabla 6. miRNAs localizados en el cromosoma X

ID	locus	ID2	Locus2	ID3	Locus3	ID4	Locus4
hsa-mir-3690-1	Xp22.32	hsa-mir-1468	Xq11.2	hsa-mir-450a-1	Xq26.3	hsa-mir-767	Xq28
hsa-mir-6089-1	Xp22	hsa-mir-223	Xq12	hsa-mir-450a-2	Xq26.3	hsa-mir-105-2	Xq28
hsa-mir-4770	Xp22.31	hsa-mir-676	Xq13.1	hsa-mir-542	Xq26.3	hsa-mir-3202-1	Xq28
hsa-mir-4767	Xp22.31	hsa-mir-421	Xq13.2	hsa-mir-503	Xq26.3	hsa-mir-3202-2	Xq28
hsa-mir-651	Xp22.31	hsa-mir-374b	Xq13.2	hsa-mir-424	Xq26.3	hsa-mir-718	Xq28
hsa-mir-548ax	Xp22.2	hsa-mir-374c	Xq13.2	hsa-mir-934	Xq26.3	hsa-mir-6858	Xq28
hsa-mir-6086	Xp22	hsa-mir-545	Xq13.2	hsa-mir-504	Xq26.3	hsa-mir-664b	Xq28
hsa-mir-548am	Xp22.2	hsa-mir-374a	Xq13.2	hsa-mir-505	Xq27.1	hsa-mir-1184-1	Xq28
hsa-mir-4768	Xp22.13	hsa-mir-384	Xq21.1	hsa-mir-320d-2	Xq27.1	hsa-mir-1184-2	Xq28
hsa-mir-23c	Xp22.12	hsa-mir-325	Xq21.1	hsa-mir-892c	Xq27.3	hsa-mir-1184-3	Xq28
hsa-mir-6134	Xp22	hsa-mir-4328	Xq21.1	hsa-mir-890	Xq27.3		
hsa-mir-4666b	Xp21.2	hsa-mir-548i-4	Xq21.1	hsa-mir-888	Xq27.3		
hsa-mir-3915	Xp21.1	hsa-mir-1321	Xq21.1	hsa-mir-892a	Xq27.3		
hsa-mir-548f-5	Xp21.1	hsa-mir-361	Xq21.2	hsa-mir-892b	Xq27.3		
hsa-mir-548aj-2	Xp21.1	hsa-mir-548m	Xq21.33	hsa-mir-891b	Xq27.3		
hsa-mir-3937	Xp11.4	hsa-mir-548an	Xq22.3	hsa-mir-891a	Xq27.3		
hsa-mir-1587	Xp11.4	hsa-mir-6087	Xq23	hsa-mir-513c	Xq27.3		
hsa-mir-221	Xp11.3	hsa-mir-652	Xq23	hsa-mir-513b	Xq27.3		
hsa-mir-222	Xp1.23	hsa-mir-3978	Xq23	hsa-mir-513a-1	Xq27.3		
hsa-mir-4769	Xp11.23	hsa-mir-4329	Xq23	hsa-mir-513a-2	Xq27.3		
hsa-mir-532	Xp11.23	hsa-mir-764	Xq23	hsa-mir-506	Xq27.3		
hsa-mir-188	Xp11.23	hsa-mir-1912	Xq23	hsa-mir-507	Xq27.3		
hsa-mir-500a	Xp11.23	hsa-mir-1264	Xq23	hsa-mir-508	Xq27.3		
hsa-mir-362	Xp11.23	hsa-mir-1298	Xq23	hsa-mir-514b	Xq27.3		
hsa-mir-501	Xp11.23	hsa-mir-1911	Xq23	hsa-mir-509-2	Xq27.3		
hsa-mir-500b	Xp11.23	hsa-mir-448	Xq23	hsa-mir-509-3	Xq27.3		
hsa-mir-660	Xp11.23	hsa-mir-1277	Xq24	hsa-mir-509-1	Xq27.3		
hsa-mir-502	Xp11.23	hsa-mir-766	Xq24	hsa-mir-510	Xq27.3		
hsa-mir-8088	Xp11.23	hsa-mir-3672	Xq24	hsa-mir-514a-1	Xq27.3		
hsa-mir-6895	Xp11.23	hsa-mir-363	Xq26.2	hsa-mir-514a-2	Xq27.3		
hsa-mir-6894	Xp11.23	hsa-mir-92a-2	Xq26.2	hsa-mir-514a-3	Xq27.3		
hsa-mir-6857	Xp11.23	hsa-mir-19b-2	Xq26.2	hsa-mir-2114	Xq28		
hsa-mir-98	Xp11.22	hsa-mir-20b	Xq26.2	hsa-mir-4330	Xq28		
hsa-let-7f-2	Xp11.22	hsa-mir-18b	Xq26.2	hsa-mir-224	Xq28		
hsa-mir-4536-1	Xp11.21	hsa-mir-106a	Xq26.2	hsa-mir-452	Xq28		
hsa-mir-4536-2	Xp11.22	hsa-mir-450b	Xq26.3	hsa-mir-105-1	Xq28		

Datos obtenidos de www.mirbase.org Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014 42:D68-D73.

Tabla 7.- Enfermedades relacionadas a miRNAs localizados en Xp11.2-pter

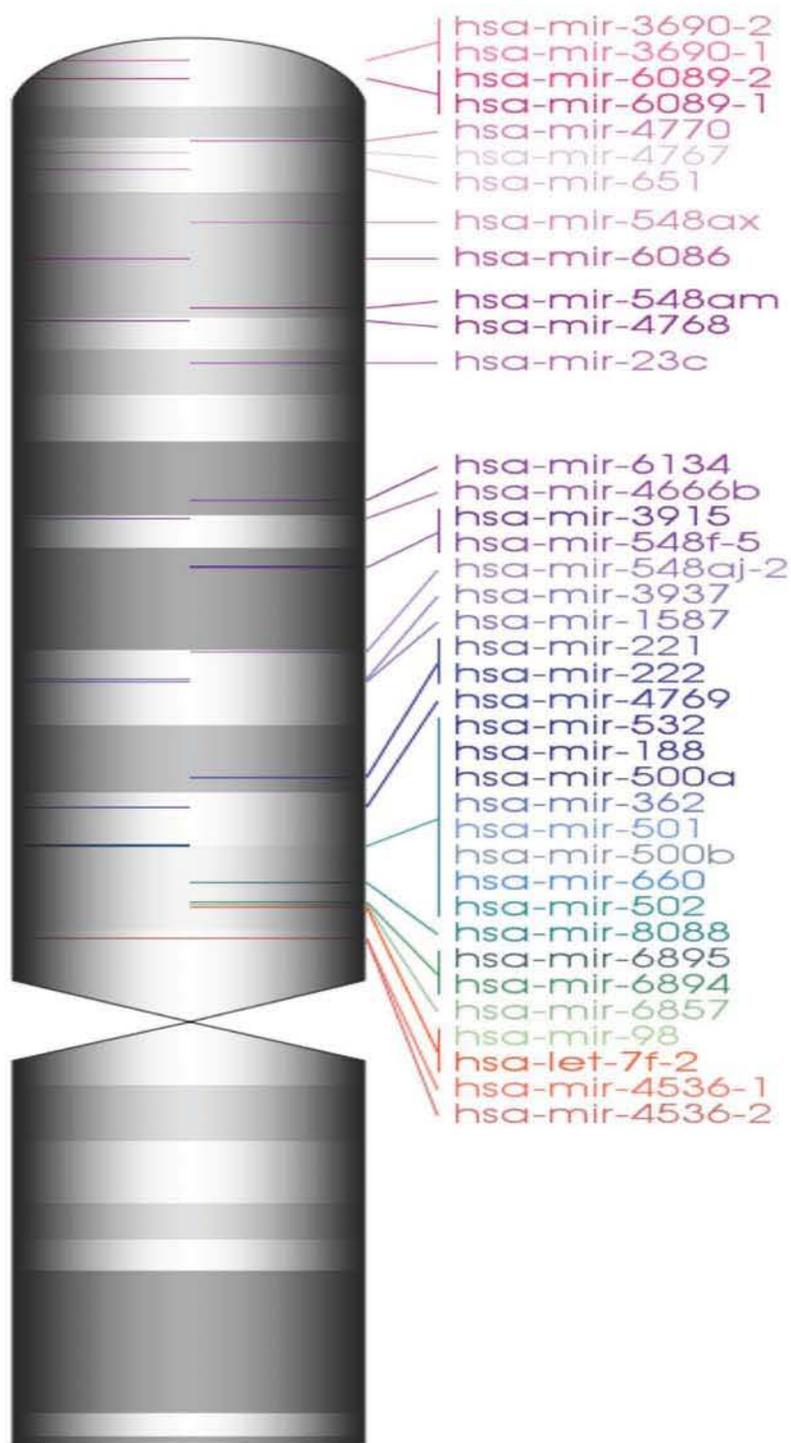
ID	locus	ALTERACIONES	Alteraciones cardiovasculares	Exp
mir-222	Xp11.23	Cardiovasculares	Hipertrofia cardiaca Enfermedad arterial coronaria	A A
		Musculares	Distrofia muscular de cinturas 2ª Miopatía de Miyoshi Miopatía de Nemalina Distrofia muscular de Duchenne Distrofia muscular fasciescapulohumeral	A A A A A
		Autoinmunes	Polimiositis Dermatomiositis Miositis por inclusión de cuerpos Lupus	A A A A
		Otras	Epilepsia Fibrosis hepática	D A
mir-98	Xp11.22	Otras	Colitis ulcerativa	A
mir-362	Xp11.23	Musculares	Miopatía Miyoshi Miopatía Nemalina Distrofia muscular de cinturas 2A	A A A
		Autoinmunes	Dermatomiositis Polimiositis	A A
		Otras		
mir-501	Xp11.23	Cardiovasculares		
		Musculares	Miopatía Nemalina Distrofia muscular de cinturas 2A	A A
		Autoinmunes	Dermatomiositis Polimiositis	A A
mir-500a	Xp11.23	Autoinmunes	Nefritis lúpica Disfunción diastólica	D D
mir-500b	Xp11.23	Autoinmunes	Nefritis lúpica Disfunción diastólica	D D
mir-221	Xp11.3	Cardiovasculares	Enfermedad arterial coronaria Cardiomiopatía hipertrófica	A A
		Musculares	Distrofia muscular de Duchenne Distrofia muscular de Becker Distrofia muscular fasciescapulohumeral Distrofia muscular de cinturas 2ª Miopatía Miyoshi Miopatía Nemalina	A A A A A A

A=Aumentado

D=Disminuido

Datos obtenidos de www.mirbase.org Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014 42:D68-D73.

Figura 3.- 38 miRNAs localizados en Xp11.2-pter



Datos obtenidos de www.mirbase.org Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014 42:D68-D73.

Posterior a una revisión actual de la literatura internacional, nos percatamos que el autor Rajpathak y colaboradores en 2017⁴², utilizaron células de fibroblastos humanos no transformadas para búsqueda de diferencias en los perfiles de metilación del DNA y en expresión de miRNAs, tanto autosómicos como localizados en el cromosoma X. Realizaron un análisis de secuenciación masiva NGS (Next Generation Sequence) en líneas celulares 45,X, 46,XX y 47,XXX⁴². Demostraron que el transcrito XIST no se expresa en células 45,X, que existe una expresión moderada en 46,XX y muy alta en 47,XXX ($p < 0.005$), esto debido a que el único cromosoma X presente en 45,X estaría activo, habría uno inactivo en 46,XX y dos de ellos en 47,XXX⁴².

Informaron que 9 miRNAs se encontraron expresados de forma diferencial entre las líneas analizadas, mismos que regulan a 135 genes también expresados diferencialmente, de ellos, 69 mostraron una sobre expresión y 66 sub expresión en 45,X vs 46,XX. El análisis funcional bio informático reveló que estos genes están implicados en diversos procesos biológicos como la regulación de la osificación, diferenciación osteoclástica, desarrollo embrionario de los ovarios, adiposidad y regulación de la proteína SMAD⁴².

Algunos ejemplos de genes autosómicos que mostraron una expresión alterada y que participan en funciones relevantes afectadas en mujeres con ST fueron; *BMP2* y *BMPER* para remodelado óseo, *IGF2* en señalización de la insulina, *CLDN11*, *FOXL2* e *INHBB* para el desarrollo gonadal. Por primera vez se demostró que existen diferencias en la expresión de miRNAs en fibroblastos humanos no transformados con la monosomía del cromosoma X⁴².

Métodos de Análisis de miRNAs

En general existen tres métodos para el análisis de la expresión de miRNAs:

La PCR-Transcripción Reversa Cuantitativa (qRT-PCR) se utiliza para la cuantificación absoluta de los miRNAs, es un método de fácil aplicación si se cuenta con un laboratorio que lleve a cabo la técnica de PCR en tiempo real, además pueden analizarse en paralelo diferentes muestras en la misma reacción (mismo experimento y condiciones), por lo que existe un menor número de variaciones en esta técnica. Una de sus ventajas es ser un método muy estable, además de su sensibilidad y

especificidad. Su desventaja es que no puede identificar nuevos miRNAs o variantes no determinadas de forma previa y que no permite una evaluación amplia o masiva⁴³.

La secuenciación masiva (high-throughput) (como RNA-seq): es una metodología muy cara que requiere un alto sistema computacional, permite identificar de forma masiva miRNAs ya conocidos y nuevos, también realiza una cuantificación absoluta, sin embargo, en ocasiones puede detectar otros RNAs pequeños o incluso más cortos que no corresponden a miRNAs o potenciales miRNAs que podría generar confusión al momento de su análisis⁴³.

Los métodos de hibridación (microarreglos y Northern blot): Son técnicas que permiten evaluar la expresión de miRNAs de manera masiva a un menor costo, pero tiene menor especificidad que qRT-PCR y es difícil llevar a cabo cuantificación absoluta y no detecta nuevos miRNAs. La unión de cada miRNA a su sonda (dispuesta en un "spot" o círculo en el microarray) produce una intensidad de fluorescencia que es directamente proporcional al nivel de expresión de ese gen, una vez escaneado el microarreglo hibridado y procesada la imagen obtenida, se genera la matriz de expresión sobre la que se realiza el análisis de datos. La principal aplicación es comparar de forma masiva cuantificaciones relativas de miRNAs específicos entre dos muestras como en nuestro proyecto, los resultados obtenidos requieren validación por qRT-PCR⁴³.

JUSTIFICACIÓN

Según la Guía de Práctica Clínica Diagnóstico, Tratamiento y Cuidado de la Salud en niñas y mujeres con síndrome de Turner (SSA, 2012) esta entidad nosológica es una de las anomalías cromosómicas sexuales más frecuentes en los seres humanos pues tiene una incidencia aproximada de 1 por cada 2,500 productos nacidos vivos del sexo femenino y las principales alteraciones clínicas observadas en niñas y mujeres con esta condición incluyen: talla baja que requiere administración de hormona del crecimiento, disgenesia gonadal que conlleva a pubertad retrasada, mayor riesgo de osteoporosis y afección grave del pronóstico reproductivo, defectos cardiovasculares congénitos como: elongación del arco transversal (49%), válvula aórtica bicúspide (30%) y coartación de la aorta (12%) que eleva la tasa de mortalidad cardiovascular en la etapa adulta, además de un incremento en la incidencia de enfermedades metabólicas y autoinmunitarias como; hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 1 y 2, obesidad, dislipidemia, enfermedad celíaca y tiroidea. Existe una alta variabilidad de la expresión de las manifestaciones clínicas del ST y no se ha logrado establecer una correlación genotipo-fenotipo concreta, es decir, no es posible asociar la presencia de ciertas características y complicaciones clínicas con un resultado de cariotipo en particular, está bien establecido que la haploinsuficiencia de genes codificantes localizados en la región cromosómica Xp11.2-pter (escapan a inactivación del cromosoma X) es la principal causa del ST, aún no se ha explorado a profundidad la posible participación de otros mecanismos de regulación de la expresión génica postranscripcional. Uno de ellos corresponde a la función de pequeñas moléculas de RNA llamadas microRNAs (miRNAs). Nuestro grupo de investigación considera de interés científico realizar un abordaje molecular inicial para establecer si existen diferencias en el perfil de expresión de miRNAs en niñas con ST (45,X) y sin este diagnóstico (46,XX sanas) para en el futuro proponer un diseño metodológico adecuado que permita conocer si pudieran estar implicados de forma directa en el fenotipo de las mujeres afectadas, efectuar esta primera aproximación molecular al fenómeno biológico representaría un avance en el conocimiento y podría abrir una nueva línea de investigación médica en nuestro medio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen trabajos de investigación recientes que describen diferencias en los perfiles de expresión de miRNAs en síndromes cromosómicos frecuentes como el síndrome de Down, el síndrome de Klinefelter y recientemente en fibroblastos humanos no transformados con fórmula 45,X, pero aún no se ha explorado si la participación de genes no codificantes como los de los miRNAs localizados en la región crítica del síndrome de Turner (Xp11.2-pter) en sangre periférica de pacientes con esta condición pudieran tener una posible implicación como moléculas reguladoras de la expresión génica en niñas con este diagnóstico y sin el, es por ello que surge la siguiente pregunta de investigación;

Pregunta de investigación.

En niñas de 6-16 años de edad con el diagnóstico de ST (45,X) en comparación con niñas (6-16 años) sin el diagnóstico de ST (46,XX):

1.- ¿Cuáles son las diferencias en el perfil de expresión de los micro RNAs (miRNAs) localizados en Xp11.2-pter?

Hipótesis de Estudio

En niñas de 6-16 años de edad con el diagnóstico de ST (45,X) en comparación con niñas (6-16 años) sin el diagnóstico de ST (46,XX):

1.- Existirá una disminución en la expresión de al menos uno de los 38 miRNAs localizados en Xp11.2-pter por efecto de dosis génica (haploinsuficiencia).

Objetivo

En niñas de 6-16 años de edad con el diagnóstico de ST (45,X) en comparación con niñas (6-16 años) sin el diagnóstico de ST (46,XX):

1.-Medir y comparar las diferencias en la expresión de los 38 miRNAs localizados en Xp11.2-pter (arreglo de Applied Biosystems™ GeneChip™ miRNA 4.0 Array).

Objetivo Secundario

1.-Explorar los blancos validados y potenciales de los miRNAs que muestren diferencias en la expresión entre los sujetos de estudio (Subexpresados o sobre expresados) mediante los software´s miRBase, PITA y targetScan.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar donde se desarrolló el estudio:

UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS.

Diseño del estudio:

Por la maniobra del Investigador.-	Observacional.
Por el número de mediciones.-	Transversal.
Por la recolección de los datos.-	Prolectivo.
Por el número de grupos.-	Comparativo.

Población de estudio: Niñas de 6-16 años de edad atendidas en el servicio de Genética Médica y/o Endocrinología Pediátrica del Hospital de Pediatría de CMN Siglo XXI por diagnóstico de ST y niñas de 6-16 años de edad que no cursen con el diagnóstico de ST.

Niñas con diagnóstico de ST

Criterios de Inclusión.-

- 1.-Edad de 6 a 16 años (se decidió este rango de edad por ser el que más frecuentemente acude a consulta del servicio de genética según la base de registro propia, además de ser la fecha límite permitida para atención en nuestro hospital).
2. Con el diagnóstico citogenético de ST por cariotipo en sangre periférica, (45,X) en una lectura de al menos 30 metafases.
3. Que hubieren aceptado participar en el estudio firmando carta de asentimiento (mayores de 8 años) y consentimiento informado por los padres o tutor en su caso.

Criterios de Exclusión.-

- 1.-Que cursen con condiciones patológicas no reconocidas clásicamente como parte del espectro clínico de ST, es decir, otras enfermedades no relacionadas al diagnóstico.
- 2.-Que se encuentren bajo tratamiento con somatropina (hormona del crecimiento).

Criterios de Eliminación.-

- 1.-Muestra insuficiente o contaminada y que se determine imposibilidad para una nueva toma.
- 2.-Aquellos sujetos incluidos que posterior a la firma del consentimiento decidan retirarse del estudio (se eliminará el espécimen biológico recolectado).

Niñas sin el diagnóstico de ST

Criterios de Inclusión.-

- 1.- De 6 a 16 años de edad.
2. Aparentemente sanas (en historia clínica y exploración física por el investigador principal y/o equipo de genética del Hospital de Pediatría). Fueron invitadas a participar vecinas del caso índice, compañeras de clase de pacientes de la consulta externa de genética y endocrinología en quienes se demostró por historia clínica y

exploración física ausencia de un diagnóstico sindromático en particular. Para cada caso se buscó emparejar por la misma edad en años de la niña sana.

3. Con resultado de cariotipo en sangre periférica 46,XX en lectura de 30 metafases.

4. Que hubieran aceptado participar en el estudio con firma de carta asentimiento informado (mayores de 8 años) y consentimiento informado por el padre o tutor.

Criterio de Exclusión.-

1.- Que se establezca una fórmula cromosómica diferente en el cariotipo.

Criterios de eliminación.-

1.-Muestra insuficiente o contaminada y que se determine imposibilidad para una nueva toma.

2.-Aquellos sujetos incluidos que posterior a la firma del consentimiento hubieran decidido retirarse del estudio (se eliminará el espécimen biológico recolectado).

VARIABLES

Variable Dependiente.- Nivel de Expresión de miRNAs

Definición Conceptual.- Nivel de hibridación entre la sonda específica del microarreglo y el miRNA blanco que emite una intensidad de fluorescencia cuantificable mediante un análisis de imagen. La intensidad de la hibridación está representada por la cantidad de emisión fluorescente, lo cual determina un estimado de la cantidad de expresión relativa del miRNA analizado^{43, 44}.

Definición Operacional.- Para nuestro trabajo de investigación la expresión del miRNA se definió al obtener las intensidades de hibridación de acuerdo a la herramienta miRNA QC del software, así como las intensidades de fluorescencia que se cuantifican y analizan con el software Genechip operating software (Affymetrix), los datos crudos se normalizan para eliminar variaciones mediante el método RMA (Robust Multi-array Average), mediante un modelo lineal y distribución normal en escala logarítmica. A partir de las intensidades normalizadas se identifican los miRNAs con expresión diferencial con un punto de corte de al menos 1.5 y 2 veces de cambio (fold change, FC > ± 1.5 y ± 2) entre las pacientes con síndrome de Turner (45,X) y niñas sin síndrome de Turner (46,XX) y los miRNAs expresados

diferencialmente detectados mediante la prueba t, los consideramos significativos desde el punto de vista estadístico cuando el valor de p sea <0.05 .

Escala de medición.- Cuantitativa Continua

Unidad de Medición.- Unidades de fluorescencia que reflejan el nivel de expresión relativa del miRNA.

Variable Independiente.- Síndrome de Turner (45,X), Grupos de estudio.

Definición conceptual.- constelación de manifestaciones clínicas en individuos del sexo femenino ocasionada por la monosomía parcial o total de un cromosoma X con o sin mosaicismo y que se confirma mediante estudio citogenético convencional (cariotipo)⁹.

Definición Operacional.- Para fines del protocolo, resultado de cariotipo 45,X en 30 metafases de células de sangre periférica en niñas con diagnóstico de ST y resultado de cariotipo 46,XX en niñas sin el diagnóstico de ST en el mismo número de metafases según lo establecido por Hook⁴⁶.

Escala de medición.- Categórica, dicotómica

Unidad de medición.- 1= Sí 2= No

Variabes Descriptoras.-

Edad.-

Definición conceptual: tiempo que ha vivido una persona, animal o vegetal (<http://rae.es.drae/>).

Definición operacional: se registró la edad expresada en años al momento de la firma del consentimiento informado.

Tipo de variable: cuantitativa

Unidad de medición: discontinua (años cumplidos al momento de la inclusión).

Cardiopatía congénita.-

Definición Conceptual: Anormalidad del desarrollo que involucra estructuras cardiacas que está presente al momento del nacimiento pero que puede ser

diagnosticada de forma tardía en la vida. Definición conceptual tomada de Términos MeSH. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Definición Operacional: Antecedente de cardiopatía congénita diagnosticada por el servicio de cardiología pediátrica descrita en el expediente electrónico hospitalario.

Tipo de Variable: Nominal, dicotómica

Unidad de Medición: Ausente=0 Presente=1

Linfedema congénito.-

Definición Conceptual: Edema presente en tejidos blandos debido a obstrucción de los vasos linfáticos o desórdenes de los nódulos linfáticos. Términos MeSH. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Definición Operacional: Antecedente de edema congénito de tejidos blandos presente en manos, pies u otra región corporal descrito en expediente clínico.

Tipo de variable: Nominal dicotómica

Escala de medición: Ausente=0 Presente=1

Enfermedad Autoinmune.-

Definición conceptual: Enfermedades caracterizadas por la producción de anticuerpos que reaccionan con tejidos del hospedero o de células inmunitarias efectoras que son auto-reactivas a péptidos endógenos.

Definición operacional: Antecedente de alguna entidad clínica autoinmune descrita en el expediente hospitalario.

Tipo de variable: Nominal dicotómica.

Unidad de medición: Ausente=0 Presente=1

Datos fenotípicos característicos del ST.-

Definición conceptual.-Conjunto de características clínicas encontradas al momento de la evaluación dismorfológica en un sujeto con el diagnóstico de ST.

Definición operacional.- Se realizó exploración física dismorfológica al momento de la firma de consentimiento y/o asentimiento informado tratando de identificar el conjunto de hallazgos dismorfológicos característicos del ST.

Escala de medición: nominal

Unidad de medición.- Sí=1 No=0

DISEÑO MUESTRAL.-

Por plausibilidad biológica relacionada a efecto de dosis génica (haploinsuficiencia de genes localizados en Xp11-pter que supone expresión de miRNA <50%) en pacientes con Turner en comparación con las controles se calculó un tamaño de muestra para diferencia de medias entre dos grupos independientes resultando 7 niñas por grupo.

Muestreo.- Tipo de Muestreo.- No probabilístico de casos consecutivos (criterios de inclusión).

Técnica de Recolección de la Muestra.-

Actividades Específicas del Alumno de Maestría

El alumno de maestría acudió los días programados de la consulta externa de genética (consultorio 6 y 7 del primer piso de consulta externa del Hospital de Pediatría) para evaluar a las niñas que pudieran ser incluidas en el estudio, explicó ampliamente en qué consiste el mismo una vez que su médico tratante hubiera terminado la consulta y se realizó en un lugar exclusivo para ello, en caso de haber aceptado, se procedió a obtener la firma del consentimiento informado del padre o tutor y de asentimiento informado del sujeto de estudio, se identificó la edad de la participante con la finalidad de buscar el control con el mismo número de años cumplidos a la fecha del ingreso. En ese mismo momento se preguntó acerca de vecinas o compañeras de clase que potencialmente pudieran ser invitadas a participar como controles, se tomaron los datos de contacto y se citó exclusivamente para explicar en qué consistiría su participación.

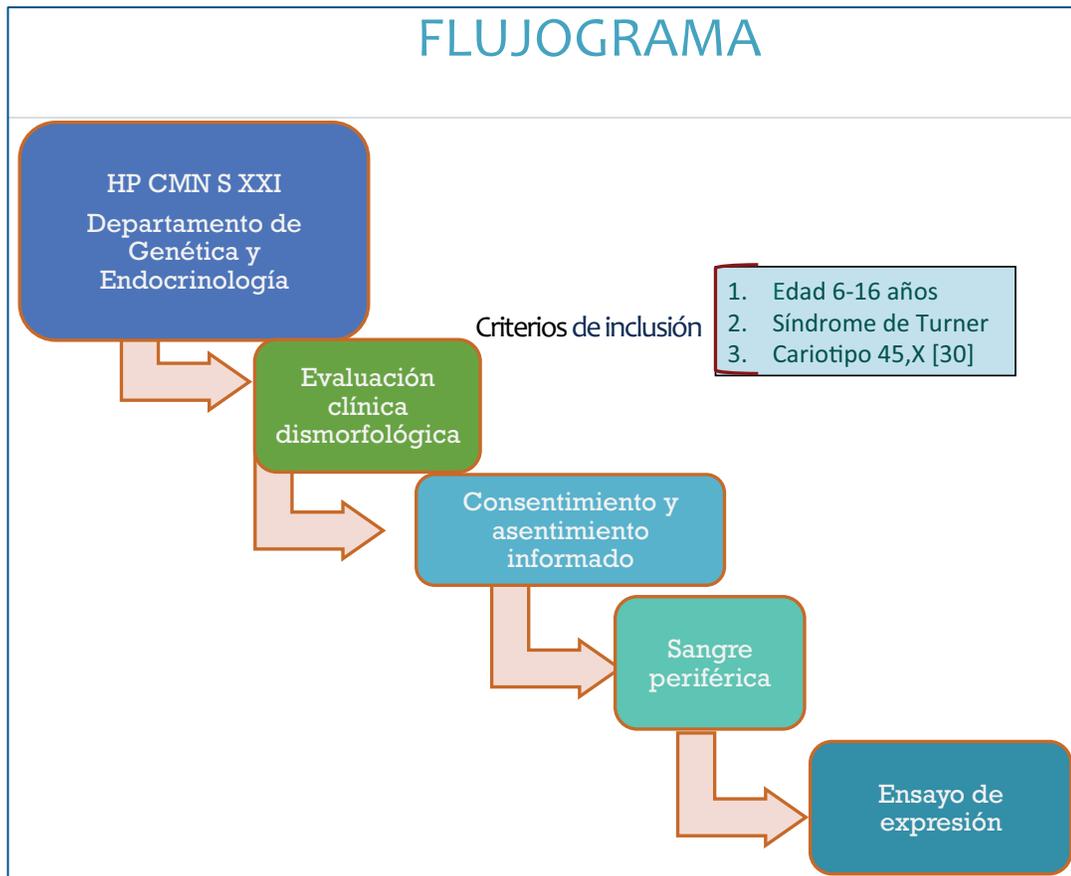
El alumno de maestría acudió de forma periódica a la consulta externa de endocrinología pediátrica para la búsqueda de sujetos de investigación que pudieran haber sido elegibles, se contactó al padre o tutor y se explicó cada uno de los riesgos y beneficios y en caso de aceptar se otorgó cita para firma de consentimiento informado cuyo procedimiento fue similar a lo redactado con anterioridad.

Reclutamiento de las niñas con ST

Una vez que se identificó a una niña entre 6-16 con diagnóstico confirmado de ST por cariotipo 45,X en 30 metafases atendida en servicio de Genética y/o Endocrinología, se invitó a participar en el estudio con firma de carta de consentimiento/asentimiento informado:

- 1.- Se Recabaron datos personales como nombre, afiliación, edad, fecha y lugar de nacimiento, dirección y teléfono actuales (la identidad se ha resguardado según carta de consentimiento informado, ver “Anexos”).
- 2.-Llenado de la hoja de recolección de datos (hoja de recolección, ver “Anexos”). Nos apoyamos en el expediente clínico integrado en el Hospital de Pediatría.
- 3.- Se tomó muestra de sangre de 3 mL y se procedió a la extracción de RNA total y almacenamiento ac-20C° en ultracongelador ubicado en UIMGH Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI hasta completar el tamaño de la muestra para la determinación de la expresión de los miRNAs. Ver proceso de reclutamiento en figura 4.

Figura 4.-Flujograma para el ingreso al proyecto de investigación de niñas con ST (45,X).



Reclutamiento de las niñas sin ST

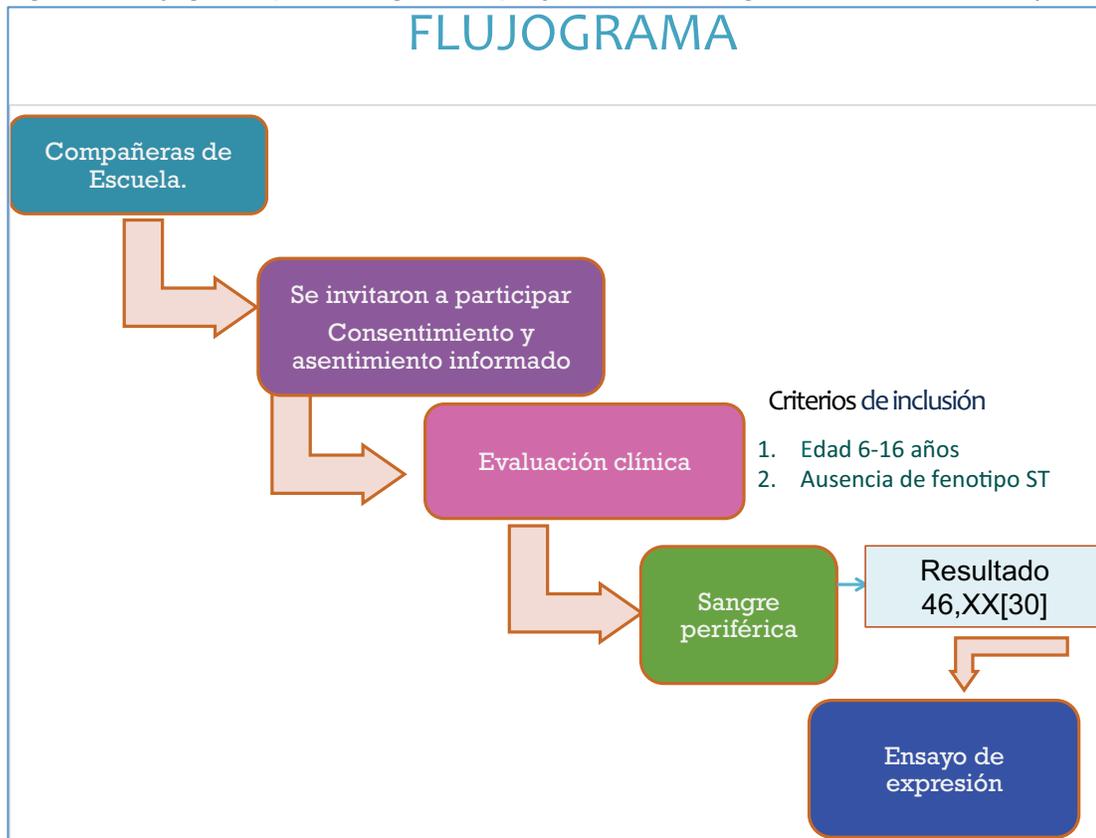
En las 7 niñas sanas invitadas a participar se realizó historia clínica que incluyó exploración física completa para descartar anomalías morfológicas mayores y menores, en todas se concluyó que eran sanas y no se integró ningún diagnóstico sindromático. Se corroboró resultado de cariotipo 46,XX en 30 metafases analizadas realizado por colaboradora de Unidad de Investigación en Genética Humana del Hospital y se explicó en consulta *ex profeso* junto a sus padres, la interpretación del estudio, se informó ausencia de alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales visibles en la resolución de 400 bandas con técnica GTG.

Con previa firma de carta de consentimiento/asentimiento informado:

- 1.- Se Interrogaron datos personales como nombre, afiliación (en caso de ser derechohabiente), edad, fecha y lugar de nacimiento, dirección y teléfono actuales (solo para base de datos, la identidad será respetada según lo establecido en carta de consentimiento informado, ver "Anexos").
- 2.- Llenado de la hoja de recolección de datos que incluye información de la exploración física; peso, talla y la descripción general del aspecto externo.
- 3.- Se explicó el significado del cariotipo así como los posibles resultados que de él pudieran obtenerse (si hubiera presentado un resultado diferente al esperado de 46,XX recibirían un asesoramiento genético integral por el investigador principal).
- 4.- Se tomó una muestra de sangre de 6 mL, 3 mL fueron utilizados para realizar el cariotipo por el personal de la Unidad de Investigación en Genética Humana (citogenetista colaboradora). Con los segundos 3 mL de sangre obtenida se procedió a la extracción de RNA total de acuerdo a los métodos técnicos y se almacenó a -20C° hasta esperar se confirmara el resultado del cariotipo 46,XX.

En caso de que el resultado hubiera sido diferente, el sujeto se excluiría del estudio y se desecharía la muestra sin realizarse medición de la expresión relativa de los miRNAs. La figura 5 resume en un flujograma el proceso de ingreso al proyecto de las niñas sanas.

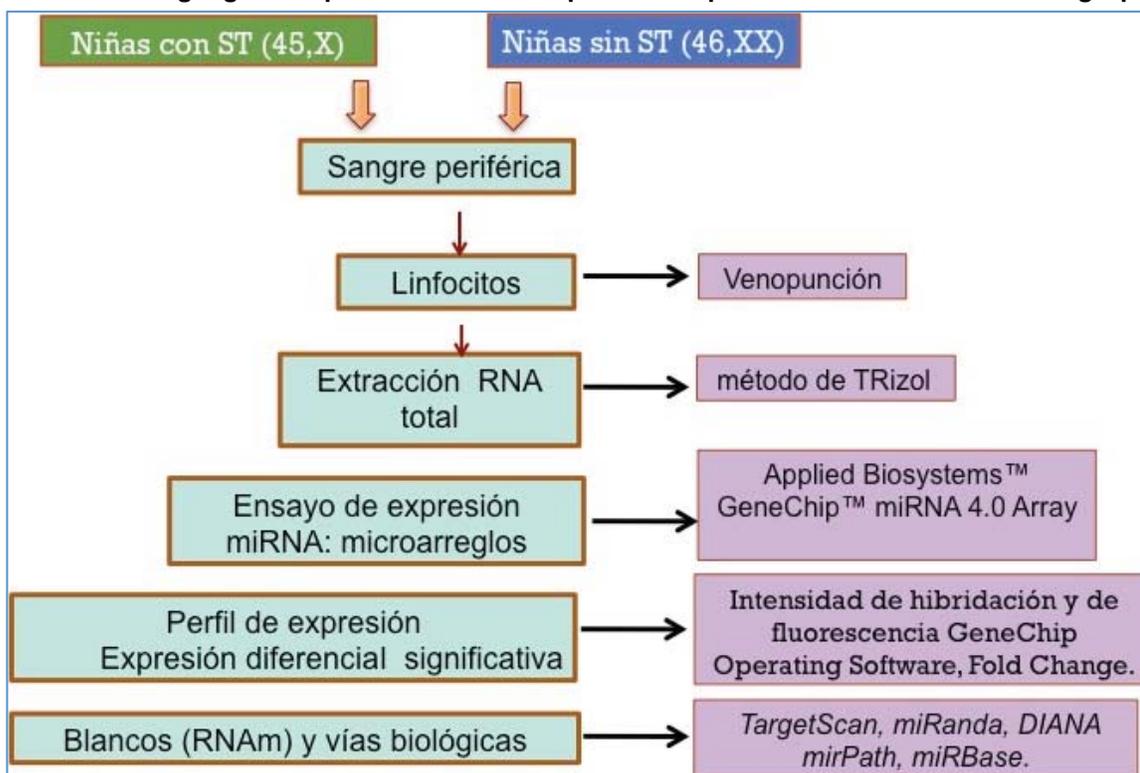
Figura 5.-Flujograma para el ingreso al proyecto de investigación de niñas sanas (46,XX).



Procedimientos generales

Toma de muestra: Extracción y colección de sangre periférica a través de punción en vena periférica para obtener 3 ml de sangre periférica, y se colocó inmediatamente en tubos BD vacutainer TM K3 EDTA de 5 ml. Se homogenizó la sangre con el EDTA y se procedió al aislamiento de RNA, para los sujetos con el diagnóstico de ST (45,X). Para las niñas sanas se tomaron de la misma punción venosa una muestra de 3 mL para la determinación de miRNAs y otros 3 mL para realizar el cariotipo y confirmar 46,XX en UIMGH del mismo Hospital de Pediatría. En caso de que la fórmula cromosómica hubiera mostrado un resultado diferente a este, sería excluida, con la propuesta a los padres de asesoramiento genético integral que de ser aceptado sería otorgado por el investigador principal. En figura 6 se muestra el proceso que se llevó a cabo para la toma de muestra de las niñas con ST (45,X) y las niñas sanas (46,XX) así como la forma en la que se procedió hasta realizar el perfil de expresión de los miRNAs y la búsqueda de las vías biológicas relacionadas a cada uno de los miRNAs expresados diferencialmente entre los grupos analizados.

Figura 6.- Estrategia general para obtención del perfil de expresión de miRNAs entre los grupos.



Métodos Técnicos

Obtención de RNA total

Se colocaron 3 ml de Ficoll-Plaque™ PLUS en tubo de ensayo de cristal de 13x10mm nuevo, se agregaron 2 ml de sangre periférica en la parte superior evitando una mezcla. Se centrifugó por 25 minutos a 1,500 rpm y con pipeta Pasteur se recolectaron los leucocitos y se colocaron en tubo Eppendorf de 1.5 ml.

Se realizó la extracción de RNA total a partir de células de sangre periférica con el método de TRizol. Para ello, a partir de las células obtenidas y colocadas en tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se centrifugaron durante un minuto y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 500 µl de trizol y se agitó con la pipeta para lizar las células para después incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 40 µl de cloroformo, se mezcló vigorosamente por 15 segundos, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 50 µl de alcohol isopropílico, se mezcló e incubó a 4 °C por 10 minutos.

Se centrifugó posteriormente a 7500 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla formada se lavó en dos ocasiones con 500 μ l de alcohol etílico al 75 %, se mezcló y se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se resuspendió en 30 μ l de agua libre de RNAsas y se almacenó a -20 °C hasta procesar mediante microarreglos.

Se obtuvo su concentración mediante la cuantificación en nanodrop, para lo cual se colocó 1 uL del RNA obtenido y se determina el valor de la absorbancia a 260 y 280 nm, para obtener la concentración y la pureza. Se determinó la calidad del RNA mediante la evaluación de la integridad de las bandas de RNA en gel de electroforesis.

Ensayo de expresión de miRNAs

Un microarray de miRNAs consiste en una superficie sólida en la cual están fijadas una colección de sondas específicas que hibridan con los miRNAs diana con la finalidad de determinar el nivel de expresión de los mismos. Generalmente, el RNA de las muestras es marcado con un fluoróforo y a continuación hibridado con el chip de manera que el nivel de hibridación entre la sonda específica y el miRNA diana determinará una intensidad de fluorescencia cuantificable mediante un análisis de imagen. En este trabajo se realizó un análisis de expresión global del genoma de los miRNAs mediante un microarreglo llamado GeneChip® miRNA 4.0 Array Applied Biosystems™ que contiene 2,578 sondas para miRNAs maduros de *Homo sapiens*, entre ellos, los que se encuentran ubicados en Xp11.2-pter de acuerdo a miRBase versión 20, Ensemble versión 73 y miRtarbase versión 4.5. El cartucho físico donde se lleva a cabo la hibridación se muestra en figura 7.

Figura 7.- Chip o cartucho que contiene 2,578 sondas de miRNAs maduros.



En resumen, se prefirió usar este arreglo GeneChip® miRNA The Affymetrix Genechip miRNA 4.0 array por que ofrece un contenido actualizado que provee una cobertura para la búsqueda de todas las secuencias de miRNAs maduros del humano en miRBase versión 20, además los miRNAs pueden ser fácilmente analizados dado que el software ofrece la información de los genes blanco tanto predichos como validados así como la información de la manera en la que se agrupan entre sí.

Se realizó el ensayo de expresión mediante el microarreglo para cada una de las muestras de las pacientes con ST (45,X) y controles (46,XX). Se seleccionaron muestras para realizarse por duplicado para evaluar la reproducibilidad del experimento, a continuación el procedimiento.

Adición de cola de poli (A)

Para cada individuo incluido en el estudio, se utilizaron 500ng de RNA que se ajustaron a 8 ul por muestra, se agregaron 2ul de RNA Spike Control Oligos (*vial 8*) (volumen final 10ul). Se diluye la muestra de ATP mix (*vial 3*) en Tris 1mM en 1:500 Se prepara la mezcla maestra de adición de cola de poli A como se observa en la tabla, para cada reacción:

Reactivo	Vial	Vol 1 reacción (ul)
Buffer de reacción 10X	(<i>vial 1</i>)	1.5
MnCl2 25mM	(<i>vial 2</i>)	1.5
ATP mix diluido	(<i>vial 3 diluido</i>)	1
Enzima PAP	(<i>vial 4</i>)	1
TOTAL		5

Los 5ul de la mezcla maestra de adición de cola de Poli A se agregan a los 10ul de muestra (RNA/Spike Control Oligos), **para obtener un volumen final de 15ul**, se mezcla suavemente sin vórtex y se centrifuga brevemente para incubarse a 37°C por 15 minutos.

Ligamiento de flashtag biotina

Los 15ul del RNA con cola de poli A, se centrifugan brevemente, se agregan 4ul de **mezcla maestra de ligamiento FlashTag HSR 5X** (*vial 5*), 2ul de **T4 DNA ligasa** (*vial 6*), se mezclan suavemente sin vórtex, se centrifugan brevemente y se incuban a 25°C 30 minutos. Se detiene la reacción con 2.5ul de **Solución de paro HSR** (*vial 7*), mezclando suavemente y se centrifuga (volumen total de 23.5ul). A partir de esta muestra, se toman 2ul para evaluar el marcaje del RNA (ensayo **ELOSA QC**).

ELOSA

Cobertura de pozos con el ELOSA spotting oligos

Inicialmente se diluyen los oligos ELOSA Spotting (Vial 9) en PBS 1X a 1:50 y preparar en un tubo para cada muestra:

Reactivo	Vial	1 muestra
ELOSA Spotting Oligos	9	1.5ul
PBS 1X	-	73.5
TOTAL		75ul

Posteriormente se agregan los 75 ul a un pozo de placa para ELOSA para microarreglos y se cubre completamente con parafilm y se incuban toda la noche a 4°C (un pozo por muestra).

Lavado y bloqueo (ELOSA)

Los pozos se decantan (con los oligos y ELOSA Spotting), se lavan dos veces con 250ul de PBS 1X/0.02% Tween-20 agitando suavemente y se dejan secar. Luego se agregan 150 ul de BSA al 5% en PBS 1X a cada pozo, se cubren los pozos y se incuban 1 hora a temperatura ambiente.

Hibridación (ELOSA)

Para llevar a cabo la hibridación, se hace una mezcla de hibridación en tubos separados con 48ul de SSC 5X/0.05% SDS/0.005% BSA y 2.5ul de Dextrán sulfato al 25% para cada muestra, se agitan en el vórtex gentilmente hasta que el dextrán esté

en solución. Esta mezcla se agrega a cada muestra de RNA marcado (2ul), así como al control positivo (2ul del vial 10) y al control negativo (2ul de agua). Se agrega a esta mezcla uno de los siguientes, y se tendrá un volumen total de 52.5ul. Posteriormente se decanta la solución de bloqueo de los pozos y se deja secar. Luego se agregan los 52.5ul de solución de hibridación (ya con el RNA marcado) al pozo correspondiente, se cubre e incuba a temperatura ambiente por 1 hora.

Unión SA-HRP (ELOSA)

Previamente: Diluir SA-HRP (streptavidina) en BSA 5% en PBS 1X (si se usa SA-HRP Thermo Scientific, diluir 1:6000)

Para unir la estreptavidina-HRP, se decanta la solución de hibridación de cada pozo, se lavarán 3 veces con 250ul PBS1X/Tween-20 0.02% agitando suavemente y se deja secar. Posteriormente se agregan los 75ul de estreptavidina-HRP *en BSA 5% (diluido en PBS 1X)* cada pozo, se cubre e incuba 1 hora a temperatura ambiente

Desarrollo de señal (ELOSA)

Se decanta la solución con estreptavidina-HRP de cada pozo, y se realizan tres lavados con 250ul PBS 1X/ Tween-20 0.002% agitando suavemente y dejando secar. Luego se agregan 100ul de sustrato TMB a cada pozo, se cubren e incuban 15-30 minutos a temperatura ambiente y sin luz y se visualiza el color azul que corresponde a un resultado positivo.

Registro de archivos

Se descarga e instala el software *miRNA Array Library* en la consola de comando *Affymetrix GeneChip (AGCC)*, el horno de hibridación (*Affymetrix Hybridization Oven 645*) se programa a 48°C, a 60rpm al menos una hora, y se agrega la información de las muestras del microarreglo correspondiente (nombres, códigos, etc.).

Los chips se dejan a temperatura ambiente por al menos 15 minutos y se etiquetan. Posteriormente se inserta una punta de 200ul en el septum de arriba a la derecha (para la ventilación del coctel de hibridación que se inyecte).

Hibridación del microarreglo

Para llevar a cabo la hibridación, se calienta el control de hibridación a 65°C por 5 minutos y posteriormente se prepara la mezcla maestra **de hibridación como se muestra en la siguiente tabla:**

Reactivo	Vol miRNA 4.0 (ul)1R	Concentración final
Mezcla de hibridación 2x	66	1X
Formamida 27.5% (vial 12)	19.2	4%
DMSO	12.8	9.7%
Control de hibridación 20X	6.6	1X
Oligo B2 control 3nM	2.2	50pM
Agua	3.7	
Vol. total	110.5	

Posteriormente se agregan los 110.5ul de la mezcla maestra **de hibridación** a los 21.5 ul del **RNA marcado**, se incuban por 5 minutos a 99°C y posteriormente 5 minutos a 45°C. De esta mezcla, se inyectan 130ul al chip, se retira la punta de la pipeta previamente colocada en el **septum superior y a la derecha**, se cubren los dos **septos** con etiquetas para evitar evaporado y/o prevenir fugas. Luego se coloca el chip en el horno de hibridación, se incuba a 48°C a 60 rpm por 18 horas.

Lavado y tinción

Pasadas las 18 horas en el horno de hibridación, se retiran los chips del horno, se quitan las etiquetas, se extrae la mezcla maestra **de hibridación** de cada arreglo y se almacena en hielo o a -80°C en un tubo nuevo. Posteriormente se llena completamente cada chip con **Buffer Array Holding**, se permite llegar a temperatura ambiente antes del lavado y tinción. Luego se colocan los tubos de Cocktail de tinción 1 y 2 y el Buffer Array Holding en la estación de fluidos (en el contenedor de muestras), como sigue:

- a. Colocar un vial (ámbar) con 600ul del cocktail de tinción 1 (contenedor de muestras 1)
- b. Colocar un vial (claro) con 600 ul de cocktail de tinción 2 (contenedor de muestras 2)
- c. Colocar un vial (claro) con 800ul de Buffer Array Holding (contenedor de muestras 3)

Se lava y tiñe con la estación de fluidos de acuerdo al formato del arreglo (**Protocolo de estación de fluidos FS450_0002, formato de arreglo 100**), como se describe en la siguiente tabla;

Paso	Reactivo	Protocolo de estación de fluidos FS450_0002 (100 format array)
1	Lavado 1 Post-hibridación	10 ciclos de 2 mezclas/ciclos con buffer de lavado A a 30°C
2	Lavado 2 Post-hibridación	6 ciclos de 15 mezclas/ciclo con buffer de lavado B a 50°C
3	Primera tinción	Tinción del arreglo hibridado por 5 minutos con cocktail de tinción 1 (vial posición 1) a 35°C
4	Lavado post-tinción	Lavar 10 ciclos de 4 mezclas/ciclo con buffer de lavado A 30°C
5	Segunda tinción	Teñir el arreglo hibridado por 10 minutos con cocktail de tinción 2 (Posición vial 2) a 35°C
6	Tercera tinción	Teñir el arreglo hibridado por 5 minutos con cocktail de tinción 1 (posición vial 1), a 35°C
7	Lavado final	15 ciclos de 4 mezclas/ciclo con buffer de lavado A a 35°C
8	Buffer Array Holding	Llenar el arreglo hibridado con Buffer Array Holding (Posición vial 3).

Posteriormente se revisa si existen burbujas de aire, en caso necesario se llena manualmente el arreglo con Buffer Array Holding. Si no hay burbujas, se cubren ambos septos con etiquetas, se corrobora que la superficie de vidrio esté libre de polvo y se limpia la superficie en caso necesario, antes del escaneo.

Análisis de intensidades de hibridación

Se realiza el análisis con el escáner GeneChip® Scanner 3000 (GCS3000) de acuerdo al software AGCC, con (Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) 4.0), en la estación de fluidos 450, se completa la información de etiquetado de cada microarreglo y se inicia de acuerdo al formato 100 (miRNA 4.0 array/FS450_002). Este arreglo contiene sondas para 30,424 miRNAs maduros (de varios organismos), de los cuales 2578 corresponden a miRNAs maduros del humano, derivados del 100% de miRBase v20. Para evaluar la calidad de los experimentos, se corroborará la expresión incrementada de controles exógenos de poly-A (oligos 2, 23, 29 y 31 de RNA, así como oligo 36 de DNA), las cuales deben tener una señal igual o mayor a 1000 (o 0.996 en log2). La hibridación de los controles debe concordar con medidas de concentración ($AFFX-r2-Ec-c1-BioB-3_at < AFFX-r2-Ec-c1-BioC-3_at < AFFX-r2-Ec-c1-BioD-3_at < AFFX-r2-Ec-c1-cre-3_at$).

Se obtienen las intensidades de hibridación de acuerdo a la herramienta miRNA QC del software, se guardan los datos en formato CSV (*comma separate value*). Las intensidades de fluorescencia se cuantifican y analizan con el software Genechip operating software (Affymetrix), los datos crudos se normalizan para eliminar variaciones mediante el método RMA (Robust Multi-array Average), mediante un modelo lineal y distribución normal en escala logarítmica. A partir de las intensidades normalizadas se identifican genes con expresión diferencial con un punto de corte de al menos dos veces (fold change, $FC \geq \pm 2$) entre las pacientes con síndrome de Turner (45,X) y niñas sin síndrome de Turner (46,XX).

El análisis estadístico se realiza con la prueba t de Student para comparar dos medias de grupos independientes. Los miRNAs expresados diferencialmente entre niñas con ST (45,X) y niñas sin ST (46,XX) detectados mediante la prueba t, se consideran

significativos desde el punto de vista estadístico cuando el valor de p sea <0.05 . Se realiza el agrupamiento jerárquico no supervisado para generar mapas de calor y análisis de componentes principales (PCA) con el software *dChip* software (www.dCHIP.org) y con el lenguaje R en plataforma de Java.

Agrupamiento jerárquico y análisis de los componentes principales

El análisis del agrupamiento jerárquico se realizó mediante el *software DChip* usando correlación Euclidiana y promedio, con el fin de visualizar gráficamente mediante el mapa de calor diferencias en la expresión. Estos se llevaron a cabo para el análisis comparativo de las niñas con diagnóstico de ST con respecto a las niñas sin diagnóstico de ST. El posterior análisis de los componentes principales se realizó mediante Java a partir de los datos de los miRNAs con mayor diferencias en la expresión en el análisis comparativo entre niñas con y sin el diagnóstico de ST.

Análisis *in silico* de los potenciales mRNAs blanco

Para determinar las posibles mRNAs regulados por los miRNAs alterados en su expresión, se realizó la predicción mediante algoritmos diferentes a través de los softwares TargetScan V 6.2 (<http://www.targetscan.org>) (Grimson 2007) y PITA-TOP (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html) (Kertesz 2007). Estos análisis se realizaron a través de softwares integrativos de estas herramientas como miRDIP, (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>) (Shirdel 2012) y miRwalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) (Dweep 2011).

Análisis *in silico* de los mRNAs blanco validados

Para determinar los mRNAs blancos ya validados que son regulados por los miRNAs con expresión diferencial significativa, se utilizaron los software miRecords (<http://mirecords.bioclead.org>) (Xiao 2009) y TarBase v5.c (<http://microrna.gr/tarbase>) (Papadopoulos 2009).

ASPECTOS ÉTICOS

El presente protocolo se apegó a los lineamientos establecidos en la Declaración mundial de Helsinki y al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud.

Riesgo de la investigación:

De acuerdo a lo establecido en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, en el título II, capítulo primario, artículo 17, este estudio se considera de riesgo mínimo ya que solo consideró la extracción de 3 mL de sangre periférica en las niñas con diagnóstico de ST y de 6 mL en las niñas sin el diagnóstico.

Posibles beneficios:

Ningún sujeto recibirá un beneficio directo derivado de la realización del estudio. Sin embargo, se espera que los resultados obtenidos tengan un beneficio global para la sociedad, principalmente la comunidad científica.

Posibles riesgos:

El riesgo de este estudio se asocia principalmente a la presencia de hematomas en la zona de venopunción.

Balance riesgo-beneficio:

Dado que se espera un beneficio global para la sociedad y los riesgos derivados de este estudio son menores, puede decirse que el balance riesgo-beneficio se inclina hacia el beneficio.

Confidencialidad:

Toda la información obtenida de cada sujeto a partir del expediente clínico y de los estudios realizados para este protocolo de tesis son anónimos pues se asignaron claves alfanuméricas. Todos los datos que identifiquen a los sujetos fueron codificados. La base de datos generada para este estudio ha permanecido almacenada en un ordenador ubicado físicamente en la Jefatura del Servicio de Genética Médica y solo el alumno de maestría, el tutor y co-tutora tienen acceso a la información confidencial de cada sujeto de investigación.

Consentimiento informado:

Por el riesgo de la investigación y la población de estudio, se obtuvo consentimiento y asentimiento informado (niñas mayores de 8 años) para la inclusión de sujetos. El alumno fue el único encargado de la obtención de los mismos y este mismo no fue el médico tratante de los posibles candidatos que decidieron participar en el estudio.

Selección de los participantes:

Al tratarse de un muestreo de casos consecutivos, cada niña tuvo la misma probabilidad de ser sujeto de investigación, por lo que se respetó el principio ético de justicia.

Población vulnerable:

Al tratarse de sujetos de investigación enfermos y menores de edad, se consideró población vulnerable, por lo que se garantizó la obtención de firma de consentimiento informado válido para el padre o tutor y asentimiento informado para el menor.

Conflicto de intereses:

No existió ningún conflicto de interés económico o personal dentro del equipo de colaboradores.

El protocolo fue autorizado por el comité local de investigación y ética en investigación en salud (CLIEIS) con número de registro R-2014-3603-35.

RESULTADOS

Se analizaron las muestras de sangre periférica de un total de 15 niñas, 8 de ellas con el diagnóstico clínico de síndrome de Turner con resultado de cariotipo 45,X y 7 niñas sanas con resultado de cariotipo 46,XX.

Las características clínicas de las niñas que constituyeron el grupo de síndrome de Turner (45,X) se muestran en la tabla 8.

Tabla 8.- Características clínicas de niñas con síndrome de Turner (45,X).

	Cardiopatía Congénita	Linfedema Congénito	Enfermedad Autoinmune	Múltiples Nevi	Micrognatia	Cuello Corto	Tórax en escudo	Cúbito Valgo	4to metacarpiano corto
T1	++	++	++	++	++	++	++	++	++
T2	--	--	--	++	++	++	++	++	++
T3	++	++	++	--	++	++	++	++	++
T4	--	--	--	++	++	++	++	++	++
T5	--	--	--	++	++	++	++	++	++
T6	--	--	--	++	++	++	++	++	++
T7	--	--	--	++	++	++	++	++	++
T8	--	--	--	--	++	--	++	++	++

A continuación se muestran los datos demográficos de las niñas que conformaron el grupo de síndrome de Turner (45,X) y el grupo de niñas sanas (46,XX) en tabla número 9.

Tabla 9. Edad, peso y talla en niñas con Síndrome de Turner (45,X) y niñas sanas (46,XX).

Variable	Grupo 45,X n=8	Grupo 46,XX n=7	Valor de p †
Edad	11.63 ± 2.82	12.14 ± 1.95	0.691
Peso	32.38 ± 8.11	40.07 ± 4.95	0.045
Talla	1.27 ± 0.13	1.40 ± 0.07	0.043

† Se realizó prueba t de Student para 2 muestras independientes.

Se muestra que no existió diferencia significativa en la edad de las participantes ($p=0.691$), esto resulta fundamental para considerar que este factor no influyó en el valor promedio de la expresión de los miRNAs analizados en cada grupo.

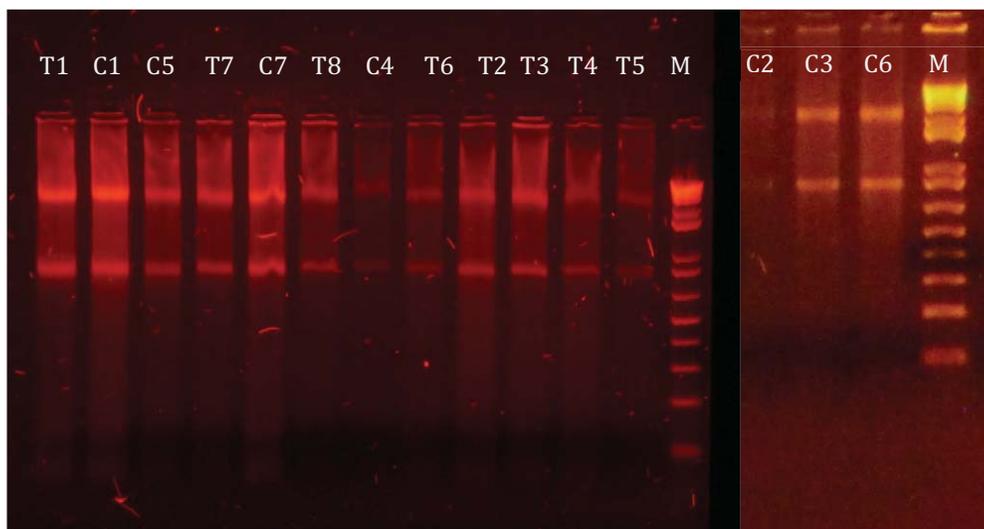
Tanto el peso como la talla de las niñas 45,X fue menor en comparación con el grupo 46,XX ($p=0.045$ y 0.043 respectivamente), esto explicado primordialmente por el diagnóstico de síndrome de Turner.

Con la obtención del RNA total se realizó la determinación de la expresión de los miRNAs mediante el microarreglo Applied Biosystems™ GeneChip™ miRNA 4.0 Assay. La calidad del RNA total (cuantificación, absorbancia e integridad de las bandas de RNA en gel de electroforesis) se observa en tabla 10 y figura 8.

Tabla 10.-Cuantificación y Absorbancia del RNA total de las 15 participantes.

#	Sujetos	PRIMERA CUANTIFICACIÓN			SEGUNDA CUANTIFICACIÓN			CUANTIFICACIÓN PROMEDIO	
		MUESTRA	[ng/ml]	260/280	MUESTRA	[ng/ml]	260/280	[ng/ml]	260/280
1	TURNER	T1	272.8	1.9	T1	455.15	2.1	364.0	2.00
2	CONTROL	C1	357.6	1.95	C1	1018.75	2.1	688.2	2.03
3	CONTROL	C5	108.4	1.94	C5	322.03	2.1	215.2	2.02
4	TURNER	T7	74.4	1.73	T7	148.67	2	111.5	1.87
5	CONTROL	C7	121.3	1.92	C7	289.63	2	205.5	1.96
6	TURNER	T8	100	1.47	T8	121.87	1.9	65.9	1.69
7	CONTROL	C6	181.1	1.97	C6	251.62	1.6	216.4	1.79
8	TURNER	T6	24.6	1.59	T6	77.70	1.9	51.2	1.75
9	TURNER	T2	73.8	1.97	T2	146.19	1.9	110.0	1.94
10	TURNER	T3	38.8	1.45	T3	197.71	1.9	118.3	1.68
11	TURNER	T4	98.8	1.81	T4	169.47	2	134.1	1.91
12	TURNER	T5	477	1.85	T5	71.79	2	274.4	1.93
13	CONTROL	C2	175.4	1.8	C2	58.03	1.8	116.7	1.80
14	CONTROL	C3	155.6	1.87	C3	199.54	1.9	177.6	1.89
15	CONTROL	C4	190.1	1.81	C4	163.70	1.9	176.9	1.86

Figura 8.- Integridad de las bandas de RNA en gel de electroforesis de las 15 participantes.



Posteriormente se procedió a realizar la determinación del perfil de expresión con el microarreglo Applied Biosystems™ GeneChip™ miRNA 4.0 Assay que contiene 2,578 sondas de miRNAs maduros de *Homo sapiens*.

El proceso de validación del control de hibridación (asegura que el perfil de expresión registrado de cada sujeto realmente derive de la muestra indicada), se realizó con un set de sondas comerciales de Affymetrix para correlacionar cada perfil de expresión con su muestra de RNA, de esta forma, se generó un patrón de hibridación muestra-específica que utilizamos para monitorizar que cada arreglo hibridó con la muestra correcta de cada participante. Ver figura 9.

Después de validar el control de hibridación de las muestras, se realizó un análisis de imagen de cada uno de los cartuchos utilizados (n=15), se identificó la correcta morfología e intensidad de los puntos o “spots” de cada sitio de hibridación del RNA total con las sondas de los diferentes miRNAs, que representan las intensidades de expresión relativa de los miRNAs. En figura 10 y 11 observamos las 15 imágenes digitales obtenidas de cada una de las participantes.

Figura 9.- Controles de hibridación de las muestras analizadas, todas superan el valor límite de calidad.

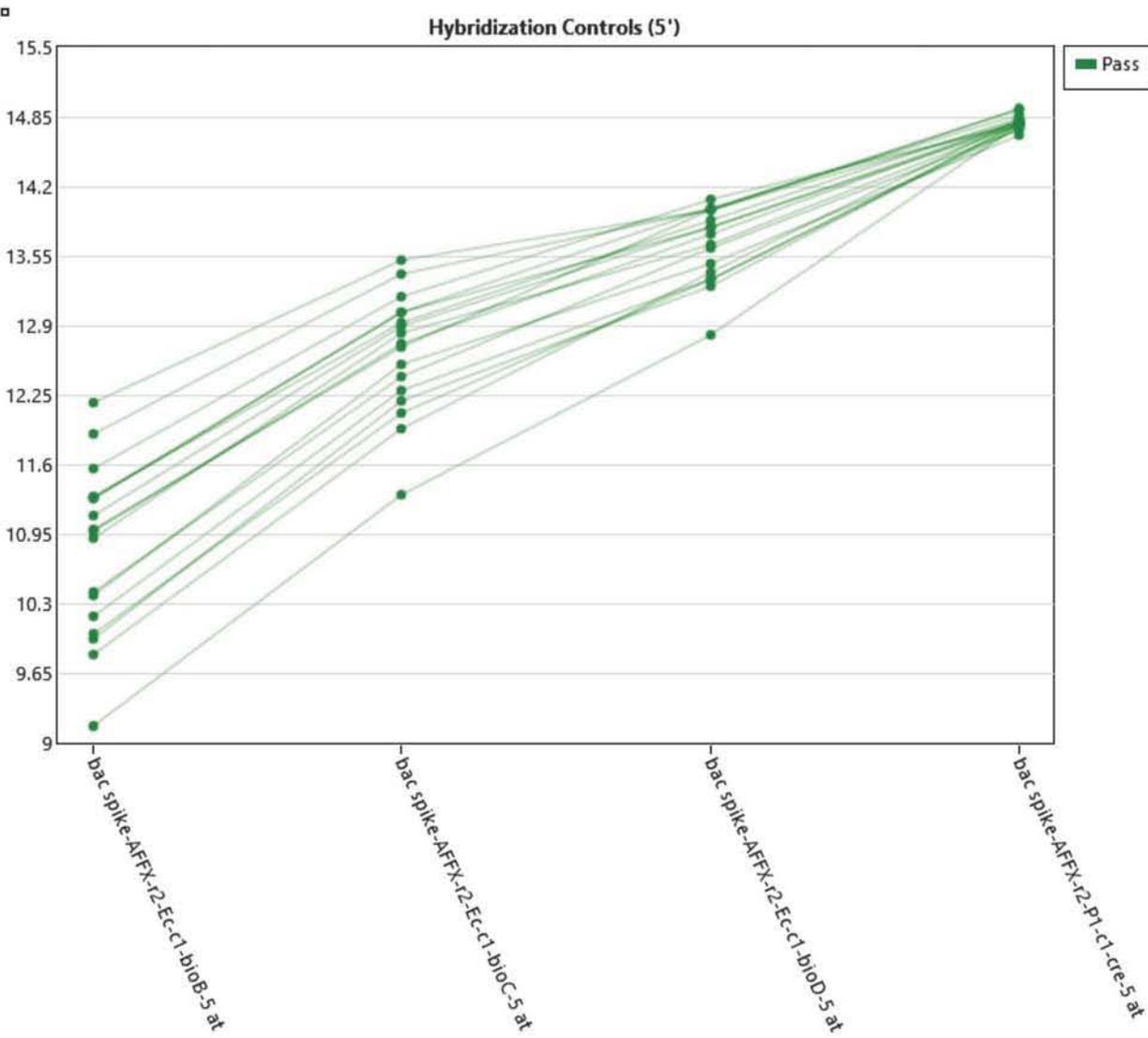


Figura 10.- Archivo digital del microarreglo denominado bit map, provee una representación numérica 1:1 de los valores de fluorescencia de cada pixel. El formato estándar de estos archivos es TIFF (Tagged Image File Format). Se muestra el TIFF de sujeto (T8) en tamaño estándar, los restantes 14 se muestran en tamaño reducido.



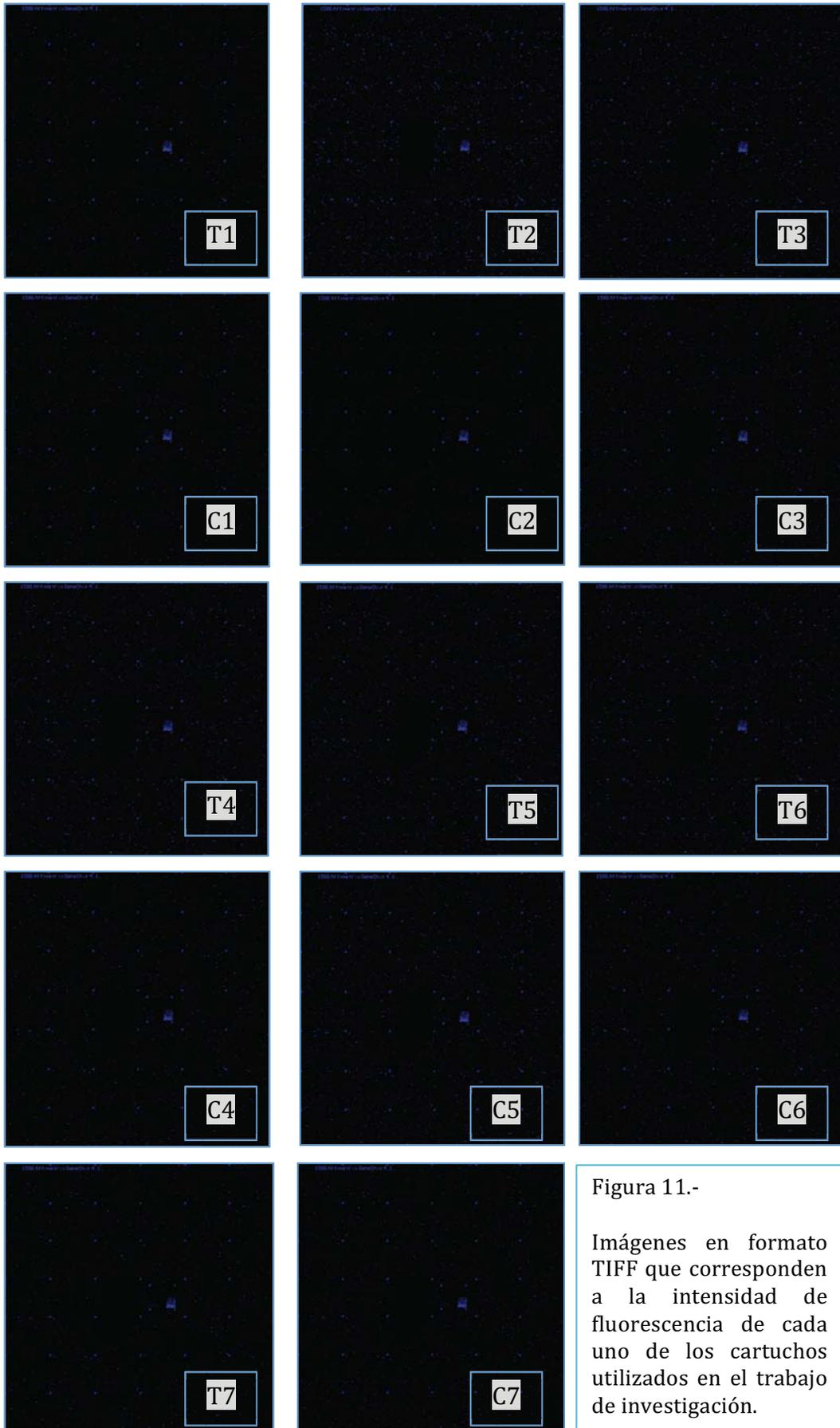


Figura 11.-

Imágenes en formato TIFF que corresponden a la intensidad de fluorescencia de cada uno de los cartuchos utilizados en el trabajo de investigación.

De los 2578 miRNAs maduros de *homo sapiens* contenidos en el arreglo utilizado para este proyecto y distribuidos a lo largo del genoma de cada niña participante, solo 89 mostraron estar diferencialmente expresados en al menos 1.5 veces de cambio entre el promedio de la intensidad de la hibridación de la sonda del miRNA específico con el RNA total utilizado, esto, cuantificado como intensidad de la fluorescencia del grupo de las niñas 45,X comparada con el promedio de la intensidad de la hibridación de la niñas del grupo 46,XX. Los detalles del procesamiento y cuantificación se especifican en el apartado de metodología del ensayo de expresión.

En la tabla 11 se muestran los 89 miRNAs que mostraron una expresión diferencial y entre ellos solo 3 estaban localizados en el cromosoma X, dos en brazo corto y uno de ellos en brazo largo. En figura 12 se muestra gráfico de barras de los 89 miRNAs diferencialmente expresados con valor de $p < 0.05$.

Tabla 11.- Sobre-expresión y sub-expresión de miRNA's en pacientes con síndrome de Turner (45,X) comparado con pacientes sanas (46,XX) (Fold change= $>\pm 1.5$)

miRNA	Locus	Cambio en intensidad de hibridación (fold change)	Valor de p
Sobre expresados			
hsa-miR-29b-1-5p	7q32.2	1.52	0.032
hsa-miR-320e	19q13.32	1.54	0.0433
hsa-miR-4487	11p11.2	1.56	0.0475
hsa-miR-3200-5p	22q12.2	1.59	0.027
hsa-miR-550a-1	7p14.3	1.63	0.0046
hsa-miR-550a-2	7p14.3	1.63	0.0046
hsa-miR-550a-3	7p14.3	1.63	0.0046
hsa-miR-6722	9q34.3	1.64	0.0413
hsa-miR-668-5p	14q32.31	1.77	0.0079
hsa-miR-8075	13q34	1.8	0.0439
hsa-miR-3619-5p	22q13.31	1.82	0.0159
hsa-miR-486-5p	8p11.21	1.91	0.0034
hsa-miR-6776	17p13.3	2.11	0.0018
hsa-miR-182-5p	7q32.2	2.47	0.0195
hsa-miR-6750-5p	11q13.1	2.72	0.0058
hsa-miR-451a	17q11.2	2.83	0.0459
hsa-miR-1244-3	12p13.31	3.74	0.0447
hsa-miR-183-5p	7q32.2	11.31	0.0038
Sub expresados			
hsa-miR-100-5p	11q24.1	-4.16	0.0043
hsa-miR-181c-3p	19p13.2	-3.38	0.0021
hsa-miR-6790-5p	19p13.3	-3.32	0.0031
hsa-miR-4646-5p	6p21.33	-2.82	0.0043
hsa-miR-30a-3p	6q13	-2.75	0.0154

hsa-miR-2355-3p	2q33.3	-2.72	0.0045
hsa-miR-708-5p	11q14.1	-2.66	0.0136
hsa-miR-5572	15q25.1	-2.65	0.0024
hsa-miR-101-3p	9p24.1	-2.58	0.0277
hsa-miR-34a-5p	1p31.3	-2.35	0.0328
hsa-miR-3613-3p	13q14.2	-2.31	0.0209
hsa-mir-486-2	8p11.21	-2.22	0.004
hsa-miR-4721	16p11.2	-2.16	0.0068
hsa-miR-3064-5p	17q23.3	-2.1	0.0062
hsa-miR-1281	22q13.2	-2.1	0.0299
hsa-miR-199a-5p	1q24.3	-2.09	0.0174
hsa-miR-3185	17q21.32	-2.05	0.0337
hsa-miR-199a-3p	1q24.3	-2.03	0.022
hsa-miR-199b-3p	9q34.11	-2.03	0.022
hsa-miR-572	4p15.33	-2.02	0.0148
hsa-miR-4734	17q12	-1.96	0.0339
hsa-miR-219b-5p	9q34.11	-1.95	0.0026
hsa-miR-6821-5p	22q13.33	-1.93	0.0134
hsa-miR-1273h-3p	16p12.1	-1.91	0.0009
hsa-miR-4479	9q34.3	-1.85	0.0144
hsa-miR-4322	19p13.2	-1.85	0.0236
hsa-miR-126-3p	9q34.3	-1.85	0.0248
hsa-miR-4707-5p	14q11.2	-1.84	0.0028
hsa-miR-185-3p	22q11.21	-1.83	0.0081
hsa-miR-551b-3p	3q26.2	-1.83	0.0151
hsa-miR-5187-5p	1q23.3	-1.82	0.0119
hsa-miR-5001-5p	2q37.1	-1.8	0.0232
hsa-mir-6800-3p	19q13.33	-1.79	0.0189
hsa-miR-1285-3p	2p13.3	-1.78	0.0196
hsa-mir-6800-5p	19q13.33	-1.76	0.0196
hsa-miR-30c-1-3p	1p34.2	-1.76	0.0215
hsa-miR-99b-3p	19q13.41	-1.75	0.0012
hsa-miR-6724-5p	21p11.2	-1.74	0.012
hsa-miR-6133	7q33	-1.73	0.0062
hsa-mir-5095	1p32.2	-1.71	0.0143
hsa-mir-4634	5q35.2	-1.71	0.0304
hsa-miR-1203	17q21.32	-1.7	0.0058
hsa-miR-1915-3p	10p12.31	-1.7	0.0113
hsa-miR-3940-5p	19p13.3	-1.69	0.0026
hsa-miR-6793-5p	19p13.2	-1.69	0.0122
hsa-miR-652-5p	Xq23	-1.68	0.0118
hsa-miR-8069	21q11.2	-1.67	0.0104
hsa-miR-4673	9q34.3	-1.67	0.0156
hsa-miR-598-3p	8p23.1	-1.66	0.0031
hsa-miR-221-5p	Xp11.3	-1.66	0.0491
hsa-miR-27b-5p	9q22.32	-1.64	0.0313
hsa-miR-27b-3p	9q22.32	-1.64	0.037
hsa-miR-3928-3p	22q12.2	-1.63	0.0011
hsa-miR-2861	9q34.11	-1.63	0.0152
hsa-miR-590-5p	7q11.33	-1.63	0.0295
hsa-miR-4440	2q37.3	-1.62	0.0115
hsa-miR-371a-5p	19q13.4	-1.6	0.0034
hsa-miR-7108-5p	19p13.3	-1.6	0.0056

hsa-miR-660-3p	Xp11.23	-1.58	0.0021
hsa-miR-6124	11p15.3	-1.58	0.0283
hsa-miR-885-3p	3p25.3	-1.56	0.0191
hsa-miR-6125	12q14.1	-1.55	0.0005
hsa-miR-4800-5p	4p16.3	-1.55	0.0365
hsa-miR-3621	9q34.3	-1.54	0.022
hsa-miR-6856-5p	9q34.12	-1.54	0.0365
hsa-miR-4793-3p	3p21.31	-1.54	0.0415
hsa-miR-4763-3p	22q13.31	-1.52	0.0104
hsa-miR-6738-5p	1q22	-1.52	0.03
hsa-miR-6125	12q14.1	-1.5	0.0108
hsa-miR-638	19p13.2	-1.5	0.0319
hsa-miR-4745-5p	19p13.3	-1.5	0.0435

De estos 89 miRNAs con expresión diferencial entre los grupos, 18 de ellos se encontraron sobre expresados en 45,X y 71 sub expresados con respecto al promedio de la intensidad de hibridación de las niñas 46,XX.

De acuerdo al título, pregunta de investigación e hipótesis de nuestro trabajo, solo 2 de los 38 miRNAs localizados dentro de la región 1, banda 1, sub banda 2 del brazo corto del cromosoma X hasta la región terminal del mismo (pter) se encontraron diferencialmente expresados, de forma específica, sub expresados.

El primero de ellos es hsa-miR-221-5p localizado en Xp11.3, mostró un *fold change* de -1.66 y valor de $p < 0.05$, lo mismo ocurrió para el miRNA hsa-miR-660-3p, *fold change* de -1.58 ($p = 0.0021$) cuyo locus es Xp11.23, clásicamente reconocida como la región crítica del síndrome de Turner y donde se localizan secuencias que necesitan escapar del mecanismo de silenciamiento transcripcional (inactivación del cromosoma X) para poderse expresar de forma bialélica, tal como se planteó en la hipótesis, al menos uno de los 38 miRNAs localizados en la región Xp11.2-pter se encontró disminuido en su expresión 1.5 veces por posible efecto de dosis génica (haploinsuficiencia), resulta de interés profundizar en nuestra discusión en posibles mecanismos moleculares que expliquen este hallazgo.

El tercer miRNA localizado en cromosoma X que mostró una expresión diferencial en 45,X con respecto a 46,XX fue hsa-miR-652-5p con locus Xq23 y cuyo valor de *fold change* fue -1.68 ($p = 0.0118$) por lo que también resultó sub expresado, en resumen, solo 3 miRNAs diferencialmente expresados de los 2578 analizados en esta técnica de hibridación se encontraron localizados en el cromosoma X, los 3 se encontraron

sub expresados en 45,X con respecto al grupo control 46,XX. En tabla 12 se muestran estos 3 miRNAs y sus *loci* correspondientes.

Figura 12.- 89 miRNAs diferencialmente expresados en 45,X vs 46,XX, $p < 0.05$

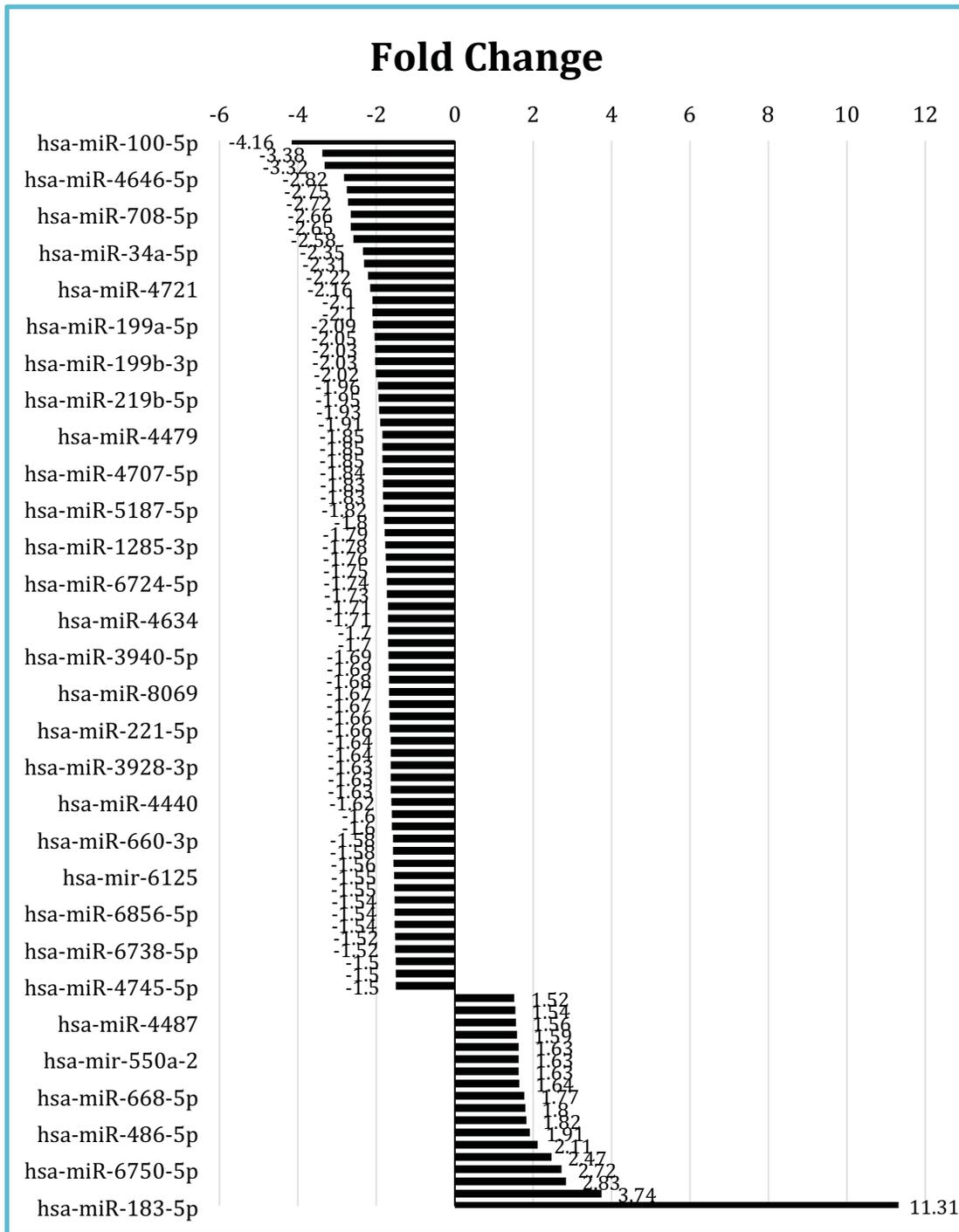


Tabla 12.- miRNAs sub-expresados en 45,X vs 46,XX localizados en el cromosoma X.

miRNA	Locus	Promedio intensidad hibridación (Log 2) en 45,X	Promedio intensidad hibridación (Log 2) en 46,XX	Cambio en intensidad de hibridación (fold change)	Valor de p
Sub-expresados					
hsa-miR-221-5p	Xp11.3	3.68	2.95	-1.66	0.0491
hsa-miR-660-3p	Xp11.23	1.11	0.45	-1.58	0.0021
hsa-miR-652-5p	Xq23	4.72	3.98	-1.68	0.0118

Conocemos que la hipótesis subyacente del análisis mediante la técnica de microarreglo se basa en la medición de la intensidad de la hibridación de cada miRNA con su respectiva sonda localizada en el cartucho, y que esto representa la expresión relativa de dicha secuencia de nucleótidos en dos o más grupos de comparación. Para nuestro trabajo decidimos realizar la búsqueda de un patrón de expresión diferencial de miRNAs como una aproximación exploratoria inicial a un fenómeno biológico específico, en este contexto, los miRNAs descritos tanto en tabla 11 serían candidatos adecuados para que a partir de ellos se seleccione una muestra de quienes podrían ser susceptibles de validar su expresión mediante una técnica cuantitativa como lo es la RT-PCR, sin embargo, esta lista aun podría ser extensa y decidimos realizar un ejercicio con un punto de corte fijo de *fold change* mayor de 2 y valor $p < 0.05$ para identificar miRNAs candidatos que exhibieran una diferencia más significativa, siempre manteniendo en la mente la necesidad de una futura validación con otra técnica cuantitativa. Estos miRNAs diferencialmente expresados se muestran en la tabla 13 así como en el gráfico de barras en figura 13, observamos 6 sobre expresados y 20 sub expresados, de entre todos, destaca la ausencia de alguno con localización en el cromosoma X. En el transcurso de la sección de resultados y discusión decidimos explorar algunos de ellos para mostrar posibles vías biológicas con una probable implicación en el fenotipo de las mujeres con síndrome de Turner.

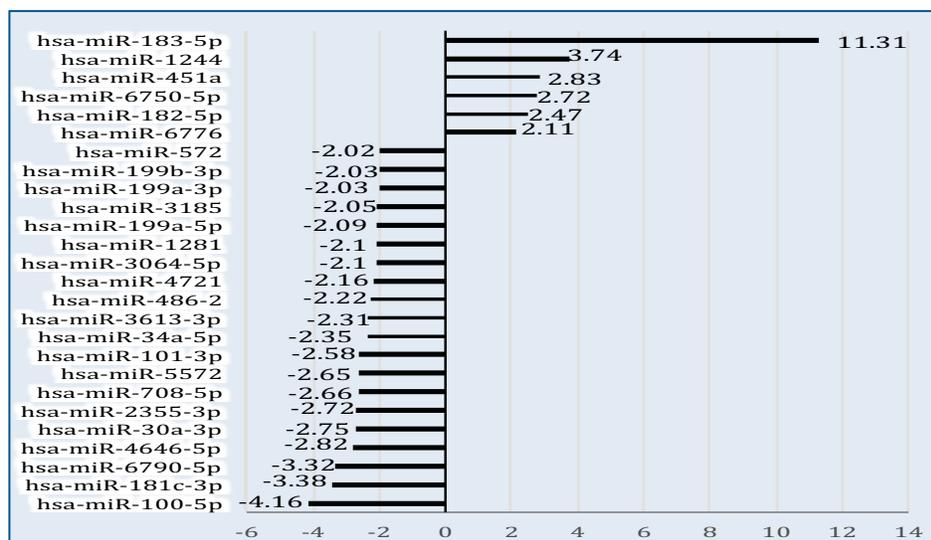
Blancos validados de miRNAs con expresión diferencial

Para determinar los mRNAs blancos validados que son regulados por los miRNAs con expresión diferencial significativa localizados en el cromosoma X se utilizó el software miRBase, TarBase y miRecords. Ver tabla 14.

Tabla 13. Sobre-expresión y sub-expresión de miRNAs en pacientes con síndrome de Turner (45,X) comparado con pacientes sanas (46,XX) (Fold change = > ± 2.0).

miRNA	Locus	Promedio intensidad hibridación (Log 2) 45,X	Promedio intensidad hibridación (Log 2) 46,XX	Cambio en intensidad de hibridación (fold change)	Valor de p
Sobre-expresados					
hsa-mir-6776	17p13.3	3.84	4.92	2.11	0.0018
hsa-miR-182-5p	7q32.2	7.07	8.37	2.47	0.0195
hsa-miR-6750-5p	11q13.1	3.56	5	2.72	0.0058
hsa-miR-451a	17q11.2	8.84	10.35	2.83	0.0459
hsa-miR-1244	12p13.31	2.57	4.47	3.74	0.0447
hsa-miR-183-5p	7q32.2	1.31	4.81	11.31	0.0038
Sub-expresados					
hsa-miR-100-5p	11q24.1	4.09	2.03	-4.16	0.0043
hsa-miR-181c-3p	19p13.2	2.62	0.86	-3.38	0.0021
hsa-miR-6790-5p	19p13.3	6.02	4.29	-3.32	0.0031
hsa-miR-4646-5p	6p21.33	4.27	2.78	-2.82	0.0043
hsa-miR-30a-3p	6q13	3.41	1.96	-2.75	0.0154
hsa-miR-2355-3p	2q33.3	2.15	0.7	-2.72	0.0045
hsa-miR-708-5p	11q14.1	2.11	0.7	-2.66	0.0136
hsa-miR-5572	15q25.1	3.1	1.7	-2.65	0.0024
hsa-miR-101-3p	9p24.1	2.16	0.79	-2.58	0.0277
hsa-miR-34a-5p	1p31.3	2.61	1.38	-2.35	0.0328
hsa-miR-3613-3p	13q14.2	2.19	0.98	-2.31	0.0209
hsa-mir-486-2	8p11.21	2.72	1.57	-2.22	0.004
hsa-miR-4721	16p11.2	2.91	1.8	-2.16	0.0068
hsa-miR-3064-5p	17q23.3	2.22	1.15	-2.1	0.0062
hsa-miR-1281	22q13.2	4.18	3.11	-2.1	0.0299
hsa-miR-199a-5p	1q24.3	8.49	7.43	-2.09	0.0174
hsa-miR-3185	17q21.32	6.79	5.76	-2.05	0.0337
hsa-miR-199a-3p	1q24.3	10.99	9.96	-2.03	0.022
hsa-miR-199b-3p	9q34.11	10.99	9.96	-2.03	0.022
hsa-miR-572	4p15.33	3.69	2.68	-2.02	0.0148

Figura 13.- 26 miRNAs expresados diferencialmente con FC ± 2.0, valor de p < 0.05



Blancos validados de miRNAs con expresión diferencial

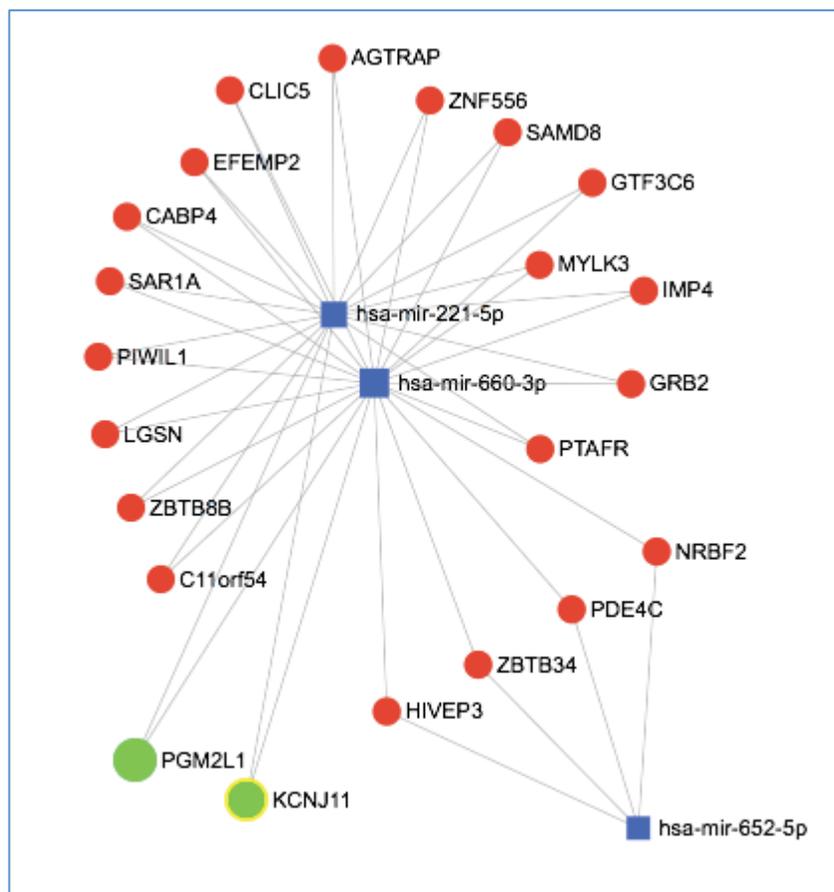
Tabla 14.- Blancos validados de los 3 miRNAs (DE) localizados en cromosoma X, p<0.05.

miRNA	Locus	Blancos validados
hsa-miR-221-5p	Xp11.3	AASDHPPT; ADCYAP1; AGTRAP; ALG14; ANKRD49; AVPR1A; BAK1; BCL2L2; BRMS1; C11orf54; C18ORF25; C1orf43; CABP4; CARD8; CCDC36; CCDC71L; CCNT1; CKAP2L; CLIC5; CREBZF; CYP1A2; DNAH17; DNAJC10; DTWD2; EFEMP2; ENPP1; ERCC6L; ERI1; ERO1L; F2RL3; FBXL3; FBXO31; FNBP1; FZD2; GATAD2B; GTF3C6; HAS2; HAUS5; HES7; HNRNPA1; ITGB1; JARID2; KANSL3; KCNJ11; KCNKG6; KIAA0754; LDOC1; LGSN; LPP; LRRTM2; LRTOMT; MBD2; MRPS16; MTMR3; MUC17; MYLK3; MYPN; NDUFAF3; NPHP3; NUDT3; NUP50; P2RX3; PABPC1; PARP1; PGM2L1; PIWIL1; POLR3F; PRNP; PRR13; PRRC2C; PTAFR; QSER1; RAD18; REPS1; RIMKLA; RNF24; RNMTL1; RPL15; RPL27A; RRAGD; SAMD8; SAR1A; SBNO1; SDC4; SGSM1; SLC1A7; SLC39A10; SLC8A3; STAT2; TFAP2B; TMEM101; TMEM70; TOMM40; TRAPPC2; TVP23C; UFM1; UGDH; UNC5B; UROS; VKORC1L1; YIPF4; YOD1; ZBTB8B; ZC2HC1C; ZDHHC24; ZDHHC6; ZNF234; ZNF345; ZNF486; ZNF556; ZNF70; ZNF749; ZSCAN22; ZSWIM7
hsa-miR-660-3p	Xp11.23	ABL2; ABLIM1; ACO1; ADAMTS1; ADD1; ADM2; AFF1; AGO3; AGTPBP1; AGTRAP; AKR1D1; AKR7A2; ALDH1A2; ALDH1L2; ALDH6A1; ALG1; AMOTL1; ANGPTL3; ANO7; AP1S3; APOL6; APTX; AR; ARHGAP35; ARID3A; ARL10; ARRC3; ASB7; ATP2B3; ATP6AP1L; BCORL1; BDP1; BMPR1A; BRX1; BTN2A2; C10orf10; C11orf54; C12orf73; C15orf52; C17orf75; C19orf24; C1orf147; C1orf158; C20orf144; C2CD2L; C3orf62; C4orf32; C6; C6orf132; C6orf47; CABP4; CACNG8; CAPN6; CATSPER4; CAV1; CCDC107; CCR5; CDK9; CDKN2AIPNL; CDT1; CENPM; CES2; CHST15; CILP2; CISD3; CLIC5; CMSS1; CMTM6; CNDP1; CNKSR3; CNNM3; COL19A1; COL4A3BP; COMM2; CREBBP; CTNS; CYB561D1; CYP2B6; DARS2; DAZAP2; DBN1; DENND5B; DGCR14; DHTKD1; DIP2C; DNAJC28; DNMT3A; DPYSL5; DUOX2; DUSP10; E2F2; EDN2; EFEMP2; EPHX2; F2; FADS1; FAM13C; FAM151B; FAM153B; FAM189B; FAM208A; FAM229B; FBXO17; FBXO42; FEM1A; FITM2; FKBP5; FKTN; GGPS1; GIPC1; GJB1; GJD3; GLO1; GLYAT; GMPR; GNL3L; GPR146; GPR155; GPR26; GPR45; GPR55; GRID1; GRM1; GSR; GTDC1; GTF2H5; HES2; HIVEP3; HM13; HMGB1; HMGC1L1; HMGCS1; HMOX1; HOXA13; HPSE; HRNR; IFNAR1; IGLON5; IL10RB; IMP4; ING1; JAKMIP3; KANSL1; KCNJ11; KCNMB1; KDELR1; KIAA1586; KIAA1958; KLF2; KLF2; LAT2; LEFTY2; LETM2; LGSN; LIF; LINGO2; LMBR1L; LRIF1; LRIG1; LRRC3C; LRRC47; LRRC58; LRSAM1; LSAMP; LSM10; MACC1; MACROD2; MAFK; MAP2K4; MAPK1; MAT2A; MCL1; MED28; METTL14; METTL21A; MFS2; MICALL1; MLXIPL; MOG; MRE11A; MRPL17; MSANTD3; MTO1; MTRF1L; MURC; MYLK3; MYOZ3; NAV1; NBP3; NCKAP1; NFAM1; NIPA1; NLRP9; NOM1; NPR1; NRBF2; NT5C2; NUDT5; NXPE2; OCIAD2; OGFOD1; ORAI2; OSTM1; OXA1L; PACS1; PANK3; PARD3; PARVA; PAX1; PCCB; PCDH17; PDE4C; PDE4DIP; PEA15; PEBP1; PEX26; PGM2L1; PI4K2B; PIGO; PIGQ; PIWIL1; POC1A; POMGNT1; PPIE; PPP1R3E; PPP5D1; PRKCA; PRPSAP1; PRRG4; PSMB9; PTAFR; PTPLAD2; PXDN; RAB13; RAB21; RAB3C; RASA4; RAX; RBM33; RDH13; RETSAT; RGS17; RILPL1; RNF115; RNF149; RNF157; RNF170; RNF187; RNF216; RPL7L1; RRP36; RUSC2; RXRA; S1PR1; SAMD5; SAMD8; SAPCD2; SAR1A; SCRG1; SEMA5A; SHB; SHROOM4; SIGLEC10; SKIL; SLC10A6; SLC22A6; SLC23A1; SLC26A2; SLC38A5; SLC4A4; SLIT1; SMAGP; SMC8; SNAP29; SNRPD1; SNW1; SORBS2; SORD; SPA17; SPANXN1; SPANXN5; SPCS1; SPIB; SRD5A1; SSBP2; STK11IP; STK40; STOML1; STPG1; STX1B; STXB5L; SVOP; SYNGR1; TBL2; TENM3; THEM4; TLCD2; TLX1; TM4SF20; TMEM109; TMEM132C; TMEM178B; TMEM201; TMEM218; TMOD3; TNFAIP8L1; TOP3A; TP53; TRIM65; TRUB2; TSPAN1; TUBD1; TXNIP; UGGT1; UST; VEGFA; VN1R1; VSIG1; VSIG2; VTA1; VWA5A; WDR31; WDR70; XIAP; XRCC2; ZBTB24; ZBTB26; ZBTB34; ZBTB8B; ZCCHC8; ZDHHC15; ZKSCAN1; ZMIZ2; ZNF106; ZNF195; ZNF236; ZNF264; ZNF333; ZNF566; ZNF652; ZNF677; ZNF689; ZNF716; ZNF785; ZSCAN16; ZSCAN2
hsa-miR-652-5p	Xq22.3	ARSB; ATF7IP; BCL2L15; C9orf170; CADM1; EFR3B; EXOSC6; FAM71F2; GRK6; HDX; HNRNPA0; HPS4; KIAA2018; LUZP2; MRPL12; MTMR12; MTRNR2L10; MTRNR2L6; NRBF2; NUDT16; PDE4C; PLEKHA3; PPP1R15B; PPP6R3; PTEN; PTK6; RBM12B; RBM23; SDC1; SIGLEC9; SLC1A1; TANGO2; TSLP

Vías potenciales involucradas con los miRNAs con expresión diferencial

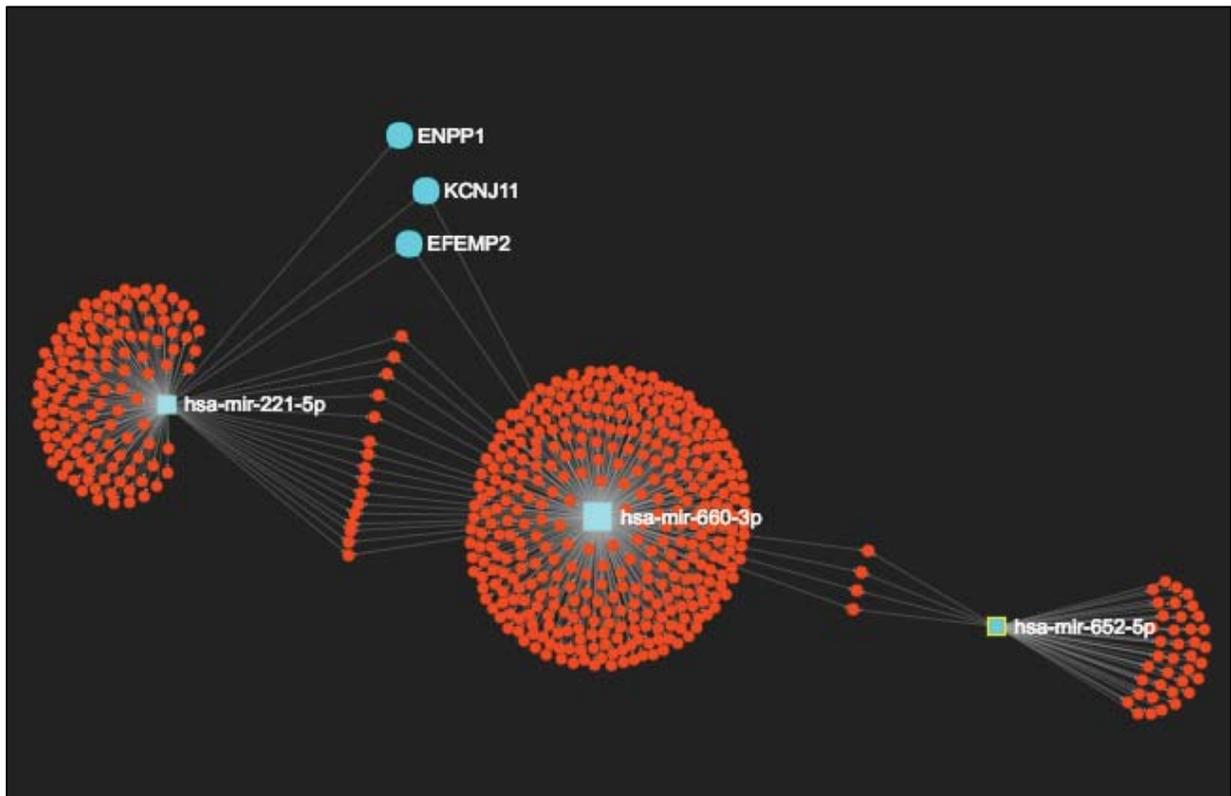
Se utilizó el software para el análisis de interacción de miRNAs y sus genes blanco que se encuentra incluido en el sitio web de acceso gratuito <http://www.mirnet.ca/faces/home.xhtml> los datos que usa esta herramienta los obtiene de [miRTarBase v7.0](#), [TarBase v7.0](#) and [miRecords](#). La figura 14 muestra los RNAm blancos de los 3 miRNAs localizados en el cromosoma X, mostramos la interacción de los dos miRNAs localizados en Xp11.2-pter, el primero de ellos es hsa-miR-221-5p localizado en Xp11.3 y el segundo es hsa-miR-660-3p localizado en Xp11.23, de forma interesante ambos se encuentran sub expresados y regulan de forma conjunta al transcrito de *KCNJ11*, un gen localizado en 11p15.1 y que codifica para un canal de potasio sensible a ATP, en la discusión se describirá su posible implicación clínica en mujeres con ST.

Figura 14.- Genes blancos regulados de forma conjunta por los dos miRNAs localizados en Xp11.2-pter



En la figura 15 observamos otro esquema que representa la interacción de los blancos que regulan los miRNAs localizados en cromosoma X, al realizar un menor acercamiento en la imagen se muestran más blancos validados y resaltamos a *KCNJ11* y *ENPP1*, este último es un gen localizado en 6q23.2 y que también se ha descrito implicado en el metabolismo de los carbohidratos y predisposición a obesidad cuando existen variantes polimórficas en su secuencia.

Figura 15.-Interacción de miRNAs localizados en cromosoma X con sus blancos *KCNJ11* y *ENPP1*



Se decidió realizar un análisis de interacción global de los miRNAs diferencialmente expresados en 45,X comparado con 46,XX con sus mRNAs validados sin importar su ubicación en el genoma para obtener vías (rutas) biológicas que posiblemente pudieran presentar una hipotética modificación de su función en distintos sistemas del organismo (categoría funcional), se trata de las vías KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) que son un conjunto de bases de datos que contienen información sobre diversos genomas, específicamente de *Homo sapiens*.

Figura 16.-Vías KEGG en la que participan los blancos validados de los miRNAs diferencialmente expresados 45,X vs 46,XX

- INMUNIDAD
- DESARROLLO EMBRIONARIO
- METABOLISMO
- OVARIO
- MELANOGÉNESIS

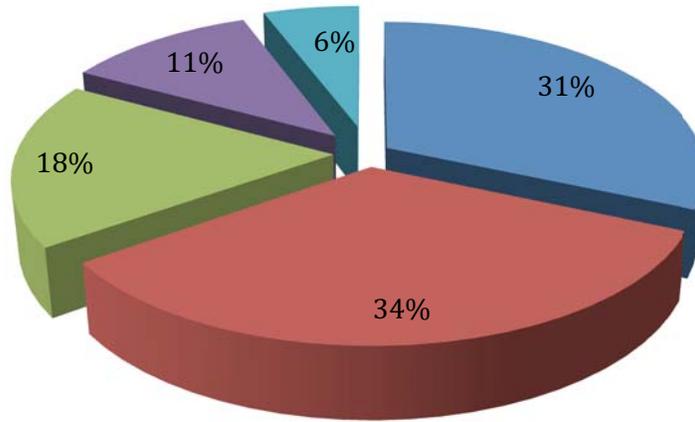
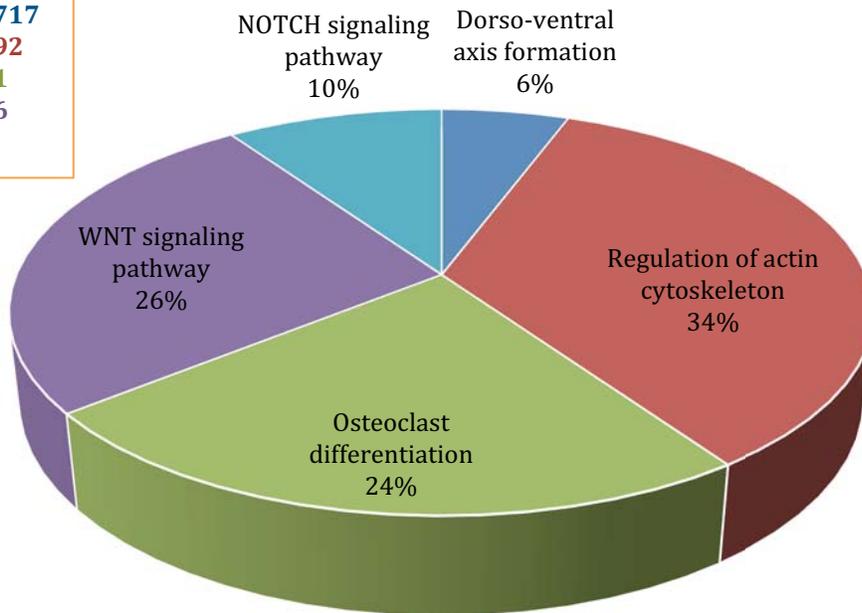


Figura 17.-Categorías funcionales y porcentajes en vías KEGG de desarrollo embrionario

- $p < 0.0000717$
- $p < 0.000392$
- $p < 0.00141$
- $p < 0.00716$
- $p < 0.0498$



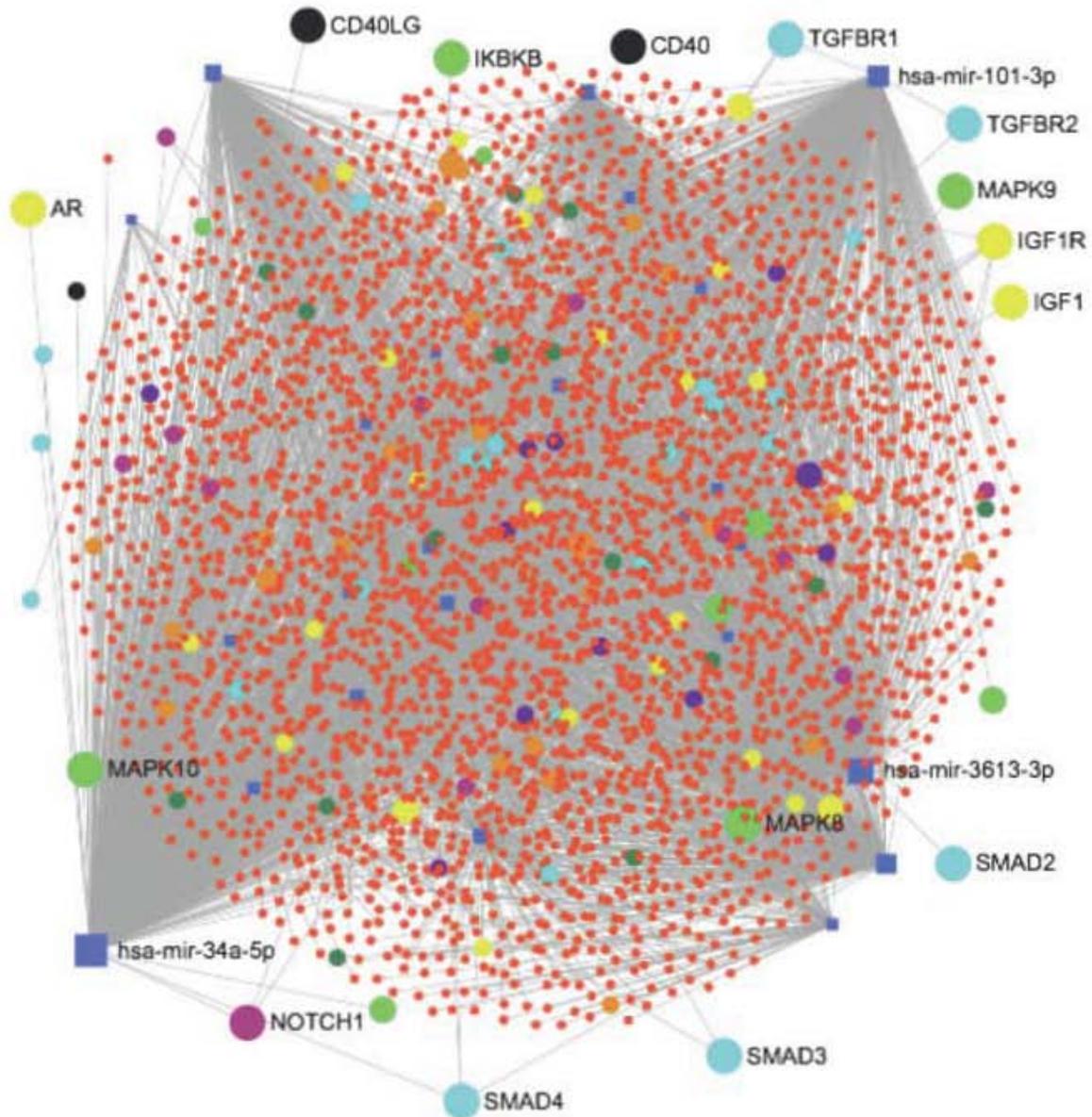
En las figuras 16 y 17 observamos las diferentes categorías funcionales en las que participan los genes blanco regulados por los miRNAs que mostraron estar diferencialmente expresados al comparar los grupos de estudio y que mostraron un valor de $p < 0.05$. De acuerdo a los datos fenotípicos descritos en mujeres con síndrome de Turner, se consideró de interés describir algunos miRNAs que en nuestro estudio mostraron expresión diferencial y su posible implicación en regulación de genes blanco en rutas biológicas del metabolismo, desarrollo embrionario (vías de señalización de NOTCH y diferenciación de osteoclastos), función ovárica e inmunidad.

En la figura 18 se muestra una representación de nodos de interacción entre los 26 miRNAs diferencialmente expresados en los grupos de comparación y sus genes blanco participantes en la vía del desarrollo embrionario, nodos relacionados a metabolismo, vías de inmunidad, función ovárica y diferenciación de osteoclastos.

El gen que codifica para hsa-miR-34a-5p se localiza en 1p31.3, se determinó que este miRNA se encuentra sub expresado con un *fold change* de -2.35 y valor de $p = 0.0328$ en niñas con síndrome de Turner en comparación con niñas sanas, dentro de sus genes blanco se encuentra *NOTCH1*, *TGFBR2*, *PEG10*, *KMT2D*, *SLC2A14* e *INHBB*, entre otros más.

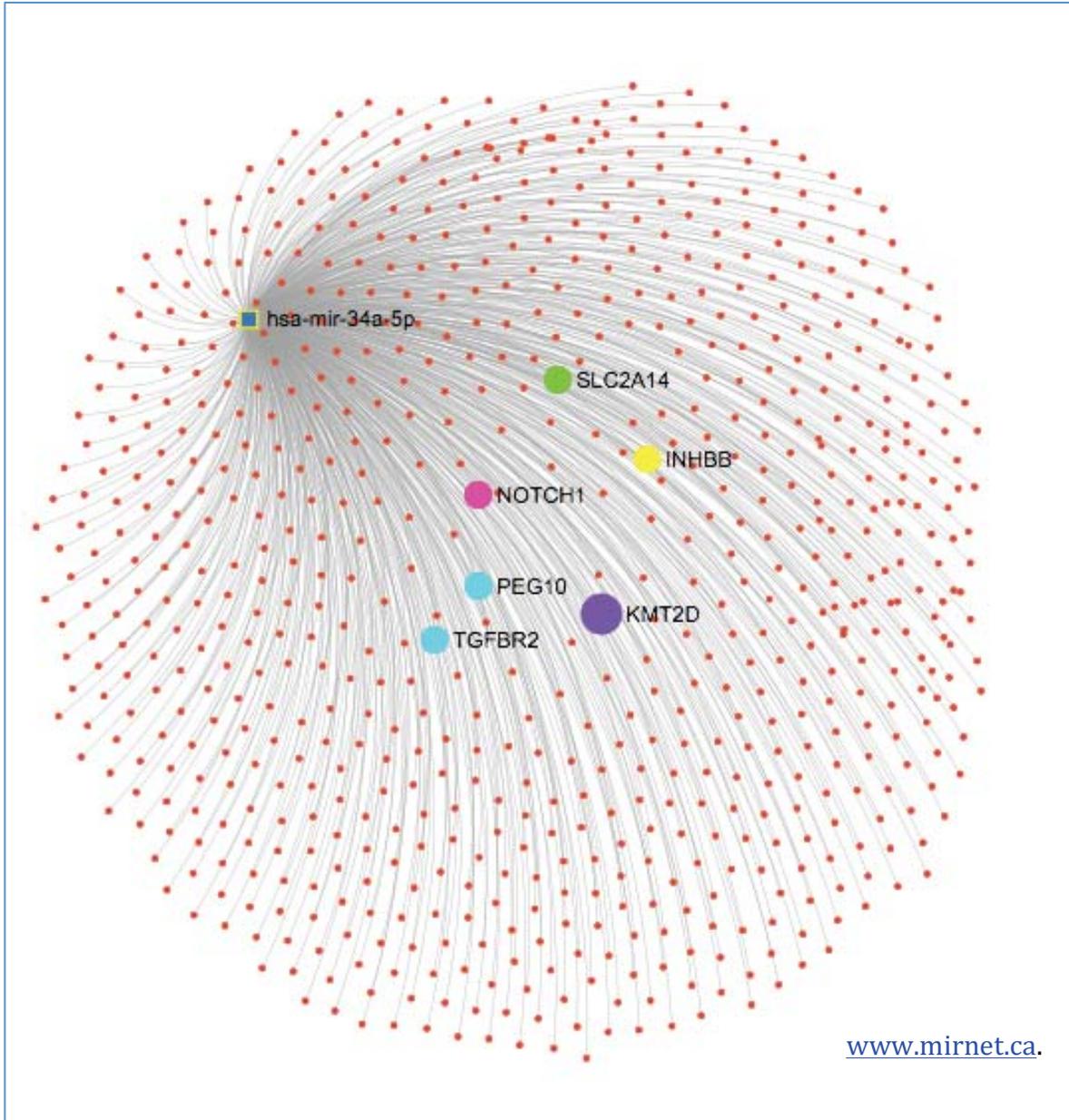
La figura 19 fue representada en forma de nodo, se observa como hsa-miR-34a-5p se relaciona con estos genes blanco cuyas posibles implicaciones biológicas en el fenotipo de mujeres con ST se describen en apartado de discusión.

Figura 18.- Interacción de 26 miRNAs con FC \pm 2.0 ($p < 0.05$) con sus genes blancos en distintas vías KEGG. www.mirnet.ca



Notch signaling pathway	17	0.004	■	Type II diabetes mellitus	15	0.015	■
Osteoclast differentiation	42	0.0035	■	TGF-beta signaling pathway	31	0.026	■
Adipocytokine signaling pathway	24	0.002	■	Oocyte meiosis	33	0.0355	■

Figura 19.- hsa-miR-34a-5p interaccionando con algunos de sus genes blanco



DISCUSIÓN

Rajpathak y colaboradores en 2017⁴² analizaron el mecanismo de acción y la compleja regulación de los miRNAs hacia sus genes blanco (target) y viceversa en fibroblastos de mujeres con síndrome de Turner. Argumentaron que, aunque lo habitualmente descrito es una inhibición directa de la expresión o la función de los genes blanco mediada por los miRNAs, también puede existir una sobre expresión de estos genes debido a una disminución de la cantidad o actividad de uno o varios miRNAs en particular, y que además es necesario tomar en cuenta un contexto global de interacción con otras secuencias génicas codificantes y no codificantes, sin dejar de lado otros factores como el tipo de tejido involucrado y la temporalidad específica en la cual se analiza la función los miRNAs. Esta breve introducción nos resulta útil para poder comunicar el contexto de nuestros resultados en conjunción con los hallazgos moleculares que se han informado recientemente en este tema en la literatura internacional.

miRNAs diferencialmente expresados con localización en cromosoma X

(hsa-miR-221-5p, hsa-miR-660-3p y hsa-miR-652-5p)

De acuerdo al título, pregunta de investigación e hipótesis de nuestro trabajo, 89 miRNAs mostraron estar diferencialmente expresados en al menos 1.5 veces de cambio (fold change), 18 estuvieron sobre expresados en 45,X y 71 sub expresados en comparación con las niñas 46,XX. Solo 2 de los 38 miRNAs localizados en Xp11.2-pter se encontraron diferencialmente expresados, de forma específica, sub expresados. El primero de ellos fue hsa-miR-221-5p cuyo gen se localiza en Xp11.3 y dentro de sus genes blancos validados se encuentra *KCNJ11* que codifica para un canal de potasio sensible a ATP. Su pérdida de función causa hipoglicemia hiperinsulinémica por lo que pudiera especularse que un incremento en su expresión genera una menor secreción de insulina en un supuesto estado de susceptibilidad de desarrollar DM2 en mujeres con Turner. Se ha demostrado que variantes patogénicas en estado heterocigoto en *KCNJ11* causan diabetes mellitus transitoria neonatal tipo 3 (OMIM #610582) por una menor sensibilidad al ATP con incremento de la apertura del

canal. Resulta interesante comentar que hsa-miR-660-3p, el segundo miRNA sub expresado y localizado en Xp11.23, también contiene dentro de sus blancos validados al transcrito de *KCNJ11*, esto podría sugerir que la convergencia de estas dos vías de regulación post-transcripcional pudieran ser una clave importante en una ruta específica del metabolismo de los carbohidratos, principalmente de la secreción y acción de la insulina, pues es conocido que *KCNJ11* interacciona con *ABCC8* y otros genes mediando la correcta sensibilidad del canal, esto apoyado en el conocimiento de que variantes patogénicas con ganancia de función en este receptor de sulfonilurea causan diabetes mellitus y una forma de diabetes juvenil de inicio en la adultez ^{44,45,46,47}.

Otro gen blanco cuya disfunción se ha relacionado con la predisposición de padecer obesidad y diabetes mellitus tipo 2 en mujeres con síndrome de Turner es *ENPP1* (6q23.2), este es regulado por hsa-miR-221-5p. Meyre y colaboradores en 2005⁴⁸ demostraron que variantes polimórficas en la secuencia del transcrito conferían un riesgo incrementado de cursar con intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo 2 en población pediátrica con obesidad asociado a un incremento en los valores séricos de la proteína soluble ENPP1, sugirieron un posible mecanismo molecular común para la resistencia a la insulina y el desarrollo de DM2⁴⁸. En caso de confirmarse por método cuantitativo y funcional que hsa-miR-221-5p se encuentra sub expresado en sangre periférica de niñas con ST, la especulación de una probable desregulación de en la expresión de *ENPP1* con incremento sérico secundario podría explicar de forma parcial un posible desequilibrio en el mecanismo de la sensibilidad a la insulina que pudiera predisponer al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en estas mujeres.

El tercer miRNA localizado en cromosoma X que mostró una expresión diferencial en 45,X con respecto a 46,XX fue hsa-miR-652-5p con locus Xq23, también resultó estar sub expresado, sin embargo, al momento de realizar una búsqueda bibliográfica de los posibles blanco validados a los que regula y su implicación en alguno de los datos fenotípicos de síndrome de Turner no encontramos una hipotética relación directa. Sin embargo, *RSPO2*, un gen localizado en 8q23.1, podría estar desregulado en ciertas etapas del desarrollo embrionario, específicamente, a nivel esquelético. Nakajima et al

en 2016⁴⁹ demostraron que el incremento en la señalización de la vía de WNT3A mediada por RSPO2 inhibe la diferenciación de los condrocitos. De esta forma podríamos especular que al encontrarse sub expresado hsa-miR-652-5p existiría cierta alteración en en la diferenciación temprana de los condrocitos causada por una sobre estimulación de la vía de señalización de WNT3A en mujeres con síndrome de Turner⁴⁹.

Rajpathak y sus colaboradores en 2017⁴² fueron los primeros en informar que 5 miRNAs localizados en cromosoma X estuvieron diferencialmente expresados, en contraste con nuestro estudio, ellos evaluaron fibroblastos de una sola mujer adulta 45,X comparado con fibroblastos de una mujer 46,XX mediante la técnica de análisis global del genoma llamada RNA secuenciación de alto desempeño que tiene como una de sus desventajas detectar incluso miRNAs aún no reconocidos, en el presente estudio comparamos el promedio de la expresión de dos grupos independientes (no una sola persona) en sangre periférica mediante otra técnica distinta pero con el mismo objetivo y que detecta solo aquellos miRNAs maduros ya clasificados. Esto es necesario tomarlo en cuenta dado que se sabe que la expresión de los miRNAs es tejido y edad dependiente, siendo la sangre periférica un reflejo del estado fisiológico/patológico de la totalidad del organismo del donador de la muestra⁵⁰.

3 de los 5 miRNAs diferencialmente expresados informados por Rajpathak en 2017⁴² se encuentran localizados en brazo corto de cromosoma X, específicamente son hsa-miR-23c (Xp22.12), hsa-miR-222-5p (Xp11.3) y hsa-miR-6089 (Xp22.3), no coinciden con nuestros dos miRNAs ya descritos, posiblemente por el tejido analizado y la técnica utilizada en cada trabajo, sin embargo, requerimos precisar que tomando en cuenta la totalidad de los miRNAs analizados por ambos grupos de investigación, el número de miRNAs localizados en brazo corto de cromosoma X diferencialmente expresados es bajo y en proporción similar, esto sugiere que la aneuploidía de cromosomas sexuales causa un perfil de expresión global alterado tanto de miRNAs como de genes localizados en los distintos cromosomas que conforman la totalidad del genoma humano. En resumen, en este sub tema de la discusión, exponemos dos fortalezas de nuestro estudio y una evidente debilidad en comparación con el único estudio publicado en la literatura internacional. La primera de las fortalezas,

corresponde al hecho de haberse realizado un análisis global de expresión de miRNAs maduros y plenamente registrados en un grupo de comparación y no solo en una sola muestra (persona) y la segunda ventaja es el tejido analizado, es decir, la sub expresión de hsa-miR-221-5p y hsa-miR-660-3p en sangre periférica pudiera reflejar de una forma más directa una posible desregulación en la función de *KCNJ11* mismo gen que no fue reportado diferencialmente expresado en 45,X por Rajpathak en 2014²⁴ ya que el tejido analizado fue fibroblastos tanto en el trabajo publicado en 2014 como 2017⁴² de este mismo autor. La debilidad evidente del trabajo pero que a la vez se vuelve en una ventana de oportunidad es la necesidad de validar nuestros resultados con una técnica cuantitativa como qRT-PCR y posterior demostración en modelos funcionales.

Debido a lo demostrado en diversos trabajos de investigación,^{24,25,42} se puede establecer que los miRNAs y sus blancos validados que se encuentran expresados de forma diferencial, participan en rutas biológicas implicadas en el fenotipo de pacientes con síndrome de Turner, es por ello que decidimos ampliar el análisis de nuestros resultados en el contexto bibliográfico actual y propusimos otros posibles miRNAs (no solo los ligados al cromosoma X) y genes candidatos susceptibles de ser validados para en futuros trabajos demostrar su implicación funcional en el origen del fenotipo de las mujeres afectadas.

miRNAs con expresión diferencial localizados en autosomas y regulación de genes blanco como candidatos responsables del fenotipo del síndrome de Turner

De acuerdo a nuestros resultados, un miRNA diferencialmente expresado entre los grupos de estudio que resultaría ser un candidato adecuado para validar con una técnica cuantitativa la sub expresión mostrada en sangre periférica de las niñas con 45,X es hsa-miR-34a-5p. El gen que codifica para este miRNA se localiza en 1p31.3 y mostró una disminución de la intensidad promedio de hibridación en niñas con síndrome de Turner, de acuerdo a figura 18 y 19 del apartado de resultados, regula a diferentes genes blanco que pudieran estar relacionados con el correcto

funcionamiento de la vía del desarrollo embrionario de NOTCH y TGF-B. Es conocido que una de las cardiopatías congénitas más frecuentemente descritas en síndrome de Turner es la aorta bivalva o aorta bicúspide²². Bajo el argumento en el que variantes patogénicas en estado heterocigoto en *NOTCH1* (localizado en 9q34, cuya función principal es junto al Factor de Crecimiento Transformante B, participar de forma clave en el proceso esencial para el desarrollo cardiaco llamado transición epitelio a mesénquima^{51,52}), afectan el desarrollo temprano de la válvula aórtica y causan la enfermedad valvular aórtica 1 (válvula aórtica bicúspide, OMIM #109730), nosotros podríamos especular que hsa-miR-34a-5p al encontrarse sub expresado (FC -2.35) modificaría la actividad de *NOTCH1* pudiendo participar en el origen de esta cardiopatía congénita en niñas con ST. De forma fisiológica la activación de NOTCH modula vías de señalización de TGF-B mediada específicamente por SMAD, lo hace inhibiendo la activación de TGF-B/SMAD1 y TGF-B/SMAD2 debido a una disminución de la expresión de *SMAD1*, *SMAD2* y la de sus genes blanco, pero incrementa tanto la expresión del RNAm como la vida media de SMAD3 regulando a los genes blanco de *TGF-B/SMAD3* de forma específica⁵². En resumen, una hipótesis podría ser que la frecuencia de aorta bivalva en las niñas con ST podría estar relacionada a la sobre expresión y activación de *NOTCH1* debido a una pobre regulación negativa de hsa-miR-34a-5p que se encontró sub expresado en el grupo de estudio 45,X. Será necesario diseñar una metodología apropiada para demostrarlo en el futuro.

Existe una estrecha relación entre las vías moleculares de señalización de NOTCH y TGF-B, en esta última ruta biológica implicada en el desarrollo cardiovascular participan los receptores de TGF-B 1 y 2 (*TGFBR1* y *TGFBR2*), y que específicamente, mutaciones en estado heterocigoto en *TGFBR2* causan el fenotipo conocido como síndrome de Loews-Dietz tipo 2 (OMIM #610168), contando dentro de sus manifestaciones clínicas a nivel cardiovascular, la válvula aórtica bicúspide. Además, los individuos afectados cursan con un riesgo incrementado de desarrollar aneurisma y disección de la aorta ascendente. De forma reciente, se ha demostrado que las pacientes con síndrome de Turner poseen un riesgo mayor de presentar dilatación y disección aórtica en la etapa adulta, sobretodo cuando existe de forma

subyacente el antecedente de válvula aórtica bicúspide o coartación de la aorta⁵³. Debido a esto, se ha propuesto que la desregulación de la vía molecular de *TGF-B* podría ser un mecanismo compartido en el desarrollo y disección de aneurismas aórticos torácicos en individuos que cursan con válvula aórtica bicúspide⁵¹. Esta breve reseña nos permite comentar que Trolle y colaboradores en 2016²⁵ demostraron en mujeres adultas con síndrome de Turner una expresión diferencial en *ZFYVE9* comparado con controles 46,XX. Este gen se localiza en 1p32.3 y codifica para una proteína ancladora de SMAD2 y SMAD3 hacia el receptor de TGF-B, es decir, es un reclutador de SMAD2 para unirlo al TGFBR⁵⁴. Es por ello que Trolle y colaboradores²⁵ sugirieron que la posible desregulación de la vía de *TGF-B* mediado por la expresión diferencial de *ZFYVE9* podría contribuir al proceso de dilatación aórtica en mujeres 45,X. En nuestro trabajo encontramos sub expresado (FC -1.54) a hsa-miR-6856-5p ubicado en 9q34.12 y que dentro de sus blancos validados se encuentra *ZFYVE9* por lo que pudiéramos sugerir como un candidato a validar con técnica cuantitativa y posteriores ensayos funcionales la implicación de hsa-miR-6856-5p en el desarrollo de aneurismas aórticos con válvula aórtica bicúspide en mujeres con síndrome de Turner. De forma interesante, hsa-miR-6856-5p y hsa-miR-34a-5p regulan de manera conjunta a *TGFBR2* y dado que ya se había comentado que hsa-miR-34a-5p (sub expresado en nuestro grupo 45,X) regula a *NOTCH1*, podríamos especular que ambos miRNAs sub expresados en el presente trabajo pudieran participar de forma conjunta en una posible desregulación de la vía de señalización de *NOTCH1* y *TGF-B* en el desarrollo de esta cardiopatía congénita y complicación vascular de las mujeres con síndrome de Turner.

Tanto la coartación de la aorta como la aorta bivalva han sido descritas como parte del fenotipo de una condición clínica llamada síndrome de Kabuki⁵⁵. Este trastorno cursa con heterogeneidad de locus, dado que mutaciones heterocigotas con pérdida de función en *KMT2D* localizado en 12q13.12 causan el síndrome de Kabuki tipo 1 (OMIM #147920) y el tipo 2 (OMIM #300867) es originado por mutaciones heterocigotas en *KDM6A* localizado en Xp11.3. Los individuos afectados (ambos sexos) pueden mostrar ciertas coincidencias clínicas con el síndrome de Turner entre

las que destacan además de la cardiopatía congénita, el aspecto craneofacial, talla baja y malformaciones congénitas genitourinarias⁵⁵. De forma reciente, Bogershausen y colaboradores en 2016⁵⁶, estudiaron a 3 mujeres con síndrome de Turner establecido por cariotipo con características clínicas similares a las del síndrome de Kabuki, se descartaron variantes patogénicas en la secuencia de los genes *KMT2D* y *KDM6A*. Comentaron que la causa de la similitud fenotípica entre el síndrome de Turner y el síndrome Kabuki permanecía desconocida⁵⁶. Nuestro trabajo mostró una sub expresión de hsa-miR-34a-5p en niñas 45,X vs 46,XX, esto a su vez, podría desregular la transcripción de *KMT2D* que resulta ser uno de sus genes blanco y de alguna forma, junto a *NOTCH1* y *TGFBR2* (también blancos validados de hsa-miR-34a-5p) podrían ser sustento de una hipótesis de investigación, en la que especulamos, que tanto la expresión anormal de *KMT2D* y la ausencia física de un alelo de *KDM6A* (localizado en Xp11.3) en niñas con síndrome de Turner podrían ser una posible explicación de la similitud de fenotipos entre estas dos condiciones clínicas, principalmente en lo cardíaco.

Proponemos que a la luz de nuestros resultados y contrastados con la literatura actual (donde se ha demostrado que la monosomía del X causa una repercusión genómica global), este perfil de expresión diferencial de los miRNAs analizados (tanto ligados al cromosoma X como autosómicos) podría representar un factor clave que contribuya a explicar de forma hipotética y biológicamente plausible el origen molecular de ciertas manifestaciones clínicas de las mujeres con síndrome de Turner.

CONCLUSIONES

Posterior a un análisis global de expresión de miRNAs localizados a lo largo del genoma de niñas con diagnóstico de síndrome de Turner (45,X) y de niñas sanas (46,XX) en sangre periférica, de los 89 miRNAs que mostraron un perfil de expresión diferencial significativo entre los grupos, solo 2 de los 38 miRNAs localizados en Xp11.2-pter se encontraron sub expresados, estos fueron, hsa-miR-221-5p y hsa-miR-660-3p.

Sugerimos que la sub expresión de hsa-miR-221-5p, localizado en Xp11.2-pter podría mediar una posible disfunción de la regulación del metabolismo de la glucosa y predisponer al desarrollo de diabetes mellitus en mujeres con síndrome de Turner mediante la vía molecular de *KCNJ11* y *ENPP1*.

De acuerdo estas conclusiones del trabajo, nuestro equipo sugiere progresar hacia una siguiente etapa de investigación donde podamos validar nuestros hallazgos y proponer un diseño metodológico adecuado que permita confirmar la participación de la mayoría de las vías moleculares implicadas en algunas de las características fenotípicas de las mujeres con síndrome de Turner, permitiendo así una mejor comprensión de su fisiopatología y promover que el conocimiento científico obtenido sea de utilidad en un tratamiento integral e ideal en esta población.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Davenport M. Approach to the Patient with Turner Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1487–1495, 2010.
- 2.-López-Muñoz E, Hernández-Zarco A, Hernández-Peñafiel A. Implicaciones clínicas del síndrome de Turner en la fertilidad y el embarazo. *Ginecol Obstet Mex* 2012;80(8):521-527.
- 3.-Turner HH: A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology* 23:566-578,1938.
- 4.- Hennekam CM, Krantz ID, Allanson JE, Gorlin's Syndromes of the Head and Neck. Chromosomal Syndromes p77-82. Fifth Edition, Oxford University Press, 2010.
- 5.-Canto P, Galicia N, Söderlund D, et al. Screening for mutations in the SRY gene in patients with mixed gonadal dysgenesis or with Turner syndrome and Y mosaicism. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 115 (2004) 55–58.
- 6.-Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med* 2004;351:1227-1238
- 7.-Guía de Práctica Clínica Diagnóstico, Tratamiento y Cuidado de la Salud en niñas y mujeres con Síndrome de Turner. México: Secretaría de Salud, 2012.
- 8.-Wolff D, Van Dyke D, Powell C. Laboratory guideline for Turner syndrome. *Genet Med* 2010;12(1):52–55.
- 9.-Bondy CA. Care of Girls and Women with Turner Syndrome: A Guideline of the Turner Syndrome Study Group. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007. 92(1):10–25
- 10.- Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet* 1977;29:94–7.
- 11.-Canto P, Kofman-Alfaro S, Zenteno JC. et al. Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45,X karyotype and Y chromosome sequences. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 150 (2004) 70–72.
- 12.-Uematsu A, Yorifuji T, Muroi J et al. Parental Origin of Normal X Chromosomes in Turner Syndrome Patients With Various Karyotypes: Implications for the Mechanism Leading to Generation of a 45,X Karyotype. *American Journal of Medical Genetics* 111:134–139 (2002)
- 13.-Hook E, Warburton D. Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. *Hum Genet* (2014) 133:417–424
- 14.-Zhong Q, Layman LC. Genetic considerations in the patient with Turner syndrome--45,X with or without mosaicism. *Fertil Steril*. 2012 Oct;98(4):775-9.
- 15.-Van den Berg, I. M., Laven, J. S. E., Stevens, M., Jonkers, I., Galjaard, R.-J., Gribnau, J., van Doorninck, J. H. X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos. *Am. J. Hum. Genet.* 84: 771-779, 2009.

- 16.-Lopes AM, Burgoyne PS, Ojarikre A. et al. Transcriptional changes in response to X chromosome dosage in the mouse: implications for X inactivation and the molecular basis of Turner Syndrome. *BMC Genomics* 2010, 11:82.
- 17.-Zinn AR, Tonk VS, Chen Z, et al. Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-p22.1. *Am J Hum Genet* 1998;63:1757–1766.
- 18.-Marchini A, Rappold G, Schneider KU 2007 *SHOX* at a glance: from gene to protein. *Arch Physiol Biochem* 113:116 –123.
- 19.-Castronovo C, Rossetti R, Rusconi D et al. Gene dosage as a relevant mechanism contributing to the determination of ovarian function in Turner syndrome. *Human Reproduction*, 2014. 29, 2 pp.368–379.
- 20.-Toniolo D. X-linked premature ovarian failure: a complex disease. *Curr Opin Genet Dev* 2006;6:293–300.
- 21.-Persani L, Rossetti R, Cacciatore C, Bonomi M. Primary ovarian insufficiency: X chromosome defects and autoimmunity. *J Autoimmun* 2009;33:35 – 41.
- 22.-Bondy C, Bakalov V, Cheng C. Bicuspid aortic valve and aortic coarctation are linked to deletion of the X chromosome short arm in Turner syndrome. *J Med Genet* 2013;50:662–665
- 23.-Rajpathak S and Deobagkar D. Evidence for epigenetic alterations in Turner syndrome opens up feasibility of new pharmaceutical interventions. *Curr Pharm Des.* 2013 Jul 19.
- 24.-Rajpathak SN, Vellarikkal SK, Patowary A. Human 45,X fibroblast transcriptome reveals distinct differentially expressed genes including long noncoding RNAs potentially associated with the pathophysiology of Turner syndrome. *PLoS One.* 2014 Jun 16;9(6).
- 25.-Trolle C, Nielsen MM, Skakkebaek A, Lamy P, Vang S, et al. Widespread DNA hypomethylation and differential gene expression in Turner syndrome. *Sci Rep.* 2016 Sep 30;6:34220. doi: 10.1038/srep34220.
- 26.-Kawahara Y. Human diseases caused by germline and somatic abnormalities in microRNA and microRNA-related genes. *Congenital Anomalies* 2014; **54**, 12–21
- 27.-Dai R and Ahmed A. Sexual dimorphism of miRNA expression: a new perspective in understanding the sex bias of autoimmune diseases. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2014;10 151–163.
- 28.-Siomi H, Siomi MC. 2010. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell* 38:323–332.
- 29.-Ha M. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Aug;15(8):509-24.
- 30.-Cai Y, Yu X, Hu S, A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2009 Dec;7(4):147-54.
- 31.-Phuah NH, Nagoor NH. Regulation of MicroRNAs by Natural Agents: New Strategies in Cancer Therapies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:804510. Epub 2014 Sep.
- 32.-Kelly BN, Haverstick DM, Lee JK Circulating microRNA as a biomarker of human growth hormone administration to patients. *Drug Test Anal.* 2014 Mar;6(3):234-8

- 33.-Tassano E, Di Rocco M, Signa S, Gimelli G. 2013. De novo 13q31.1-q32.1 interstitial deletion encompassing the miR-17-92 cluster in a patient with Feingold syndrome-2. *Am J Med Genet A* 161A:894–896.
- 34.-Palacios-Reyes C¹, Espinosa A, Contreras A et al, Williams' neural stem cells: new model for insight into microRNA dysregulation. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013 Jun 1;5:1057-73.
- 35.-Elton TS, Sansom SE, Martin MM. 2010. Trisomy 21 gene dosage over-expression of miRNAs results in the haploinsufficiency of specific target proteins. *RNA Biol* 7:540–547.
- 36.-Xu Y, Li W, Chen H. et al Identification of dysregulated microRNAs in lymphocytes from children with Down syndrome. *Gene* 530 (2013) 278–286
- 37.-Vaz, C., et al., 2010. Analysis of microRNA transcriptome by deep sequencing of small RNA libraries of peripheral blood. *BMC Genomics* 11, 288.
- 38.-Audic, S., Claverie, J.M., 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 7, 986–995.
- 39.-Sui W, Ou M, Chen J, et al. microRNA expresión profile of peripheral blood mononuclear cells of Klinefelter syndrome. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012, 4,825-831.
- 40.-Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014 42:D68-D73. <http://www.mirbase.org>
- 41.- Khalifa O, Pers YM, Ferreira R, Sénéchal A, Jorgensen C, Apparailly F, Duroux-Richard I. X-Linked miRNAs Associated with Gender Differences in Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci.* 2016 Nov 8;17(11). pii: E1852.
- 42.-Rajpathak SN, Deobagkar DD, Micro RNAs and DNA methylation are regulatory players in human cells with altered X chromosome to autosome balance. *Sci Rep.* 2017 Feb 24;7:43235. doi: 10.1038/srep43235.
- 43.-Pritchard CC, Cheng HH, Tewar M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Rev Genet* 2012; 13: 358-369.
- 44.-Lin, Y.-W., Bushman, J. D., Yan, F.-F., Haidar, S., MacMullen, C., Ganguly, A., Stanley, C. A., Shyng, S.-L. Destabilization of ATP-sensitive potassium channel activity by novel *KCNJ11* mutations identified in congenital hyperinsulinism. *J. Biol. Chem.* 2008, 283: 9146-9156,.
- 45.-Gloyn, A. L., Pearson, E. R., Antcliff, J. F., Proks, P., Bruining, G. J., Slingerland, A. S., Howard, N., Srinivasan, S., Silva, J. M. C. L., Molnes, J., Edghill, E. L., Frayling, T. M., and 13 others. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *New Eng. J. Med.* 350: 1838-1849, 2004.
- 46.-Bonfond, A., Philippe, J., Durand, E., Dechaume, A. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified *KCNJ11* as the thirteenth MODY gene. *PLoS One* 7: e37423, 2012.
- 47.-Shima KR, Usuda R, Futatani T, Akahori H, Kaneko S, Yorifuji T, Takamura T. Heterogeneous nature of diabetes in a family with a gain-of-function mutation in the ATP-binding cassette subfamily C member 8 (*ABCC8*) gene. *Endocr J.* 2018 Aug 1. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0054.

- 48.-Meyre D, Bouatia-Naji N, Tounian A, Samson C, Lecoeur C, et al. Variants of *ENPP1* are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nature genetics* (2005) 37: 863–867.
- 49.-Nakajima, M., Kou, I., Ohashi, H., Genetic Study Group of the Investigation Committee on the Ossification of Spinal Ligaments, Ikegawa, S. Identification and functional characterization of *RSPO2* as a susceptibility gene for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Am. J. Hum. Genet.* 99: 202-207, 2016.
- 50.-Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, López-Berestein G. MicroRNAs in body fluids, the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011. 8:467-477.
- 51.-Martin PS, Kloesel B, Norris RA, Lindsay M, Milan D, Body SC. Embryonic Development of the Bicuspid Aortic Valve. *J Cardiovasc Dev Dis.* **2015** Dec;2(4):248-272. doi: 10.3390/jcdd2040248.
- 52.-Fu Y., Chang A., Chang L., Niessen K., Eapen S., Setiadi A., Karsan A. Differential regulation of transforming growth factor β signaling pathways by notch in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2009;284:19452–19462. doi: 10.1074/jbc.M109.011833.
- 53.-Wong SC, Cheung M, Zacharin M. Aortic dilatation and dissection in Turner syndrome: what we know, what we are unclear about and what we should do in clinical practice?. *Int J Adolesc Med Health.* 2014;26(4):469-88. doi: 10.1515/ijamh-2013-0336.
- 54.-Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., Wrana, J. L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF-beta receptor. *Cell* 95: 779-791, 1998.
- 55.-Adam MP, Hudgins L, Hannibal M. Kabuki Syndrome. 2011 Sep 1 [Updated 2013 May 16]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62111/>
- 56.-Bogershausen, N., Gatinois, V., Riehmer, V., Kayserili, H., Becker, J., Thoenes, M., Simsek-Kiper, P.O., Barat-Houari, M., Elcioglu, N.H., Wiczorek, D. et al. (2016) Mutation update for Kabuki syndrome genes *KMT2D* and *KDM6A* and further delineation of X-linked Kabuki syndrome subtype 2. *Hum. Mutat.* 37, 847–864



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN
SALUD**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(Niñas con ST)**

Nombre del estudio:

“Diferencia en los perfiles de expresión de miRNAs localizados en Xp11.2-pter en niñas con síndrome de Turner”

Lugar y fecha:

México, Distrito Federal, UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS

Número de registro:

R-2014-3603-35

Justificación y objetivo del estudio:

¿Por qué se realiza esta investigación?

De forma normal, los seres humanos estamos constituidos por células que son los ladrillos que conforman nuestro cuerpo, cada una de las células contienen el material de la herencia empaquetado en 46 estuches llamados cromosomas. En niñas sanas se identifican 2 cromosomas “X” (46,XX). El síndrome de Turner está causado por la falta de un cromosoma X que se observa en un estudio de la sangre (cariotipo) como 45,X, es decir, hace falta el material de la herencia contenido en un estuche llamado cromosoma “X”.

Mediante esta carta invitamos a participar a su hija así como a otras 7 más en este estudio de investigación para conocer si una parte que integra la información de la herencia de su hija quien cursa con el diagnóstico de síndrome de Turner se encuentra presente en mayor o menor medida en comparación con niñas de una edad parecida que no padecen síndrome de Turner.

El propósito del estudio es conocer si hay alguna diferencia o no en la forma en la que se expresa esta información de la herencia entre las niñas con el síndrome de Turner y las niñas sin esta enfermedad, saberlo podría ayudarnos a continuar investigando las causas por las cuales algunas niñas con síndrome de Turner están más graves que otras niñas que tienen el mismo síndrome, esto último, es objetivo de un posible estudio futuro.

Procedimientos:

¿Qué procedimiento se realizará?

Si ustedes son derechohabientes del IMSS y su hija tiene entre 6-16 años de edad y además ha sido diagnosticada de síndrome de Turner por resultado de cariotipo 45,X y/o vigilada por el mismo diagnóstico en el servicio de Genética y/o Endocrinología del Hospital de Pediatría de este Centro Médico podría ser incluida en el estudio. Los procedimientos que llevaremos a cabo en caso de que acepten participar en el estudio al firmar esta carta de consentimiento informado son:

- 1.- Realizar unas preguntas de los datos personales como nombre, afiliación, edad, fecha y lugar de nacimiento, dirección y teléfono actuales.
- 2.- Llenar la hoja de recolección de datos que incluye información de la condición clínica de su hija como lo son antecedentes de enfermedad del corazón al nacimiento o posterior a él, enfermedades de las defensas del cuerpo (autoinmunes), existencia o no de otras enfermedades relacionadas. Nos apoyaremos en el expediente clínico integrado en el Hospital de Pediatría. Finalmente procederemos al llenado del resto de la hoja de recolección de datos que incluye aspectos de la exploración física, como la descripción general de su aspecto externo.
- 3.- Se tomará una muestra de sangre de 3 mL de alguno de los brazos de la niña (el volumen tomado equivale a una cucharadita) y se procederá a la medición de la expresión de la información de la herencia en el laboratorio de la Unidad de Investigación de Genética Humana de este Hospital de Pediatría, la sangre restante se desechará, la información genética sólo se utilizará para esta investigación y después del análisis se destruirá.

Posibles riesgos y molestias:

Los 3 mL de la muestra tomada equivalen a menos del 1% del total de sangre que circula por el cuerpo de su hija, por lo que el único riesgo al que podría estar expuesta es al piquete de la vena que se tendrá que realizar para obtener la muestra: dicho piquete es doloroso y puede ser molesto, en ocasiones podría quedar un moretón en el sitio de la punción, el cual es pasajero y no representa un riesgo mayor.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:

Ninguno de forma directa. El beneficio del estudio es para el avance del conocimiento en el área de la medicina y en particular de la Genética pues podría contribuir a documentar una posible línea de investigación en síndrome de Turner.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Debido a que los resultados que se obtendrán no tienen utilidad para el tratamiento o atención médica que recibirá su hija en el hospital, los resultados solo se entregarán en caso de que Usted los solicite.
Participación o retiro:	La participación de su hija es completamente voluntaria. Usted puede decidir en cualquier momento retirar del presente estudio a su hija sin que esto afecte de ninguna manera la atención médica o quirúrgica dentro del Hospital de Pediatría y del IMSS.
Privacidad y confidencialidad:	Toda la información de su hija será guardada de forma confidencial y se identificará únicamente por medio de claves en nuestra base de datos. Las únicas personas autorizadas para acceder a la información, son el Dr. Alan Cárdenas Conejo y el Dr. Miguel Ángel Villasís Keever.

No autorizo que se tome la muestra.

Sí autorizo que se tome la muestra para este estudio.

Investigador Responsable:

Dr. Alan Cárdenas Conejo (investigador responsable) al número de teléfono en control 5 (55) 56 27 69 00 Extensión 22281 o buscarle directamente en el consultorio 6 del Servicio de Genética Médica del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI y la dirección es Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores. Delegación Cuauhtémoc, México, D.F., CP 06720 También podrá acudir personalmente al 5to piso del Hospital de Pediatría a la oficina médica del Dr. Miguel Ángel Villasís Keever quien es el tutor principal del trabajo de investigación.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Declaración de Consentimiento Informado:

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio. También, he leído (o me han leído) el contenido de este formato. Se me ha brindado la oportunidad de realizar preguntas y aclarar mis dudas acerca de mi participación y he entendido de forma clara a cada una de las respuestas que el personal encargado me ha otorgado. Al firmar este consentimiento, estoy de acuerdo en que mi hija participe en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma de los padres, tutores o representantes legales

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Clave: 2810-009-013



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN
SALUD**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(SIN DIAGNÓSTICO DE ST)**

Nombre del estudio:

“Diferencia en los perfiles de expresión de miRNAs localizados en Xp11.2-pter en niñas con síndrome de Turner”

Lugar y fecha:

México, Distrito Federal, UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS

Número de registro:

R-2014-3603-35

Justificación y objetivo del estudio:

¿Por qué se realiza esta investigación?

De forma normal, los seres humanos estamos constituidos por células que son los ladrillos que conforman nuestro cuerpo, cada una de las células contienen el material de la herencia empaquetado en 46 estuches llamados cromosomas. En niñas sanas se identifican 2 cromosomas “X” (46,XX). El síndrome de Turner está causado por la falta de un cromosoma X que se observa en un estudio de la sangre (cariotipo) como 45,X, es decir, hace falta el material de la herencia contenido en un estuche llamado cromosoma “X”.

Mediante esta carta invitamos a participar a su hija así como a otras 6 más en este estudio de investigación para conocer si una parte que integra la información de la herencia de su hija se encuentra presente en mayor o menor medida en comparación con niñas de una edad parecida que padecen síndrome de Turner.

El propósito del estudio es conocer si hay alguna diferencia o no en la forma en la que se expresa esta información de la herencia entre las niñas con el síndrome de Turner y las niñas sin esta enfermedad como su hija, saberlo podría ayudarnos a continuar investigando las causas por las cuales algunas niñas con síndrome de Turner están más graves que otras niñas que tienen el mismo síndrome, esto último, es objetivo de un posible estudio futuro.

Procedimientos:

¿Qué procedimiento se realizará?

Para poder participar en el estudio su hija puede o no ser derechohabiente del IMSS y tener entre 6 y 16 años de edad, los procedimientos que llevaremos a cabo en caso de que acepten participar en el estudio al firmar esta carta de consentimiento informado son:

1.- Realizar unas preguntas de los datos personales como nombre, afiliación (en caso de ser derechohabiente), edad, fecha y lugar de nacimiento, dirección y teléfono actuales.

2.-Llenar la hoja de recolección de datos que incluye información general de la condición clínica de su hija como lo son antecedentes de enfermedad del corazón al nacimiento o posterior a él, enfermedades de las defensas del cuerpo (autoinmunes), y existencia o no de otras enfermedades. Finalmente procederemos al llenado del resto de la hoja de recolección de datos que incluye aspectos de la exploración física, entre ellos; peso, talla y la descripción general de su aspecto externo.

3.- Explicaremos qué significa el estudio del cariotipo así como los posibles resultados que de él pueden obtenerse. Se le conoce como la determinación de la fórmula cromosómica de su hija y busca establecer si la información de la herencia a nivel de los cromosomas corresponde al resultado 46,XX que interpretamos como el de una niña sin alteraciones a nivel cromosómico para esta resolución del estudio. Si su hija presentara un resultado diferente al esperado de 46,XX y en caso de que usted lo desee recibirá

	<p>un asesoramiento genético integral por el investigador principal para resolver todas las dudas que pudieran surgir al respecto.</p> <p>3.- Se tomará una muestra de sangre de 6 mL de alguno de los brazos de la niña (el volumen tomado equivale a dos cucharaditas), 3 mL serán utilizados para realizar el cariotipo por el personal de la Unidad de Investigación en Genética Humana. Con los segundos 3 mL de sangre obtenida se procederá a la medición de la expresión de la información de la herencia en el laboratorio ya citado de este Hospital de Pediatría.</p>		
Posibles riesgos y molestias:	Los 6 mL de la muestra tomada equivalen a menos del 1% del total de sangre que circula por el cuerpo de su hija, por lo que el único riesgo al que podría estar expuesta es al piquete de la vena que se tendrá que realizar para obtener la muestra: dicho piquete es doloroso y puede ser molesto, en ocasiones podría quedar un moretón en el sitio de la punción, el cual es pasajero y no representa un riesgo mayor.		
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Ninguno de forma directa. El beneficio del estudio es para el avance del conocimiento en el área de la medicina y en particular de la Genética pues podría contribuir a documentar una posible línea de investigación en síndrome de Turner.		
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Usted podrá solicitar el resultado del cariotipo al investigador responsable el cual está comprometido a ofrecerle un asesoramiento genético antes de la prueba, durante la misma y posterior a ella, solo en caso de que usted lo desee. En cuanto al resultado que se obtendrá de la expresión del material de la herencia, explicamos que no tienen utilidad para indicar el estado de salud actual de su hija o predecir una posible enfermedad, por lo que los resultados solo se entregarán en caso de que Usted los solicite.		
Participación o retiro:	La participación de su hija es completamente voluntaria. Usted puede decidir en cualquier momento retirar del presente estudio a su hija sin que esto afecte de ninguna manera la atención médica o quirúrgica dentro del Hospital de Pediatría y del IMSS en caso de ser derechohabiente.		
Privacidad y confidencialidad:	Toda la información de su hija será guardada de forma confidencial y se identificará únicamente por medio de claves en nuestra base de datos. Las únicas personas autorizadas para acceder a la información, son el Dr. Alan Cárdenas Conejo y Dr. Miguel Ángel Villasís Keever.		
En caso de colección de material biológico (si aplica):	<table border="0"> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: middle;"> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> </td> <td style="padding-left: 20px;"> <p>No autoriza que se tome la muestra.</p> <p>Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.</p> </td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<p>No autoriza que se tome la muestra.</p> <p>Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.</p>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<p>No autoriza que se tome la muestra.</p> <p>Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.</p>		
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:			
Investigador Responsable:	Dr. Alan Cárdenas Conejo (investigador responsable) al número de teléfono en control 5 (55) 56 27 69 00 Extensión 22281 o buscarle directamente en el consultorio 6 del Servicio de Genética Médica del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI y la dirección es Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores. Delegación Cuauhtémoc, México, D.F., CP 06720 También podrá acudir personalmente al 5to piso del Hospital de Pediatría a la oficina médica del Dr. Miguel Ángel Villasís Keever quien es el tutor principal del trabajo de investigación.		
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a:	Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx		

Declaración de Consentimiento Informado:

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio. También, he leído (o me han leído) el contenido de este formato. Se me ha brindado la oportunidad de realizar preguntas y aclarar mis dudas acerca de mi participación y he entendido de forma clara a cada una de las respuestas que el personal encargado me ha otorgado. Al firmar este consentimiento, estoy de acuerdo en que mi hija participe en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma de los padres, tutores o
representantes legales

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Clave: 2810-009-013



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN
SALUD

**CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO
(NIÑAS DE 8 AÑOS O MAYORES, CON ST)**

Nombre del estudio: **“Diferencia en los perfiles de expresión de miRNAs localizados en Xp11.2-pter en niñas con síndrome de Turner”**

Lugar y fecha: México, Distrito Federal, UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS

Número de registro: **R-2014-3603-35**

Buenos días, mi nombre es Alan Cárdenas Conejo y quiero invitarte a participar en un estudio de investigación que se está llevando a cabo en el Servicio de Genética y Endocrinología de este hospital de pediatría. Como ya te ha platicado tu Doctor(a) y tus papás, tu tienes en tu cuerpo una información de la herencia distinta a la de otras niñas que te hace estar más bajita de talla y venir al doctor más seguido, a esto se le conoce como síndrome de Turner. El objetivo de este estudio es conocer si una parte que integra tu información de la herencia se encuentra presente en mayor o menor medida en comparación con niñas de una edad parecida a la tuya que no tienen lo mismo que tu. Si aceptas participar en este estudio te tomaremos sangre de uno de tus brazos en una cantidad menor a la de una cucharadita mientras tu mamá o papá se encuentran a tu lado, el dolor será solo por un momento y será pasajero.

Tu participación no requiere que vengas más veces al hospital, ni tomarte más sangre para otros estudios.

La información que tomemos del expediente sólo la podré conocer yo y no la voy a compartir con nadie más.

Es importante que sepas que por tu participación no obtendrás algún beneficio o recompensa. Los resultados que vamos a obtener del análisis de tu sangre posiblemente puedan ayudarnos a conocer más acerca del origen de tu enfermedad.

Tu participación en este estudio es libre y voluntaria, si aceptas participar, toda la información será guardada de forma secreta y utilizada sólo para la investigación.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Firma del encargado de obtener el asentimiento Informado: Le he explicado el estudio al participante y he contestado todas sus preguntas. De forma absolutamente voluntaria ha aceptado participar en este estudio

Parentesco con el participante

Testigo 2

Parentesco con el participante



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN
EN SALUD

**CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO
(NIÑAS DE 8 AÑOS O MAYORES, SIN ST)**

Nombre del estudio: **“Diferencia en los perfiles de expresión de miRNAs localizados en Xp11.2-pter en niñas con síndrome de Turner”**

Lugar y fecha: México, Distrito Federal, UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS

Número de registro: **R-2014-3603-35**

Buenos días, mi nombre es Alan Cárdenas Conejo y quiero invitarte a participar en un estudio de investigación que se está llevando a cabo en el Servicio de Genética y Endocrinología de este hospital de pediatría. El objetivo de este estudio es conocer si una parte que integra tu información de la herencia se encuentra presente en mayor o menor medida en comparación con niñas de una edad parecida a la tuya que tienen una enfermedad que se llama síndrome de Turner.

Si aceptas participar en este estudio te tomaremos sangre de uno de tus brazos en una cantidad menor a la de dos cucharaditas mientras tu mamá o papá se encuentran a tu lado, el dolor será solo por un momento y será pasajero.

Tu participación no requiere que vengas más veces al hospital, ni tomarte más sangre para otros estudios.

Es importante que sepas que por tu participación no obtendrás algún beneficio o recompensa. Los resultados que vamos a obtener del análisis de tu sangre posiblemente puedan ayudarnos a conocer más acerca de origen de la enfermedad que afecta a otras niñas que se llama síndrome de Turner.

Tu participación en este estudio es libre y voluntaria, si aceptas participar, toda la información será guardada de forma secreta y utilizada sólo para la investigación.

Nombre y firma de la participante

Testigo 1

Nombre, Firma y Parentesco

Testigo 2

Nombre, Firma y Parentesco

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

He explicado el estudio y he contestado todas las preguntas de la participante. De forma absolutamente voluntaria ha aceptado participar en este estudio



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS
(NIÑAS CON SÍNDROME DE TURNER)

“Diferencia en los perfiles de expresión de miRNAs localizados en Xp11.2-pter en niñas con síndrome de Turner”

R-2014-3603-35

UMAЕ Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS

NOMBRE: _____ FOLIO: _____ CLAVE: _____

NSS. _____ DIRECCIÓN _____

TEL FIJO: _____ CELULAR (Padres): _____ Fecha y Lugar de Nacimiento: _____

ANTECEDENTE DE CARDIOPATÍA CONGÉNITA: SÍ: _____ ESPECIFIQUE: _____ NO: _____

ANTECEDENTE DE LINFEDEMA DE MANOS O PIES: SÍ: _____ LOCALIZACIÓN: _____ NO: _____

ANTECEDENTE DE ENFERMEDAD AUTOINMUNE: SÍ: _____ CUAL _____ NO: _____

OTRAS CONDICIONES RELACIONADAS: SÍ: _____ CUÁLES: _____ NO: _____

RESULTADOS DE ESTUDIOS DE LABORATORIO SI EXISTIERAN: _____

DATOS DE LA EXPLORACIÓN FÍSICA

Peso: _____ Percentila: _____ Talla: _____ Percentila: _____ Cráneo: _____ Epicanto: _____ Ptois: _____

Nevi: _____ Micrognatia: _____ Cuello corto y alado: _____ Implantación baja del cabello: _____

Teletelia: _____ Tórax en escudo: _____ Cúbito Valgo: _____ Acortamiento de 4to metacarpiano: _____

CARIOTIPO: _____



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS
(NIÑAS sin SÍNDROME DE TURNER)

“Diferencia en los perfiles de expresión de miRNAs localizados en Xp11.2-pter en niñas con síndrome de Turner”

R-2014-3603-35

UMAЕ Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS

NOMBRE: _____ FOLIO: _____ CLAVE: _____

NSS. _____ DIRECCIÓN _____

TEL FIJO: _____ CELULAR (Padres): _____ Fecha y Lugar de Nacimiento: _____

ANTECEDENTE DE ALGUNA PATOLOGÍA CONGÉNITA O POSTERIOR AL NACIMIENTO: SÍ: _____

ESPECIFIQUE: _____

NO: _____

DATOS GENERALES DE LA EXPLORACIÓN FÍSICA

Peso: ____ Percentila: ____ Talla: ____ Percentila: ____

CARIOTIPO: _____ RESULTADO DE EXPRESIÓN DE miRNAs: _____



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



"2014, Año de Octavio Paz".

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3603
HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, D.F. SUR

FECHA **30/06/2014**

DR. MIGUEL ANGEL VILLASÍS KEEVER

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

Diferencia en los perfiles de expresión de miRNAs localizados en Xp11.2-pter en niñas con síndrome de Turner

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2014-3603-35

ATENTAMENTE

DR.(A). HERMILO DE LA CRUZ YÁÑEZ

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3603

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL