



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“ESTUDIO CLÍNICO, CITOGENÉTICO Y GENÓMICO EN PACIENTES CON
SÍNDROME DE TURNER: CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO”**

T E S I S

Para obtener el grado de Doctora en Biología Experimental presenta

M. C. Rehotbevely Barrientos Rios

matricula: 210380828
rehotbevely@gmail.com

Directores de Tesis

Externo:

Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

Interno:

Dr. Edmundo Bonilla González

Asesora:

Dra. Sara Frías Vázquez

Jurado:

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Presidente

Dr. José Antonio Velázquez Aragón

Vocal

Dra. Sara Frías Vázquez

Vocal

Dra. Alda Roció Ortiz Núñez

Secretaria

Ciudad de México, Septiembre 2021

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de POSGRADO DE CALIDAD (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-20031DPTNNN0020.

El presente trabajo se realizó como parte de los proyectos:

“Búsqueda de CNV en Individuos con Trisomía 21 y Monosomía X”.

Responsable Dra. Sara Frias Vázquez. Registro Instituto Nacional de Pediatría con el folio 084/2010.

“Estudio Clínico, Citogenético y Genómico en Pacientes con Síndrome de Turner: Asociación Fenotipo-Genotipo”. Responsable Dra. Nelly Altamirano Bustamante. Registro Instituto Nacional de Pediatría con el folio 057/2015.

Financiamiento: Recursos fiscales INP 084/2010 e INP 057/2015; FONCICYT 95419; FOSISS 142040.

Beca CONACyT 250639

Los miembros del jurado designados por la comisión del posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis doctoral titulada **“ESTUDIO CLÍNICO, CITOGENÉTICO Y GENÓMICO EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER: CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO”**

CÓMITE TUTORAL

Co-Directora externa

Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

Investigador en Ciencia Medicas D

Laboratorio de Citogenética

Instituto Nacional de Pediatría

Correo electrónico: ledactorres@gmail.com

Co-Director Interno

Dr. Edmundo Bonilla González

Laboratorio de Biología Celular

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Correo electrónico: mundo@xanum.uam.mx

Asesor:

Dra. Sara Frias Vázquez

Investigador en Ciencia Medicas F

Laboratorio de Citogenética

Instituto Nacional de Pediatría

Correo electrónico: sarafrías@iibiomedicas.unam.mx

FIRMAS DEL COMITÉ TUTORAL

Co-Directora externa

Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

Co-Director interno

Dr. Edmundo Bonilla González

Asesor

Dra. Sara Frlas Vázquez

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Citogenética Subdirección de Investigación Médica. Instituto Nacional de Pediatría. CDMX. México.

Bajo la dirección y asesoría de los investigadores: Dra. Leda Carolina Torres Maldonado, Dr. Edmundo Bonilla González, Dra. Sara Frías Vázquez

A todos ellos mi más profundo agradecimiento por sus enseñanzas, dedicación y constante apoyo para la realización y desarrollo de este trabajo.

Agradecimientos:

A la UAM-Iztapalapa, por ser mi *alma mater*

En especial al laboratorio de Biología Celular que me guiaron a este mundo de la investigación, por siempre agradecida.

Dra. Sara Frias Vázquez mi asesora de tesis, mi jefa en el laboratorio de Citogenética, la persona que desde que estoy ahí día con día aprendo mucho de ella, gracias por todo el apoyo, en todo. Eres una gran persona y muy inteligente.

Dra. Leda Torres Maldonado mi directora-Externa y compañera en el laboratorio, muchas gracias por la gran ayuda y por la paciencia que tienes con todos tus alumnos. Mil gracias.

Dr. Edmundo Bonilla, mi director interno y mi director de tesis de la licenciatura, gracias por todas tus enseñanzas, por siempre, gracias.

A mis compañeros de laboratorio de citogenética:

Bertha que desde que llegué eres muy amable y siempre me ayuda
Sandy, Alf, Ben, Uli, Moy, Oscar, Armando, Lucecita, Rosa E. y Charly.

Gracias a cada uno de ustedes.

Chivis y Mary Paz muchas gracias que día con día el estar en el
laboratorio me hacen sentir muy bien, gracias por todos sus consejos
y por las divertidas que nos damos. Las quiero.

Por último al Dr. José Antonio Velázquez Aragón, mi gran amigo de
siempre, gracias por compartir de tu sabiduría conmigo, ayudarme
incondicionalmente en todo y por ser mi amigo.

Dedicatorias

Quiero dedicar en especial a Doña Pancracia Petronila (Rosalina Rios Navarrete), la persona que me regalo el 50% de su información genética y que desde que me conoció solo me ha dado alegrías, apoyo y felicidad. Gracias por ser mi mami, gracias por ser como eres, un gran ejemplo. Te amo.

Mi padre, sé que estarías orgulloso de mí.

Mis hermanos: la Heny, Francisco y la Betzy mis queridos hermanos aún a la distancia siempre unidos.

Gracias a los Nativos, por aceptarme como una nativa de ustedes. Mil gracias.

Celestino Flores a mi compañero de vida, la gran persona que durante muchos años es mi amigo, cómplice y que me apoya en todo lo que puede y que me ha dado los mejores regalos de mi vida a Noely Lorena y Ángel Salvador. Gracias por ser parte de mi vida. Los amo.

RESUMEN

Introducción. El Síndrome de Turner (ST), es una de las alteraciones cromosómicas más frecuente en niñas, su incidencia es aproximadamente de 1/2,500 nacidas vivas. El cariotipo más común es el 45,X. Las pacientes con ST presentan diferentes características clínicas como talla baja, implantación baja de cabello, disgenesia gonadal, tórax ancho y nevos. También presentan diferentes patologías que deterioran su calidad de vida como son malformaciones cardíacas y renales, endócrinas-metabólicas como tiroiditis, diabetes mellitus y densidad mineral ósea baja. El fenotipo en ST podría influenciarse por la presencia de líneas celulares crípticas que por citogenética convencional no se detectan, por la presencia de variantes en el número de copias (VNC) y por variantes de un solo nucleótido (VSN) en algunos genes candidatos como *VDR*, *KL*, *CYP27B1*, los tres relacionados con el metabolismo de la vitamina D, además del *PTPN22* que se ha asociado con predisposición a enfermedades autoinmunes.

Objetivo. Determinar si existe asociación entre variantes de un solo nucleótido (VSN) en los genes *VDR*, *KL*, *CYP27B1* y *PTPN22*, con el fenotipo clínico en pacientes con Síndrome de Turner

Material y Métodos. En el Instituto Nacional de Pediatría previo consentimiento informado se captaron 61 pacientes con ST y 69 controles femeninos, Se realizó el estudio clínico completo en las pacientes. Se realizó cariotipo con bandas G. Se obtuvo DNA genómico de sangre periférica de los pacientes y controles.

El DNA genómico se cuantificó utilizando el Nanodrop y se evaluó su calidad por electroforesis. En pacientes y controles se utilizó el ensayo KASP de LGC Genomics (<http://www.lgcgenomics.com/>) para genotipificar los siguientes VSN: *VDR* (rs7975232), *KL* (rs9536282), *CYP27B1* (rs4646536) y *PTPN22* (rs1599971). Las pacientes se agruparon de acuerdo a sus manifestaciones clínicas: cardíacas, renales, óseas y tiroideas y de acuerdo a su cariotipo. Se realizó la correlación de los VSN, el cariotipo y las manifestaciones clínicas en las pacientes con ST. El equilibrio de Hardy-Weinberg se analizó por prueba exacta de Fisher, la asociación de cada variante con el fenotipo se realizó por la prueba Armitage y la interacción génica entre las variantes se estudió por el método dimensionalidad multifactorial (MDR).

Resultados. De las 61 pacientes con ST, 40 presentaron un cariotipo 45,X; el resto con otros cariotipos. Encontramos una asociación significativa entre la malformación renal y la variante rs9536282 (*KL*) con un OR 17.8 (95% IC 1.661-479.134) $p=0.017$ y entre rs4646536 (*CYP27B1*) y DMO baja con un OR 6.667 (95% IC 1.971-45.79) $p=0.037$, estas variantes pueden tener efectos moderados sobre estas características, pero contribuyen a la variabilidad del fenotipo ST. Por otro lado, el análisis de interacción génica mostró relación entre las tres variantes de los genes: *KL* (rs9536282), *CYP27B1* (rs4646536) y *VDR* (rs7975232) relacionadas con el metabolismo de la vitamina D y la DMO baja en pacientes con ST. Nuestros resultados apoyan la idea de que el fondo genético de los pacientes con ST contribuye a la variabilidad clínica observada en ellos.

Conclusiones. Nuestros resultados sugieren que la variante rs9536282 en el gen KL puede estar asociada con malformaciones renales en pacientes con ST.

La variante rs9536282 en el gen KL puede ser un biomarcador temprano de las enfermedades renales crónicas y del trastorno mineral óseo en pacientes con ST.

Observamos que los genes KL, VDR, y CYP27B1 que están involucrados en el metabolismo de la vitamina D, parecen estar contribuyendo a la DMO baja en pacientes con ST.

Nuestros resultados muestran que las variantes genéticas de las pacientes con ST, contribuyen a la variabilidad de las características clínicas observadas en ellas.

ABSTRACT

Turner syndrome (ST) is a common genetic disorder. ST-phenotype includes short stature, gonadal dysgenesis, cardiac and kidney malformations, low bone mineral density (low-BMD) and thyroiditis. ST-phenotype varies from patient to patient and the cause is not clear, the genomic background may be an important contributor for this variability. Our aim was to identify the association of specific single nucleotide variants in the *PTPN22*, *VDR*, *KL*, and *CYP27B1* genes and vitamin D-metabolism, heart malformation, renal malformation, thyroiditis, and low-BMD in 61 Mexican ST-patients.

DNA samples were genotyped for VSNs: rs7975232 (*VDR*), rs9536282 (*KL*), rs4646536 (*CYP27B1*), and rs1599971 (*PTPN22*) using the KASP assay. Chi-square test under a recessive model and multifactorial dimensionality reduction method were used for analysis. We found a significant association between renal malformation and the rs9536282 (*KL*) variant and between rs4646536 (*CYP27B1*) and low-BMD, these variants may have modest effects on these characteristics but contribute to the variability of the ST phenotype. In addition, we identified gene-gene interactions between variants in genes *KL*, *CYP27B1* and *VDR* related to vitamin D-metabolism and low-BMD in ST-patients. Our results support the idea that the genetic background of ST-patients contributes to the clinical variability.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN:	1
1.1 Cariotipo del síndrome de Turner	2
1.2 Cuadro clínico en las pacientes con síndrome de Turner	4
1.2.1 Características clínicas asociadas al cariotipo en pacientes con síndrome de Turner.	9
2 ANTECEDENTES	10
2.1 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER.	11
2.1.1 DENSIDAD MINERAL ÓSEA BAJA:	11
2.1.2 ENFERMEDADES DE TIROIDES:	12
2.1.3 MALFORMACIÓN CARDIOVASCULAR	13
2.2 GENES CANDIDATOS RELACIONADOS CON LAS MANIFESTACIONES CLINICAS DE INTERÉS	14
2.2.1 GEN <i>KL</i> :	15
2.2.2 <i>CYP27B1</i>	17
2.2.3 GEN <i>VDR</i> :	18
2.2.4 GEN <i>PTPN22</i>	19
3 JUSTIFICACIÓN:	21
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	22
5 OBJETIVO GENERAL:	23
5.1 Objetivos particulares	23
6 HIPOTESIS:	23
7 MATERIAL Y MÉTODOS	24
7.1 Tipo de estudio:	24
Comparativo	24
Transversal	24
Observacional	24
Ambispectivo	24
7.2 Población de estudio	25
7.3 Extracción de DNA	27
7.4 Evaluación clínica de DMO (densidad mineral ósea):	28
7.5 Evaluación clínica de Tiroiditis:	29
7.6 Selección de VSN	32

7.7	La técnica de KASP	34
7.8	Análisis estadístico.	35
7.9	Análisis de interacciones gen-gen	36
8	RESULTADOS	36
9	DISCUSIÓN	42
10	CONCLUSIONES	46
11	ANEXOS	48
		48
11.1	HOJA DE CAPTURA DE DATOS	48
11.2	CONSENTIMIENTO INFORMADO	53
11.3	CARTA DE ASENTIMIENTO	58
12	REFERENCIAS:	63
13	ARTICULO PUBLICADO	68

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER	5
FIGURA 2 TPO-AD Y/O TG-AB SEROLOGIA POSITIVO DE PACIENTES	31
FIGURA 3 TÉCNICA DE KASP	35
FIGURA 4 VÍA METABÓLICA DE LA VITAMINA D DONDE SE OBSERVA QUE PARTICIPAN LOS GENES <i>CYP27B1</i> , <i>KL</i> Y <i>VDR</i>	46
TABLA 1. INCIDENCIA DE PACIENTES CON ST EN DIFERENTES POBLACIONES.	2
TABLA 2 FRECUENCIA DE CARIOTIPOS REPORTADAS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER	4
TABLA 3 FRECUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN PACIENTES CON SÍNTROME DE TURNER	6
TABLA 4 ALGUNOS GENES QUE SE ENCUENTRAN EN EL CROMOSOMA X Y QUE SE HAN ASOCIADO CON MANIFESTACIONES CLÍNICAS	10
TABLA 5 GENES Y VARIANTES EN LOS GENES <i>VDR</i> , <i>KL</i> Y <i>CYP27B1</i> DE LOS CUALES SUS PRODUCTOS PARTICIPAN EN LA VÍA METABÓLICA DE LA VITAMINA D Y UNA VARIANTE EN EL GEN <i>PTPN22</i>	14
TABLA 6 CRITERIOS DE LA ORGANIACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD	29
TABLA 7 PERFIL TIROIDEO Y VALORES NORMALES	30
TABLA 8 SELECCIÓN DE LAS VARIANTES DE UN SOLO NUCLEÓTIDO. FRECUENCIA DE ALELO MENOR Y PORCENTAJES EN DIFERENTES POBLACIONES	32
TABLA 9 SECUENCIAS FRANQUEADORAS DE LAS VARIANTES DE CADA GEN.	33
TABLA 10 LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN LAS PACIENTES CON ST EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO CON RESPECTO AL CARIOTIPO.	38
TABLA 11 ASOCIACIÓN DE VARIANTES <i>VDR</i> (<i>rs7975232</i>), <i>CYP27B1</i> (<i>rs4646536</i>) Y <i>PTPN22</i> (<i>rs1599971</i>) CON MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER.	40

TABLA 12 GENES QUE PARTICIPAN EN LA VÍA METABÓLICA DE LA VITAMINA D MUESTRAN INTERACCIONES, GEN-GEN QUE INFLUYEN EN EL ESTADO DE LA DMO EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER, SEGÚN LO IDENTIFICADO POR TÉCNICA MDR. 41

1. INTRODUCCIÓN:

El Síndrome de Turner (ST), es una de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en mujeres; se genera por la ausencia total o parcial del segundo cromosoma X con o sin líneas celulares diferentes (mosaicismo).

La incidencia del ST a nivel mundial es de 1 por cada 2,500 niñas nacidas vivas (NV) de acuerdo con la estadística internacional. Sin embargo, en algunas poblaciones la incidencia es más alta, por ejemplo en el 2009 Tan K.L realizó un estudio en pacientes con ST en Singapur donde reportó una frecuencia de 1 por cada 1180 nacidas vivas (Tan and Yeo 2009); en la India, la frecuencia es de 1 por cada 2500 niñas NV (Maiti and Chatterjee 2014), en Malasia es de 1 por 2000 niñas NV y en China es del 1 por 2000, ellos reportan que tienen un incremento de la mortalidad 3 veces mayor que la población general y una reducción de esperanza de vida de 13 años debido al gran número de complicaciones, principalmente cardiovasculares, densidad mineral ósea baja y tiroiditis, entre otras características clínicas que pueden llegar a presentar estas pacientes (Maiti and Chatterjee 2014), (Tan and Yeo 2009), Ver Tabla 1.

En México un estudio realizado en 2003 (Robles Valdés et al. 2003) reportó una incidencia de 1 afectada con ST por cada 2500 niñas nacidas, si consideramos

los datos del censo realizado por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática en el año 2020, en México contamos con 63.9 millones de mujeres por lo tanto se puede estimar que en el país existen 22992 mujeres con ST.

Tabla 1. Incidencia de pacientes con síndrome de Turner en diferentes poblaciones.

País	Frecuencia por niñas nacidas vivas	Referencia
Singapur	1 en 1180	(Tan KB, 2009)
Dinamarca	1 en 2130	(Naeraa RW, 1990)
India	1 en 2500	(Chattejee, 2013)
Malasia	1 en 2000	(Tan and Yeo 2009)
China	1 en 2500	(Cui et al. 2018)
México	1 en 2500	(Villanueva-Ortega et al. 2017)

1.1 Cariotipo del síndrome de Turner

La especie humana tiene un genoma que está constituido por 46 cromosomas que se presentan en dos juegos de 23 cromosomas. De cada par de cromosomas (conocidos como homólogos) se tiene un cromosoma de origen materno y el otro

de origen paterno que comparten la misma morfología en 22 de los pares llamados autosomas, también existe un par de cromosomas denominados sexo cromosomas, en la mujer son dos cromosomas X y en el hombre son un X y un Y. El cromosoma X de humano tiene un tamaño aproximadamente de 163 millones de bases y contiene aproximadamente 1170 genes (Ross et al. 2005).

El cariotipo del ST es variable, el más frecuente se caracteriza por la presencia de un solo cromosoma X. De acuerdo con diferentes reportes citogenéticos, el 50-60% de los pacientes con ST tienen un cariotipo 45,X, sin embargo, pueden encontrarse variaciones estructurales en el segundo cromosoma X, que incluyen deleciones del brazo corto (Xp-), isocromosomas y anillos; en todos estos casos, lo común en ST es la pérdida total o parcial de los brazos cortos del segundo cromosoma X. La monosomía X, puede estar presente sólo en algunas células del individuo lo que se considera un mosaico, los mosaicos pueden tener incluso presencia de derivados del cromosoma Y, Tabla 2 (Lin et al. 2019).

Las pacientes con ST que presentan una línea celular con cromosoma Y, tienen riesgo para desarrollar neoplasias gonadales benignas o malignas como: disgerminoma o gonadoblastoma (Kwon et al. 2017). Cualquier cromosoma marcador tiene que ser identificado citogenéticamente para excluir un cromosoma Y, los marcadores o mosaicos bajos que no sean detectables por citogenética convencional deben ser diagnosticados por técnicas moleculares como FISH (Hibridación *in situ* con fluorescencia) o PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Lopez et al. 1998).

Tabla 2. Frecuencia de cariotipos reportadas en pacientes con síndrome de Turner

Cariotipo	Porcentaje	Descripción
45,X	40-50%	Monosomía X
45,X/46,XX	15-25%	Mosaico con "XX"
45,X/47,XXX; 45,X/46,XX/47,XXX	3%	Mosaico con "Triple X" o trisomía X
45,X/46,XY	10-12%	Mosaico con "XY"
46,XX, del X(p22.3)	5%	Delección Xp
46,X,r(X)/46,XX	1%	anillo del cromosoma X

(Lin et al. 2019).

1.2 Cuadro clínico en las pacientes con síndrome de Turner

El ST es una alteración genética común caracterizada por talla baja, linfedema, tórax ancho, baja implantación de cabello y *pterygium coli*. La disfunción gonadal es otro hallazgo y se manifiesta como amenorrea e infertilidad, figura 1.

Las pacientes con ST tienen un riesgo significativamente más alto de padecer enfermedades, comparadas con la población general. Entre estas enfermedades se encuentra tiroiditis, diabetes mellitus, osteoporosis, malformaciones congénitas mayores, afecciones neurovasculares, cirrosis y cáncer rectal y de colon (Araújo et al. 2010), (Pietzner et al. 2014).

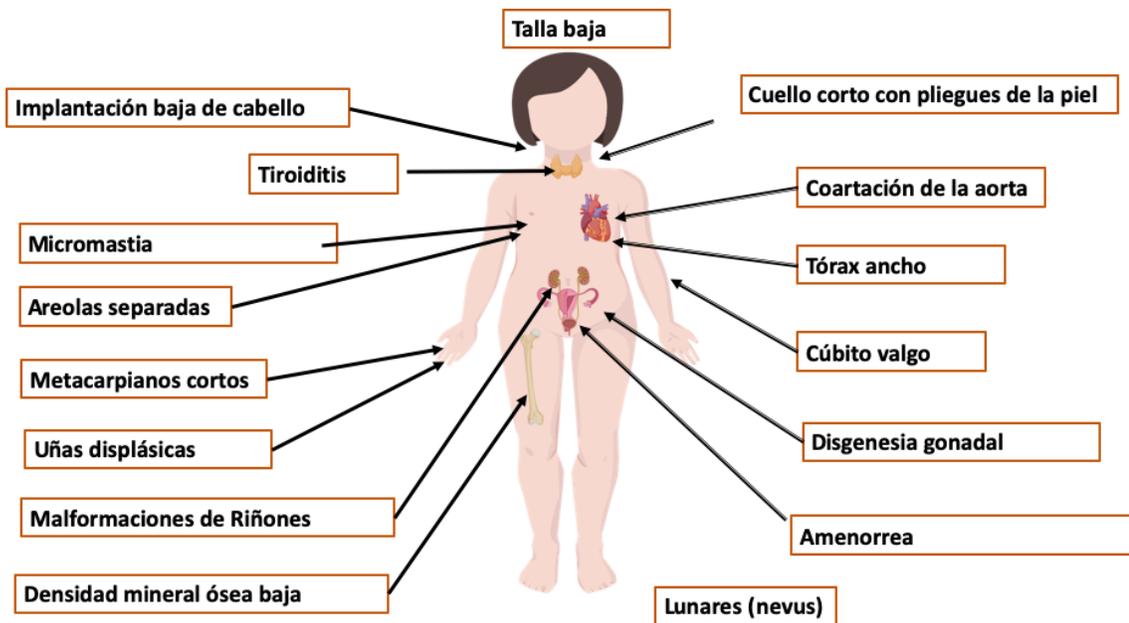


Figura 1. Características clínicas en pacientes con Síndrome de Turner

Sin embargo, las características clínicas en estas pacientes que deterioran principalmente la calidad de vida son las anomalías cardíacas, tanto congénitas como adquiridas, con una frecuencia del 50% con una alta tasa de morbilidad. Otra de las características frecuentes que deterioran la calidad de vida en estas pacientes son las malformaciones renales, tiroiditis y presentar densidad mineral ósea baja, entre otras, ver tabla 3. (Bondy 2007), (Araújo et al. 2010).

Tabla 3. Frecuencia de las características clínicas en pacientes con síndrome de Turner

CLÍNICA	FRECUENCIA (%)
MÚSCULO ESQUELÉTICA	
Talla baja	100
ENDOCRINOPATÍAS	
Intolerancia a la glucosa	15-50
Diabetes tipo 2	10
Diabetes Tipo 1	
Tiroiditis y hipotiroidismo	15-30
Hipertensión	50
ANOMALIAS HEPATICAS Y GATROINTESTINALES	
Enzima hepatica elevada	50-80
Enfermedad celiaca	8
Enfermedades inflamatorias del intestino	2-3
CARACTERISTICAS FENOTIPICAS	
OJOS	
Pliegue del epicanto	20
Miopía	20
Estrabismo	15
Ptosis (Descenso permanente del parpado superior)	10
OREJAS	
Infecciones de oído medio	60
Defectos al escuchar	30
Deformidad de oído externo	15
BOCA	
Paladar ojival	38
Micrognatia (Mandíbula pequeña)	60

CUELLO	
Cuello corto y ancho	40
<i>Pterigium colli</i> (cuello alado)	25
TORAX	
Torax ancho	30
Pezones invertidos	5
PIEL, UÑAS Y CABELLO	
Alopecia	5
Vitíligo	5
Displasia/distrofia de uñas	13
Edema de pies y manos	30
ESQUELÉTICO	
Retraso de la edad ósea	85
Densidad mineral ósea baja	50-80
<i>Cubitus valgus</i> (antebrazo se aleja del cuerpo)	50
Metacarpianos Cortos	37
<i>Genu valgo</i> (musculo y pierna desviados, angulo)	35
Escoliosis	35
Dermatoglifos característicos	35
CORAZÓN	
Valvula bicuspidé aortica	14-34
Coartación aorta	7-14
Dilatación Aortica/aneurisma	3-42
RENAL	
Riñón de Herradura (los 2 riñones fusionados)	10
Posición anormal o duplicación de pelvis renal, uretra y vasos	15
Aplasia renal (ausencia de riñón)	
TEJIDO NEUROCOGNITIVA Y PSICOSOCIAL	
Inmadurez Emocional	~ 40
Problema conductual y Psicológico	~40

(Claus H. Gravholt et al. 2017) modificada.

1.2.1 Características clínicas asociadas al cariotipo en pacientes con síndrome de Turner.

Las pacientes con ST presenta variabilidad en su fenotipo clínico, y hasta el momento no se conoce totalmente la correlación entre el genotipo y el amplio espectro de manifestaciones clínicas.

La correlación fenotípica con la condición citogenética se ha estudiado en diversas poblaciones. Por ejemplo, las pacientes con ST que presentan el mismo cariotipo 45,X, no presentan las mismas manifestaciones clínicas, el estudio de Sybert y McCauley (2004) muestra que 94 de 154 presentan enfermedades cardiacas y 84 de 181 pacientes presentan malformaciones renales. Un estudio en población brasileña de 27 pacientes ST 45,X, encuentra que todas ellas presentan talla baja, 12 presentan enfermedades cardiacas, 7 malformaciones renales y 6 presentan obesidad (Araújo et al. 2010), mientras que Bispo et al. (2013) reportan que, de 40 pacientes, 37 presentan talla baja y 10 presentan enfermedades cardiacas.

Se ha reportado es que algunas pacientes que presentan un mosaico 45,X/46,XX presentan un fenotipo menos severo, por otro lado, las pacientes que presentan un cariotipo 45,X/46,XY son un poco más altas dentro de los percentiles en pacientes con ST, además la presencia del cromosoma Y en estas pacientes con ST, es un factor de riesgo para el desarrollo de gonadoblastoma (Sybert and Mccauley 2004).

Se ha propuesto que la haploinsuficiencia de genes pseudoautosómicos, que se esperan encontrar en doble dosis por la presencia de dos cromosomas sexuales, puedan relacionarse con algunas de las características clínicas que desarrollan estas pacientes, como en el caso del gen *SHOX* que se encuentra dentro de los genes candidatos para explicar la talla baja de las pacientes (Kesler 2007).

Sin embargo, lo anterior no explica del todo el espectro fenotípico de las pacientes con ST, por lo que se requieren estudios de variantes a nivel genómico en ellas para tratar de explicar tal variabilidad (Hook and Warburton 2014) Tabla 4.

Tabla 4. Algunos genes que se encuentran en el cromosoma X y que se han asociado con manifestaciones clínicas en síndrome de Turner.

Fenotipo	Localización citogenética	Gen candidato
Talla baja	Zp22.33 (PAR1) XP11.2-P22.1	<i>SHOX</i> <i>ZFX</i>
Falla ovárica	Xp11.2-p22.1 Xp13-q26	<i>ZFX, USP9X</i> <i>DIAPH2</i>
Paladar ojival	Xp11.2-p22.1	
Tiroiditis autoinmune	Xp11.2-p22.1	
Anomalías esqueléticas	Xp22.3	<i>SHOX</i>

(Sybert and Elizabeth 2004) Modificado

2 ANTECEDENTES

2.1 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER.

Las variantes de un solo nucleótido (VSN) pueden ocurrir en uno de cada 1000 pares de bases, son comunes en el genoma humano y están involucrados en varias enfermedades humanas. Corresponden a alteraciones genéticas presentes en más del 1% de la población y pueden ubicarse en diferentes regiones del gen: en el promotor, en regiones codificantes y no codificantes. Las VSN en las regiones codificadora y promotora tienen más probabilidades de alterar la función del gen y en consecuencia, la proteína (Kidd et al. 2008).

Actualmente se sabe que existen diferentes VSN que podrían estar jugando un papel importante en la presentación de algunas características clínicas en las pacientes con ST que deterioran la calidad de vida de las pacientes, como son densidad mineral ósea baja, autoinmunidad y anomalías cardíacas, estas características deterioran la calidad de vida y están presentes con una frecuencia significativa en las pacientes con ST (Araújo et al. 2010)(Donato and Ferreira 2018).

2.1.1 DENSIDAD MINERAL ÓSEA BAJA:

De manera general las pacientes con ST tienen densidad mineral ósea (DMO) baja sin embargo, en algunos casos se pueden mantener los niveles normales si el paciente sigue un estilo de vida saludable con la práctica regular de ejercicio

físico, la introducción temprana de una dosis apropiada de estrógenos (terapia de reemplazo hormonal), así como calcio y vitamina D.

La vitamina D es una hormona esteroidea que regula el metabolismo óseo, la respuesta inmune, la proliferación y la diferenciación celular. En pacientes con ST, la deficiencia de vitamina D se asocia a un mayor riesgo de fracturas óseas, diabetes tipo 1 y 2, tiroiditis, hipertensión, enfermedades cardíacas y algunos padecimientos crónicos. Las variantes *Bsm1*, *FokI* y *Cdx2* del gen *VDR* se asocian con DMO baja y la detección temprana de estos polimorfismos podría ser útil para predecir la osteopenia grave en pacientes con ST (Peralta López et al. 2012), (Bianca Bianco et al. 2012).

2.1.2 ENFERMEDADES DE TIROIDES:

En relación a las manifestaciones autoinmunes, se conoce que las pacientes con ST presentan una mayor predisposición que la población en general (Jørgensen et al. 2010) y la edad de inicio es más temprana que la población en general, el promedio de inicio en pacientes ST es a los 10 años de edad aunque hay reportes de edad tan temprana como dos años (Mortensen et al. 2009), (Jørgensen et al. 2010), (Ban 2012), siendo las más comunes las relacionadas con la tiroides. Un estudio descriptivo mostró que las anomalías cardiovasculares (45%), la otitis (43%), tiroiditis 33% y la hipertensión (26.6%) fueron las alteraciones clínicas más frecuentes observadas en 42 pacientes con ST. Las variantes en los genes *VDR*

(rs11568820) con *genotipo GG* y *PTPN22* (proteína tirosina fosfatasa, no receptor tipo 22) (rs2476601) con *genotipo CT*, se encuentran asociadas con enfermedades tiroideas autoinmunes en pacientes con ST (B. Bianco et al. 2010).

2.1.3 MALFORMACIÓN CARDIOVASCULAR

Las afecciones cardiacas (congénitas o adquiridas), son una de las principales causas de morbilidad e incluso mortalidad de las pacientes con ST. Las malformaciones cardiacas más frecuentes en ST, son válvula aórtica bicúspide (BAV) (11%-50%) (Viuff MH, 2016) y coartación de la aorta (CoA) (11-35%) (Claus Højbjerg Gravholt et al. 1998), seguidos de HLHS (síndrome del corazón izquierdo hipoplásico), retorno venoso pulmonar parcial anómalo (PAPVR), elongación de transversales y arco aórtico. Los defectos del tabique auricular y ventricular (1 y 2%) suelen ser pequeños y poco frecuentes en pacientes con STy si están presentes, no suelen requerir reparación quirúrgica. Hay otros tipos menos frecuentes de cardiopatía en esta población, como cardiomiopatía hipertrófica, tetralogía de Fallot, conducto arterioso permeable y estenosis de la válvula aórtica o pulmonar (Donato and Ferreira 2018), y a lo largo de la vida el prolapso de la válvula mitral, hipertensión arterial, isquemia coronaria y aterosclerosis (Bondy 2007) (Araújo et al. 2010). Entre el 20%-50% de las pacientes ST adultas, tienen riesgo de cardiopatía coronaria, (Barreto et al. 2010) (Struwe et al. 2006).

2.2 GENES CANDIDATOS RELACIONADOS CON LAS MANIFESTACIONES CLINICAS DE INTERÉS

Se han realizado algunos estudios de asociación entre genes y algunas características clínicas en población en general y en pacientes con ST. Nosotros consideramos que los genes *KL*, *CP27B1*, *VDR* y *PTPN22* podrían estar jugando un papel importante en las características clínicas en las pacientes con ST, (tabla 5).

Tabla 5. Genes y variantes en los genes VDR, KL y CYP27B1 de los cuales sus productos participan en la vía metabólica de la Vitamina D y una variante en el gen PTPN22.

GEN	LOCUS	MANIFESTACIONES ST	SITIO EN QUE SE EXPRESA	REPORTADO EN ST	POBLACIÓN	AUTOR
<i>KL</i>	13q12	Insuficiencia renal crónica, Enfermedades arteriales coronarias	Hígado, Riñón, glándula para tiroidea, musculo esquelético, oído interno	no	Chinos, Japoneses	(Wu et al. 2020) (Nabeshima and Imura 2008), (Xu and Sun 2015)

<i>CYP27B1</i>	12q14.1	DMO baja Diabetes tipo 1	Riñón	no	Chinos, japoneses	Kujundzic; 2015, Clifton- Blingh, 2011, Bailey, 2007, Boglione, Morita; 2015
<i>VDR</i>	12q13.11	Diabetes tipo 2, insuficiencia cardiaca, enfermedades renales crónicas	Glándula paratiroidea, riñón,	Si	Argentinos	Brown, 1995, Uitterlinden, 2001, thakkinstian; 2004, Motohashi;; 2003, Willkinson;2000, Bianca; 2012
<i>PTPN22</i>	1p13.2	Enfermedades autoinmunes (diabetes tipo 1 y Tiroiditis)	Células T y linfocitos	si	Brasileños	Bondy;2007, Gonc; 2002, Ban 2010, Carlton; 2005

2.2.1 GEN *KL*:

KL se encuentra en el cromosoma 13q12, contiene 5 exones y 4 intrones y mide más de 50 kb. El transcrito del gen tiene un tamaño de 5.2 kb, por procesamiento alternativo se generan 2 transcritos, uno que da origen a una proteína transmembranal de 1012 a.a. y otro que origina una proteína de secreción de 549 a.a. (Matsumura et al. 1998).

El gen *KL* (*KL*) codifica para una proteína que participa en la vía metabólica de la vitamina D y se expresa predominantemente en el riñón (principalmente a nivel

de las células del túbulo distal), glándula paratiroidea, músculo esquelético, placenta, oído interno, páncreas y ovarios. Los ratones *KL*^{-/-} presentan alteraciones en órganos donde no hay expresión de *KL*, por lo que se planteó que su producto tiene una acción endocrina. (Struwe et al. 2006).

El gen *KL* participa en el metabolismo correcto de la vitamina D, sin embargo, actualmente se tiene poca información sobre los mecanismos reguladores de la expresión de *KL*. Sin embargo en ratas, la expresión de *KL* a nivel prenatal está prácticamente ausente, pero posteriormente al nacimiento sube significativamente (Mitchell et al. 2015), se ha observado en ratones que la administración de 1,25-dihidroxi vitamina D aumenta la expresión de *KL* en el riñón, también se ha demostrado que en ratones, el descenso del calcio extracelular aumenta la expresión de *KL* (Matsumura et al. 1998)(Nabeshima and Imura 2008). Actualmente se sabe que existen polimorfismos en el gen *KL* que están asociados a diferentes patologías como: insuficiencia renal crónica, enfermedades arteriales coronarias, descalcificación de la válvula aortica, y disminución de la densidad mineral ósea, el metabolismo de la glucosa y lípidos. (Shunsuke Yamada, M.D. 2016). Existen polimorfismos en el gen *KL* que se han asociado al envejecimiento (Xu and Sun 2015). Por otra parte, el polimorfismo rs9536282 se localiza en la región intrónica de *KL*, el HapMap reporta una frecuencia del alelo menor (MAF) de 0.14 en Mexicanos y ha sido asociado a la densidad mineral ósea y presión arterial en japoneses (Wu et al. 2020).

2.2.2 *CYP27B1*

También llamado como Citocromo P450, Familia 27, Subfamilia B, Polipéptido 1. Se localiza en el cromosoma 12q14.1 contiene 9 exones y 8 intrones codifica para un polipéptido de 508 a.a. Su producto forma parte de las enzimas del citocromo P450 y se localiza en la membrana interna mitocondrial y cataliza la hidroxilación de la 25-hidroxitamina D3 en la posición 1-alfa. Esta reacción sintetiza a la 1alfa, 25-dihidroxitamina D3, la forma activa de la vitamina D3, la cual se une al receptor de la vitamina D y con el cual regula el metabolismo del calcio. La actividad hormonal de la vitamina D3, 1, 25(OH)2D3 también actúa sobre el sistema inmune y la diferenciación celular (Feldman 1997), (Feldman and Malloy 2014).

Varios estudios analizan la asociación de genes del metabolismo de la vitamina D en los que se incluyen *KL*, *VDR* y *CYP27B1*. Algunos polimorfismos en este último gen han mostrado asociación con síndrome metabólico en varones adultos jóvenes (Cheng, 2015). Con respecto al sistema óseo, se ha asociado el polimorfismo rs10877012, ubicado en el promotor de *CYP27B1*, con un mayor riesgo a fracturas (Cliffon-Bligh, 2011). Este SNP tiene un efecto funcional pues causa una disminución de la expresión de *CYP27B1*. El polimorfismo rs10877012 tiene una frecuencia reportada en mexicanos de 0.35, y se ha reportado asociado a diabetes tipo 1 (Bailey, 2007), en respuesta a la terapia en pacientes con hepatitis B crónica (Boglione, 2015) y esclerosis múltiple (Alcina, 2013). En este estudio analizaron la asociación de VSN con la densidad mineral ósea, diabetes

tipo 1 y la presencia de enfermedades autoinmunes, los autores consideran que podrían ser nuevos marcadores genéticos de susceptibilidad a enfermedades autoinmunes (Rueda et al. 2008).

2.2.3 GEN *VDR*:

El déficit de vitamina D se ha asociado a distintas patologías, como la hipertensión, la diabetes e insuficiencias cardíacas, en pacientes con enfermedad renal crónica. La comprensión del papel que desempeña el receptor de la vitamina D (*VDR*) y los efectos de su activación ha cambiado drásticamente en los últimos años. Así, varios estudios han analizado los efectos diferenciales entre distintos activadores (agonistas) de los *VDR*. El gen *VDR* se localiza en el brazo largo del cromosoma 12q13.11 contiene 10 exones (8 exones codificantes) y 9 intrones, y codifica para una proteína de 427 a.a.

La respuesta de los diferentes órganos diana de la vitamina D depende no sólo de la cantidad y biodisponibilidad del receptor codificado por *VDR* (aspectos cuantitativos), sino también de cómo es dicho receptor. Los niveles intracelulares de *VDR* se regulan tanto por ligandos del *VDR* como por hormonas y factores de crecimiento que no unen *VDR*. La regulación, que afecta el control de la transcripción y la estabilización del RNAm del *VDR* así como la síntesis y degradación de la proteína, es específica en cada tejido o célula ya que el calcitriol regula a la alza la transcripción del *VDR* en la glándulas paratiroides y

el riñón y no en el intestino (Zhang et al. 2019).

La cantidad de *VDR* en la célula diana depende de muchos otros factores, como el estado de proliferación y diferenciación de la célula, las rutas celulares activadas en un determinado momento, así como la expresión diferencial de cofactores que intervienen en las acciones del *VDR* como factor de transcripción (Thakkinstian et al. 2004).

Es importante tanto la cantidad y disponibilidad de *VDR* como la calidad de éste. Se han descrito 14 mutaciones diferentes asociadas con raquitismo resistentes a vitamina D, también se han descrito hasta la fecha más de 14 polimorfismos diferentes en el gen *VDR* que pueden actuar modulando la respuesta a la vitamina D en los diferentes órganos diana. Se ha sugerido que los polimorfismos en este gen tienen una relación con diferentes aspectos del metabolismo óseo y de la glándula paratiroides, así como la asociación con diferentes enfermedades como es diabetes, insuficiencia cardiaca y enfermedad renal crónica. (Uitterlinden; 2001); (Thakkinstian; 2004).

2.2.4 GEN *PTPN22*

El gen *PTPN22* (protein tyrosin fosfatasa no receptor 22) se localiza en el cromosoma 1p13.2, contiene 19 exones y 18 intrones codificantes. El gen *PTPN22* codifica para una proteína de 807 a.a. es una fosfatasa específica de linfocitos que cataliza la desfosforilación intracelular en residuos de tirosina y de

esta manera contribuye a la inhibición de la activación de la células T. Se ha demostrado recientemente que algunos polimorfismos pueden causar ganancia de función enzimática de *PTPN22* que daría lugar a un aumento en el umbral para la activación de los linfocitos T. Esto podría causar un escape tímico de células T autorreactivas o una menor actividad de los linfocitos T reguladores, procesos que darían lugar a autoinmunidad. Todos estos hallazgos hacen que el gen *PTPN22* sea un gen candidato muy interesante para enfermedades autoinmunes.

Se ha reportado que las pacientes con ST presentan enfermedades autoinmunes (Bondy 2007), las más comunes son enfermedades relacionadas con la tiroides y diabetes mellitus (Nazli Gonc et al. 2002). En 2010 Bianco y cols. analizaron el polimorfismo rs2476601 en el gen *PTPN22* mediante PCR en tiempo real TaqMan, y encontraron que los genotipos CC (67.6%), CT (28.2) y TT (4.2%) en pacientes con ST y en el grupo control 82.8%, 16.1%, y 1.1% respectivamente con una $p=0.0043$. Los alelos C y T estuvieron presentes con una frecuencia respectivamente, de 81.7% y 18.3% en pacientes con ST ($P= 0.001$, $OR=2.22$, $IC\ 95\%=1.39-3.54$) y en 90.8% y 9.2% respectivamente en controles. (B. Bianco et al. 2010). Estos datos sugieren que en pacientes con ST, el gen *PTPN22* podría estar jugando un papel importante en la predisposición de enfermedades autoinmunes. La variante rs2476601 tiene una MAF muy baja en mexicanos (0.052) por lo que proponemos en este estudio analizar la asociación del SNP rs1599971 (MAF 0.49) que se localiza en el intrón 13 del gen *PTPN22* con la

presencia de enfermedades autoinmunes en un grupo de pacientes mexicanos con ST. La VSN ha sido reportada como asociada a enfermedades autoinmunes de la tiroides y el haplotipo en el que se ha reportado, asociado a artritis reumatoide (Carlton et al. 2005).

Por todo lo anterior, es posible que exista una asociación de variantes de un solo nucleótidos en los genes *VDR*, *KL* y *CYP27B1* de los cuales sus productos participan en la vía metabólica de la vitamina D, con la densidad mineral ósea. De la misma manera, es posible que exista asociación de variantes de un solo nucleótido en el gen *PTPN22* y la presencia de enfermedades autoinmunes.

3 JUSTIFICACIÓN:

El síndrome de Turner es una de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en niñas. El fenotipo en las pacientes con ST es variable y puede incluir manifestaciones que deterioran la calidad de vida, como los defectos cardiacos, renales, tiroiditis y especialmente en nuestra población las alteraciones metabólicas como diabetes mellitus, obesidad y baja reserva ósea.

Actualmente, no se tiene explicación de por qué hay tanta variabilidad genotípica en las pacientes con ST a pesar de saber algunas correlaciones cariotipo-fenotipo y saber que hay correlación entre haploinsuficiencia de algunos genes y algunas manifestaciones clínicas.

Lo anterior no explica la variabilidad en las pacientes con ST, es por ello que consideramos que el entorno genómico podría estar jugando un papel importante en la manifestación de las características clínicas de las pacientes con ST, en especial las VSN, que son muy frecuentes en todo el genoma, podrían contribuir de manera importante en la variabilidad de las características clínicas.

Es por ello que en este estudio se buscaron algunas VSN en los genes *VDR*, *KL*, *CYP27B1* y *PTPN22* y su asociación con algunas características clínicas que deterioran la calidad de vida de las pacientes con ST.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El ST esta es una entidad que presenta múltiples manifestaciones clínicas que afecta diferentes órganos y sistemas. Dentro de las manifestaciones clínicas de este síndrome se encuentran las malformaciones cardiacas, malformaciones renales, tiroiditis y DMO baja que aumentan la morbilidad y mortalidad en las pacientes con ST. Hasta el momento se desconoce la etiología genética que subyace a la presentación de las malformaciones cardiacas, malformaciones renales, tiroiditis y DMO baja en estas pacientes, y consideramos que pueden existir variantes genéticas que puedan aumentar la susceptibilidad de las pacientes con ST a presentar las características clínicas ya mencionadas.

Por lo anterior consideramos relevante realizar un estudio de asociación entre fenotipo y el genotipo en pacientes con ST mediante estudio clínico, citogenético y molecular.

5 OBJETIVO GENERAL:

Determinar si existe asociación entre variantes de un solo nucleótido (VSN) en los genes *VDR*, *KL*, *CYP27B1* y *PTPN22*, con el fenotipo clínico en pacientes con Síndrome de Turner.

5.1 Objetivos particulares

Realizar un análisis de asociación de algunas características clínicas en pacientes con ST y los polimorfismos VSN en los genes *VDR* (rs7975232), *KL* (rs9536282), *CYP27B1* (rs4646536), *PTPN22* (rs1599971).

Realizar un análisis de la interacción gen-gen entre los genes *VDR* (rs7975232), *KL* (rs9536282), *CYP27B1* (rs4646536), *PTPN22* (rs1599971).

6 HIPOTESIS:

Las pacientes diagnosticadas con Síndrome de Turner presentan una variabilidad fenotípica, aunque se han propuesto ciertas correlaciones cariotipo-fenotipo, también se sabe que el ST resulta de la haploinsuficiencia de genes pseudo autosómicos. Sin embargo, lo anterior no permite explicar la variabilidad fenotípica del todo en las pacientes con ST, es por eso que proponemos que pudiera estar asociada al entorno genómico, como variantes de un solo nucleótido que se encuentran en los genes *VDR*, *KL*, *CYP27B1* y *PTPN22*.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Tipo de estudio:

Comparativo

Transversal

Observacional

Ambispectivo

7.2 Población de estudio

Este estudio se realizó en el Instituto Nacional de Pediatría de la Ciudad de México, con la aprobación de los Comités de Ética Institucional e Investigación. Se obtuvo el consentimiento y/o asentimiento informado por escrito de todos los participantes, los padres o tutores firmaron el consentimiento en todos los casos y las pacientes mayores de 12 años firmaron su asentimiento. Anexos 1 y 2.

Las pacientes con sospecha clínica de ST fueron evaluadas por un genetista y un endocrinólogo pediatra, y presentaban cariotipo diagnóstico de ST, estudiamos 61 con ST, son menores de 18 años (mediana de 11 años de edad) y tienen ascendencia mexicana (padres y abuelos nacieron en México). El grupo control está compuesto por 69 mujeres fértiles con fenotipo y cariotipo normales con una mediana de 26 años. Las pacientes que hubieran sido transfundidas en los últimos de 3 meses a la invitación para la participación en el proyecto se excluyeron temporalmente.

Criterios de Inclusión para los casos:

- Pacientes con diagnóstico clínico con ST
- Cualquier cariotipo, asociado a ST
- Cualquier edad (Menores de 18 años)

- Firma de carta de asentimiento y/o consentimiento informado por padres o tutores

Criterios de Exclusión para los casos:

- Pacientes transfundidos en un periodo menos a tres meses (Se excluirán de manera temporal)
- Muestra de calidad y/o cantidad insuficiente

Criterios de Inclusión para controles:

- Mujeres con cariotipo 46, XX
- Que tengan hijos
- Cualquier edad
- Firma de consentimiento informado

Criterios de Exclusión controles:

- Mujeres que hayan presentado algún aborto espontáneo

7.3 Extracción de DNA

A todos los casos y controles se realizó la extracción de DNA mediante la técnica de precipitación salina con el kit de Qiagen™ (Dneasy), a partir de leucocitos de sangre periférica con EDTA como anticoagulante (3-5 ml). Las muestras de DNA se conservaron a 4°C hasta su análisis.

El procedimiento de la extracción del DNA es la siguiente manera, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 1.- Centrifugar la muestra de sangre periférica a 3000-3500 rpm por 20 min.
- 2.- Extraer la capa de leucocitos formada en la interfase del plasma y los glóbulos rojos, con una pipeta Pasteur, pasarla a un tubo de 13X100 limpio y seco.
- 3.- Al tubo con los leucocitos adicionarle RCLB (Red Cell Lysis Buffer) tratando de que se llenen las $\frac{3}{4}$ partes del tubo.
- 4.- Agitar vigorosamente la muestra en un vortex por cerca de 1 min.
- 5.- Centrifugar a 3500 rpm/10 min.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y agregar el mismo volumen de RCLB (lisis de glóbulos rojos) se realizaron aproximadamente de 2 a 3 lavados más (si la muestra está muy contaminada con glóbulos rojos se realizaron varios lavados hasta que paquete quede blanco) y centrifugar a 3500rpm/10 min.

7.- Al sedimento se le adiciona 1 ml de RCLB y se agita vigorosamente, se pasa el tubo eppendorf de 2 ml y se centrifuga 1400rpm/1 min. Desechar el sobrenadante

8.- Se agrega 25 µl de proteinasa k (10 mg/ml se agita vigorosamente).

9.- Agregar 300 µl de precipitación de proteínas, agitar durante 40 s e incubar a - 20°C durante 20 min

10.- Centrifugar a 14000 durante 3 min. decantar y dividir en 2 tubos de 1.5 ml.

11.- Adicional 1200 µl de isopropanol a cada tubo y agitar suavemente para precipitar el DNA centrifugar a 400 rpm por 1 min. y decantar el desecho de isopropanol

12.- Colocar 500ml de etanol al 70% a cada tubo para realizar el lavado a cada muestra.

13.- Secar a 60°C por 8-10 min. y re suspender con TE pH=8 frío y estéril.

7.4 Evaluación clínica de DMO (densidad mineral ósea):

Los pacientes con ST que participaron en este proyecto se les realizó una evaluación clínica de DMO. Esta es una técnica no invasiva, es la determinación de dicha densidad ósea a través de absorciometría de rayos X de doble energía (dual energy X-ray absorptometry), y para que sean más confiables los resultados, se obtuvieron datos de cuello de cadera, columna vertebral y tórax. Cuando se

interpreta una DMO aporta los siguientes datos principales: Densidad mineral Ósea: es el parámetro más utilizado para valorar la masa ósea y se presenta expresado en gramos por centímetro cuadrado, T-Score: número de desviaciones estándar con respecto al valor medio de la población de 20 a 39 años del mismo sexo Tabla 6 (a mayor edad del paciente disminuye el valor de T-Score), Z-Score: número de desviaciones estándar con respecto al valor medio de la DMO en la población de la misma edad y sexo.

Todos estos datos suelen presentarse de forma numérica y se complementan con una representación gráfica de la T-Score con la situación del paciente en dicha gráfica, que sin aportar ningún dato añadido, permite la interpretación visual de éstos.

Tabla 6 Criterios de la Organización Mundial de la Salud

T-Score	Interpretación	Riesgo de fractura
Entre +1 y -1 DE	Normal	Normal
Entre -1 y -2.5 DE	Osteopenia	Doble de lo normal
<de -2.5 DE	Osteoporosis	Cuádruple de lo normal
< 3.5 DE	Osteoporosis Severa	

DE= desviación estándar.

7.5 Evaluación clínica de Tiroiditis:

Los pacientes con ST que participaron en este proyecto también se les realizó una evaluación clínica de perfil Tiroideo. Es un grupo de exámenes de laboratorio

que se emplean para evaluar el funcionamiento de la glándula Tiroides. El perfil Tiroideo consiste en la determinación de los niveles de diferentes niveles. Tabla 7.

Tabla 7. Perfil Tiroideo y valores normales

Parámetro	Valor Bajo	Valor Normal	Valor Alto
TSH (Tirotropina)	Menor de 0.30 μ U/ml	0.30 -3 μ U/ml	Superior de 3 μ U/ml
T4 total (Tiroxina)	Menor de 5.4 ng/dl	5.4 - 11.5 ng/ml	Superior de 11.5 ng/ml
T3 total (Triyodotironina)	Menor de 0.8 ng/ml	0.8 - 2 ng/ml	Superior de 2 ng/ml
T4L (Tiroxina Libre)	Menor de 0.71 ng/dl	2.3 - 4.4 pg/ml	Superior de 4.4 pg/ml
T3 L (Triyodorironina Libre)	Menor de 2.3 pg/ml	2.3 -4.4 pg/ml	Superior de 4.4 pg/ml
ATPO	Negativo: 0- 34 ng/ml		Positivo mayor a 34 ng/ml
ATG	Negativo: 0-40 ng/ml		Positivo: mayor a 40 ng/ml
Tiroglobulina	Entre 5 - 25 μ g/L		Mayor de 25 ug/L

ATPO= Anticuerpos Anti Tiroideo Peroxidasa), ATG= Anticuerpos anti tiroglobulina

Para documentar la edad en la cual se detectaron por primera vez autoanticuerpos en nuestro grupo de pacientes ST, revisamos los expedientes de las 61 pacientes incluidas en nuestro estudio. Hasta este momento ninguna de las pacientes en este ha presentado anticuerpos anti transaminasa ni anti-gliadina. 22 pacientes ST mostraron anti-thyroid

peroxidase (TPO-Ab) y/o anti-thyroid thyroglobulin (TG-Ab) compatible con Tiroiditis, con la siguiente distribución por edad: 0 a 6 años 1 paciente, 6 a 10 años 11 pacientes, 10 a 14 años 5 pacientes, 14 a 18 años 5 pacientes. Lo cual concuerda con la literatura antes mencionada. En la siguiente gráfica se muestra la distribución de las edades.

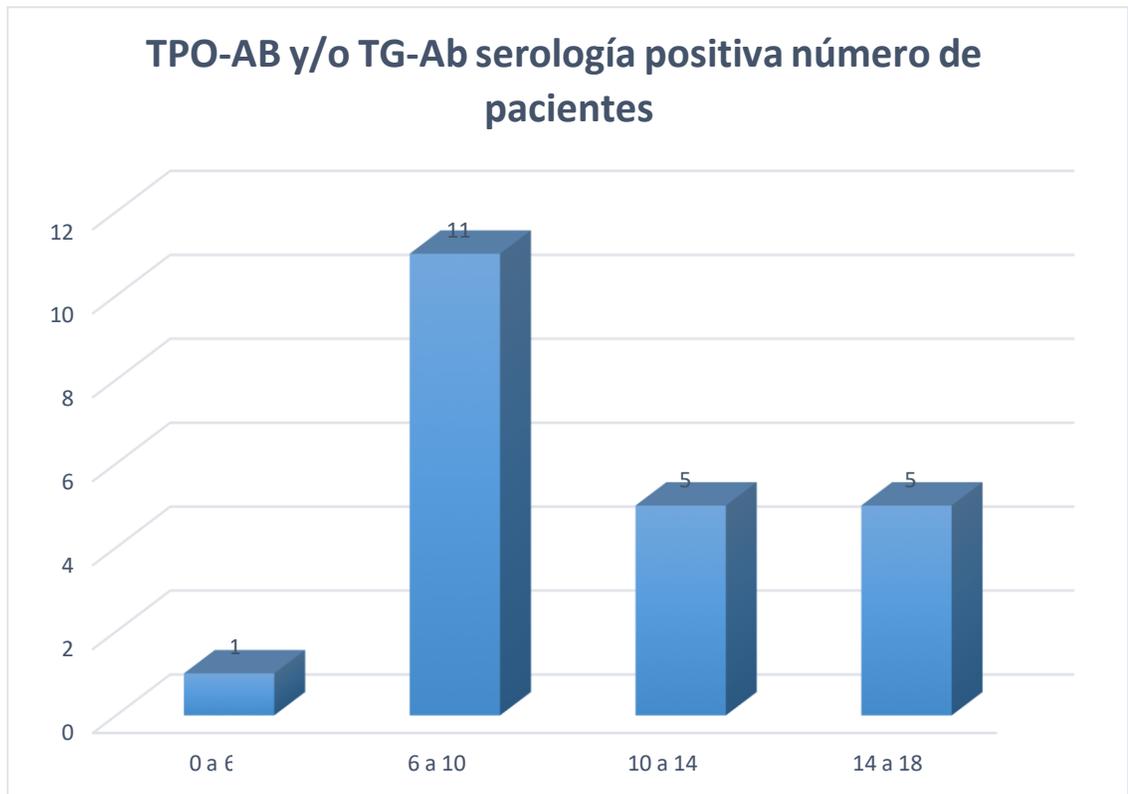


Figura 2. TPO-AD Y/O TG-Ab serología positiva en pacientes ST

Todos los datos clínicos y de laboratorio se tomaron del registro clínico del paciente, centrándose en algunas manifestaciones clínicas que afectan la calidad de vida, como defectos cardíacos congénitos, tiroiditis, malformaciones renales y

DMO baja. Para esto, realizamos una hoja de captura junto con el departamento de Endocrinología y Genética Humana Anexo 3.

7.6 Selección de VSN

Las variantes VSN (Variantes de un solo nucleótido por las siglas en inglés) rs7975232 (*VDR*), rs9536282 (*KL*), rs4646536 (*CYP27B1*) y rs1599971 (*PTPN22*) se seleccionaron de acuerdo con la frecuencia de alelos menores (MAF) en individuos de ascendencia mexicana, con el objetivo de aumentar el poder estadístico para detectar posibles asociaciones; el MAF para estos cuatro loci estaba entre 0.15 y 0.48 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, <http://www.hgvs.org/central-mutation-snpdatabases>) y concorde a reportes previos, tabla 7 (Bianco et al., 2010, Villanueva-Ortega et al., 2017, Bianco et al., 2012, (Trovo de Marqui,2015). Tabla 8.

Tabla 8. Selección de las variantes de un solo nucleótido. Frecuencia de alelo menor y porcentajes en diferentes poblaciones

GEN/VSN	Locus	MA	MAF	GM	HM	IBS	MXL	YRI
<i>VDR</i> /rs7975232	12q13.11	C	0.4846	59	44	43	59	40
<i>KL</i> /rs9536282	13q13.1	T	0.1528	92	74	15	8	31
<i>CYP27B1</i> /rs4646536	12q14.1	C	0.3815	66	44	71	66	73

PTPN22/rs1599971	1p13.2	T	0.2987	51	25	22	52	7
------------------	--------	---	--------	----	----	----	----	---

MA: Alelo menor. MAF: Frecuencia del alelo menor (1000 genomes). GM: 1000 Genomes. HM: Hap Map. IBS: Población Española. MXL: Ancestría mexicana de Los Ángeles, CA. YRI: Yoruba de Abadan, Nigeria.

Las variantes rs9536282 (*KL*), rs4646536 (*CYP27B1*), rs7975232 (*VDR*) y rs1599971 (*PTPN22*), fueron genotipificadas por medio de la técnica Kasp System por la empresa Kbiosystems, Foster City, CA) como se ha descrito en la literatura (<http://www.kbioscience.co.uk>). Para ello se diseñaron primers para amplificar la región que flanquea las variantes, utilizando la secuencia de referencia NG_011485.1, NG_007976.1, NG_008731.1, NG_011432, respectivamente. Las secuencias de los primers Forward y Reverse 5'-3' se generan a través del software Kraken™ propiedad de LGC Genomics. Ver Tabla 9.

Tabla 9. Secuencias flanqueadoras de las variantes de cada gen.

VSN	Primer 5' - 3'
<i>KL</i> (rs9536282)	CAAGTTGGTCTCGAACTCCTGGCTTCAAGTGATTCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAATTGCTGGGATTAT AGGCGTGAGTCACTGTACCCAGCCTGTTG[CT]CAGTATTTTTAGTTGTAGGCATCTTAGTGGGTGTGA GTGCTCGTTGGGGTTTTAATTTGCATTTTCTGATAGTGTGATGTTGAGGACA
<i>CYP27B1</i> (rs4646536)	ATGGCCCTCTACTCCTGGCCAAAAAGGGTTTGGAAGTTGGAAACAATGAGAAGGGGGCTGCAGCCC CTAGCCTCATCTTG[CT]TGTCTCCATTTTGTGCTTTGCAACCTAGACTGTACCCTGTGGTACCTGGAA ATTCTCGTGTCCAGACAAAGACATTCAT

VDR (rs7975232)	AATCAGCGGGCGTCCTGCACCCCAGGACGATCTGTGGGCACGGGGATAGAGAAGAAGGCACAGG AGCTCTCAGCTGGGC[A/C]CCTCACTGCTCAATCCCACCACCCCCACCCACACAGACTCAACGG CAGCACCCCTAGGCCACCCCTCTATGACTGC
PTPN22 (rs1599971)	TGAAGTGTGAATTAAGTAACTAGATTACTTCTCAGGTCCTTCAATGTTTTATGTATTATATGCTGAGCAACAT TTGATGTCTAAAAGAATACTATTC[T/C]TAAGAACCGAACTATATTCACCTTCTCCAGAAGAATTCTCA CCAAATGTTCCCAAATCCTTATCCTCAGCTGTGAAGTAAAAATTGGAACAT

7.7 La técnica de KASP

El método de KASP es un PCR competitivo alelo-específico que permite una identificación bi-alélica de alta precisión de variantes de un sólo nucleótido y de inserciones y deleciones en *loci* específicos. Se trata de una técnica muy robusta, con una gran precisión incluso en el análisis de genomas complejos. Figura 3

A) El ensayo KASP emplea el KASP Mix de análisis que contiene dos primers de competidores alelo-específicos marcados con una cola única correspondiente a cada uno de los fluoróforos universales (sondas) que son FAM y HEX de doble cadena y un primer reverse.

B) Otro componente es el KASP Master mix que contiene los cassettes FRET con las sondas con los fluoróforos específicos que son FAM Y HEX ,dNTP's en solución de buffer además de la polimerasa en un amortiguador optimizado para la reacción.

C) DNA que puede contener la VSN de interés.

Los resultados indicaran el nucleótido presente en el sitio blanco.

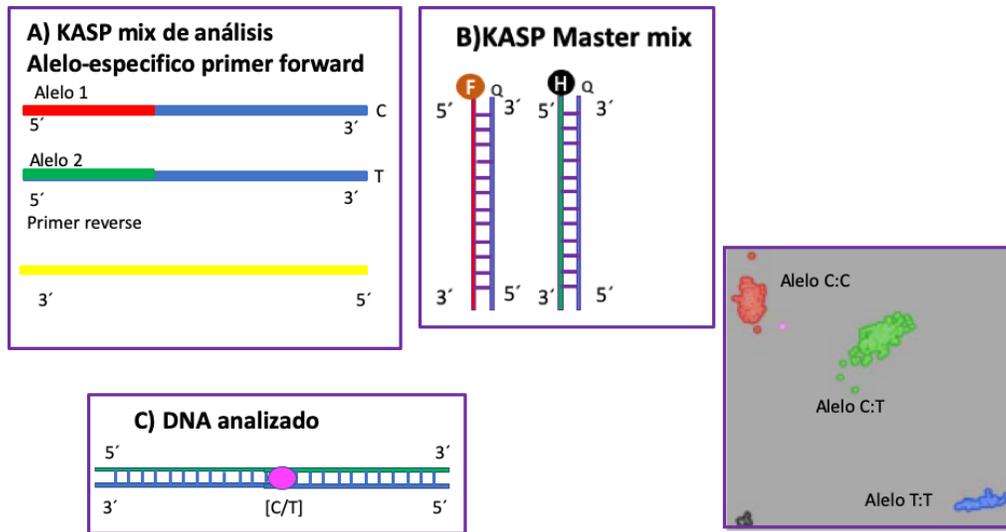


Figura 3. Técnica de KASP

7.8 Análisis estadístico.

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se analizó en casos y controles, todas las variantes por la prueba exacta de Fisher rs9536282 (*KL*), rs4646536 (*CYP27B1*), rs7975232 (*VDR*) y rs1599971 (*PTPN22*), por asociación de variantes independientes entre casos y controles una prueba de χ^2 bajo un modelo recesivo. Calculamos los valores de $p=95\%$ con intervalos de confianza y odds ratios (OR) con el programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) Se analizó la asociación entre los marcadores genéticos en los genes *KL*, *CYP27B1* y *VDR* entre la densidad mineral osea baja y malformaciones renales (acidosis tubular, riñón en herradura) y la presencia de Tiroiditis en pacientes con ST y la asociación entre el gen *PTPN22*. La asociación se determinó por la prueba de

tendencia de Armitage de dos colas con el programa en línea DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Se obtuvieron los valores de significancia y Odds Ratio y se consideró como estadísticamente significativo un valor de significancia igual o menor de 0.05.

7.9 Análisis de interacciones gen-gen

La interacción gen-gen se analizó por el método de reducción de la dimensionalidad multifactorial (MDR) para las variantes de los genes implicados en la ruta metabólica de la vitamina D (*VDR*, *KL* y *CYP27B1*). Se utilizó el programa MDR (Moore et al., 2006) por medio de un análisis exhaustivo de tres atributos. El análisis por MDR se realizó con los parámetros preestablecidos en el programa. Los mejores modelos finales se obtuvieron a partir de los valores de "Testing Accuracy" (TA), y se utilizaron una validación cruzada "Cross Validation" (CV) de 10. Se utilizó el módulo de permutación del programa MDR para calcular la significancia estadística de los modelos obtenidos después de 100,000 permutaciones.

8 RESULTADOS

Población de estudio

Estudiamos a 61 pacientes con ST, la edad del grupo estudiado diagnosticados

con ST con una edad de 1 a 18 años con una media de edad de 11 años, y 69 mujeres sanas variaron de 14 a 38 años con un promedio de edad de 26 años. El cariotipo y las manifestaciones clínicas encontradas en este grupo de pacientes con ST tenían frecuencias similares a las que se informaron previamente, y esto era cierto independientemente del cariotipo, como se detalla en la Tabla 9.

Evaluación clínica

Los pacientes con ST tuvieron una evaluación clínica completa por parte de las clínicas de cardiología, endocrinología, genética, nefrología, oftalmología y psicología. El análisis de DMO por absorciometría de rayos X de energía dual de cadera, columna vertebral y tórax se realizó en la mayoría de ellos. Todos los datos clínicos y de laboratorio se tomaron del registro clínico del paciente, centrándose en algunas manifestaciones clínicas que afectan la calidad de vida, como defectos cardíacos congénitos, tiroiditis, malformación renal y baja DMO entre otras (Tabla 10).

Tabla 10. Características clínicas en las pacientes con síndrome de Turner en la población de estudio con respecto al cariotipo.

	45,X	Otro Cariotipo^a	Total
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	n=40 (%)	n=21 (%)	n=61 (%)
Talla baja (HP-0004322)	40/40(100)	20/21(95)	60/61(98)
Paladar alto Ojival (HP-0000218)	32/40 (80)	16/21(76)	48/61(79)
Metacarpianos Cortos 4ta (HP:0010044) y 5ta (HP:0010047)	32/40 (80)	11/21(52)	43/61(70)
<i>Cubitus valgus</i> (HP:0002967))	22/40 (55)	10/21(48)	32/61(52)
Micromastia (HP:0006610)	25/40 (63)	7/21(33)	32/61(52)
Implantación baja de cabello (HP:0002162)	23/40 (58)	7/21 (33)	30/61(49)
Malformaciones de corazón (HP:0001627)	19/40 (48)	5/21 (24)	24/61(39)
Cuello corto (HP:0000465)	19/40 (48)	4/21 (19)	23/61(38)
Otitis media (HP: 0000369))	19/40 (48)	3/21 (14)	22/61(36)
Tórax ancho (HP: 0000914)	17/40 (43)	4/21 (19)	21/61(34)
Múltiples nevos (HP:0001054)	13/40 (33)	7/21 (33)	20/61(33)
Tiroiditis (HP:0100646)	14/40 (35)	8/21 (38)	22/61(36)
Anormalidades en los ojos (HP:0000478)	7/40 (18)	4/21 (19)	11/61(18)
Malformaciones renales (HP:0012210)	7/40 (18)	3/21 (14)	10/61(16)
Densidad mineral ósea baja (HP:0004348)	28/34 (82)	13/17 (76)	41/51 ^b (80)

(a) Nomenclatura acorde al ISCN 2016

46,X,i(X)(q10)

46,X,i(Y)(q10)

mos 45,X/46,XX

mos 45,X/47,XXX/46,XX

(b) 51 pacientes ST con estudio DMO.

(c) No reportado

mos 45,X/46,XY
mos 45,X/46,X,i(X)(q10)
mos 45,X/46,X,mar

Asociación de VSN con fenotipo

El genotipo y la distribución de alelos de estas variantes en ST y controles representados en Tabla 11, todos se encontraron en HWE. No se encontró asociación entre variantes individuales y pertenecientes al grupo ST o al grupo control. La distribución de alelos, el genotipo de los cuatro VSN estudiados y su asociación con las características clínicas seleccionadas en pacientes con ST se muestran en la Tabla 7. Se encontró una asociación significativa de variantes únicas y la presencia de características clínicas particulares en pacientes con ST después de la corrección de Benjamini-Hochberg para las comparaciones múltiples entre el rs9536282 en *KL* y la presencia de malformación renal $p=0.017$, OR 17.800 [1.66-479.13]; así como rs4646536 (*CYP27B1*) con baja DMO, $p=0.037$, OR 6.667 [1.971-45.79]. Mientras tanto, variantes en el *VDR* y *PTPN22* no mostraron una asociación estadísticamente significativa con las características clínicas seleccionadas.

Tabla 11. Asociación de variantes VDR (rs7975232), CYP27B1 (rs4646536) y PTPN22 (rs1599971) con manifestaciones clínicas en pacientes con síndrome de Turner.

Gen (SNP)	Población de estudio	Genotipo				Frecuencia alélica		P	OR (95%CI)	
		n	n	n	n	C	T			
		Total	CC	TC	TT	C	T			
KL (rs9536282)	ST	61	51	9	1	0.909	0.091			
	Malformaciones de corazón	24/61	22	2	0	0.958	0.042	0.385	0,349	[0,064- 1,708]
	Malformaciones renales	10/61	7	2	1	0.8	0.2	0.017	17.800	[1.661 -479.134]
	Tiroiditis	19/61	17	2	0	0.94	0.052	0.481	0.657	[0.025-16.98]
	DMO baja	41/51	33	7	1	0.89	0.109	0.602	0.085	[0.032-22.62]
		Total	CC	TC	TT	C	T			
CYP27B1 (rs4646536)	ST	61	11	27	23	0.401	0.598			
	Malformaciones de corazón	24/61	6	10	8	0.458	0.541	0.273	0.444	[0.103-1.922]
	Malformaciones Renales	10/61	1	7	2	0.45	0.55	0.969	0.952	[0.077-11.787]
	Tiroiditis	19/61	3	7	9	0.342	0.657	0.498	1.714	[0.357-8.232]
	DMO baja	41/51	6	15	20	0.329	0.67	0.037	6.667	[1.971-45.793]
		Total	AA	CA	CC	A	C			
VDR (rs7975232)	ST	61	7	26	28	0.327	0.672			
	Malformaciones de corazón	24/61	4	8	12	0.333	0.666	0.497	0.562	[0.106-2.999]
	Malformaciones renales	10/61	1	5	4	0.35	0.65	1.000	1.000	[0.094-10.664]
	Tiroiditis	19/61	2	8	9	0.315	0.684	0.855	1.184	[0.192-7.320]
	DMO baja	41/51	6	17	18	0.353	0.646	0.209	0.259	[0.187-79.980]
		Total	CC	TC	TT	C	T			
PTPN22 (rs1599971)	ST	61	11	33	17	0.45	0.549			
	Malformaciones de corazón	24/61	2	17	5	0.437	0.562	0.502	1.875	[0.294-11.968]
	Malformaciones renales	10/61	0	7	3	0.35	0.65	0.140	5.552	[0.360-118.712]
	Tiroiditis	19/61	4	9	6	0.447	0.552	0.954	0.955	[0.196-4.638]

El análisis de reducción de dimensionalidad multifactorial identificó interacciones gen-gen significativas entre variantes en los genes estudiado que participan en la vía metabólica de la vitamina D: rs9536282 (*KL*), rs4646536 (*CYP27B1*) y rs7975232 (*VDR*). La interacción entre estas tres variantes confiere un mayor riesgo de DMO baja en pacientes con ST como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis MDR. Genes que participan en la vía metabólica de la vitamina D muestran interacciones gen-gen que influyen en el estado de la DMO en pacientes con Síndrome de Turner.

Interacción Gen-Gen	Características Clínicas	Precisión de la prueba	Validación cruzada	OR (95%CI)	P Valor (permutación 10,000)
rs9536282 (<i>KL</i>), rs7975232 (<i>VDR</i>), rs4646536 (<i>CYP27B1</i>)	DMO baja	0.74	10/10	19.9 (1.08-36.63)	0.035

9 DISCUSIÓN

Actualmente se reconoce que no hay una clara correlación entre cariotipo y fenotipo que resuelva completamente la variabilidad fenotípica en pacientes con ST. Sin embargo, ciertas correlaciones muy claras han sido reportadas como la presencia de un cromosoma Y con ausencia de talla baja, típica del ST (Sybert et al, 2004), además de estar asociada con un elevado riesgo de desarrollar gonadoblastoma en pacientes con ST (Kwon et al. 2017). También se ha reportado que el fenotipo suele ser menos severo cuando las pacientes presentan un mosaico celular 45,X/46,XX (Bispo et al. 2013) incluyendo menor prevalencia y severidad de defectos cardíacos congénitos y anomalías linfáticas (Gravholt et al. 2017).

En esta cohorte de pacientes con ST, tanto las manifestaciones clínicas presentadas como el cariotipo tienen una distribución similar a la reportada en otras poblaciones (Araújo et al. 2010), (Bispo et al. 2013), no se encontró diferencia fenotípica entre las pacientes con cariotipo 45,X con respecto a pacientes con otros cariotipos, a pesar de que las cardiopatías congénitas, el cuello alado y el tórax ancho se presentaron con mayor frecuencia en el grupo 45,X, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre esas características clínicas y el cariotipo 45,X (Tabla 10). Una sola paciente con cariotipo 45,X/46,XY, mostró una estatura normal (1.56 m), como era de esperarse.

En este estudio, la malformación renal más frecuente en grupo de pacientes con ST fue riñón en herradura.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para la variante rs9536282 en el gen *KL* se encontró con mayor frecuencia en el alelo C en las pacientes con ST que tenían alguna malformación renal en comparación con los pacientes ST con defectos cardíacos congénitos, como esperábamos de acuerdo con los estudios en la población asiática oriental que indicaban que rs9536282 *KL* puede ser un factor de susceptibilidad a la calcificación de la arteria coronaria (CAC) (Zhai, 2015), esta variante en *KL* se ha asociado con la CAC en los hombres, sin tener en cuenta la función renal y los factores relacionados con el metabolismo del calcio/fosfato (Hu,2013). Las anomalías renales en el ST no han sido claramente explicadas, el único gen que ha sido estudiado es el *HNF-1b* donde a pesar de que el polimorfismo intrónico IV8+48insC está presente en dos pacientes con ST, los autores concluyeron que no hay una relación directa entre este polimorfismo y el riñón en herradura en pacientes ST (D' Amato et al, 2008).

Por otra parte, encontramos una asociación entre la variante rs4646536 con mayor frecuencia en el alelo T en el gen *CYP27B1* con DMO baja con un $p=0.037$ con un OR 6.667 [1.97-45.79].

Hasta la fecha no se conocía que VSN en el gen *CYP27B1* estuvieran asociadas con DMO baja en pacientes con ST.

CYP27B1 juega un papel central en la homeostasis de calcio y crecimiento de los huesos (Adam, 20016).

Se ha demostrado que la actividad de *CYP27B1* en células óseas es un candidato prometedor como mediador de procesos catabólicos y anabólicos en el hueso (Adam, 2016).

En cuanto a las variantes rs7975232 y rs1599971 que se encuentran en los genes *VDR* y *PTPN22* respectivamente, no encontramos asociación con ninguna manifestación clínica particular y tampoco al comparar los grupos ST y control. Este hallazgo es diferente de lo que se encontró en la población brasileña o argentina (Peralta et al., 2012, Bianco et al. 2012) y similar a un informe reciente que muestra otra variante de *PTPN22* (rs2476601), la cual no está asociada con enfermedades autoinmunes en pacientes mexicanas con ST, con un OR 0.33 [0.10-1.10] al compararla con controles (Villanueva-Ortega et al. 2017). Proponemos buscar en nuestro grupo de pacientes ST otras variantes VSN en los genes *VDR* y *PTPN22*.

Interacción Gen-Gen

Observamos interacciones *VDR*, *KL* y *CYP27B1* Implicados en la vía metabólica de la vitamina D con una $p=0.035$, donde confiere mayor riesgo de presentar DMO baja, estos resultados no los podemos comparar con otros estudios ya que no se ha analizado algo similar.

Sin embargo, la figura 4, muestra de una manera sencilla, cómo participan en la vía metabólica de la vitamina D los 3 genes.

1.- La vitamina D la podemos adquirir de 2 maneras, por medio de la irradiación ultravioleta y por absorción de la vitamina D en la dieta. La vitamina D es producida en la sangre a partir de 7-deshidroxicolesterol ya sea obtenida en la piel o ingerida en la dieta.

2.- En el hígado la Vitamina D se hidroliza a D-25-hidroxilasa (25-OH-D) donde participa el gen *CYP27B1*.

3.- Posteriormente participa el gen *KL* donde presenta la segunda hidrolización en el Riñón, posteriormente el gen *VDR* participa para la conversión de 1,25 hidrolasa D donde ésta es la Vitamina D activa.

4.- Por último, en el hueso la vitamina D estimula directamente, mediante su unión al receptor *VDR*, la diferenciación de osteoblastos y la producción de proteínas de unión al calcio óseo, como la osteocalcina y la osteopontina. La vitamina D aumenta la actividad de calcio óseo.

Por lo anterior, si no se tiene una correcta vía metabólica de la vitamina D, se podría tener una densidad mineral ósea baja, como se observan en nuestros resultados

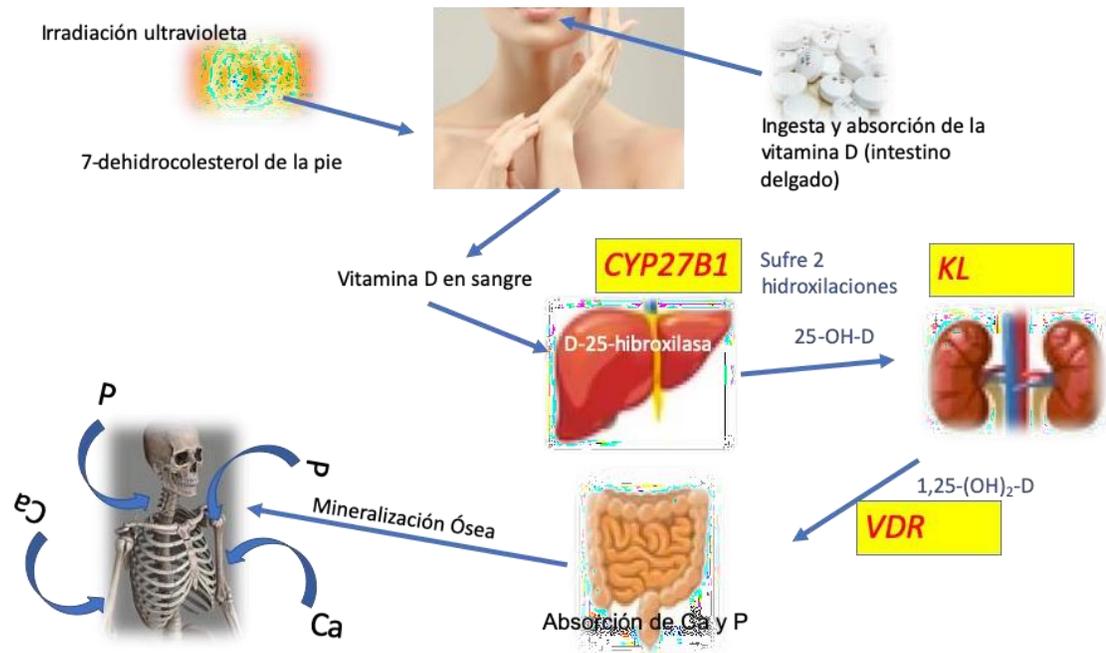


Figura 4 Vía metabólica de la vitamina D donde se observa que participan los genes *CYP27B1*, *KL* y *VDR*

10 CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que la variante rs9536282 en el gen *KL* puede estar asociada con malformaciones renales en pacientes con ST.

La variante rs9536282 en el gen *KL* puede ser un biomarcador temprano de las enfermedades renales crónicas y del trastorno mineral óseo en pacientes con ST.

Los genes *KL*, *VDR*, y *CYP27B1*, que están involucrados en el metabolismo de la vitamina D, parecen estar contribuyendo a la DMO baja en pacientes con ST.

Las variantes genéticas de las pacientes con ST, contribuyen a la variabilidad de las características clínicas observadas en ellas.

ANEXO 1:

11.1 HOJA DE CAPTURA DE DATOS

“Estudio clínico, citogenético y genómico en pacientes con Síndrome de Turner:
Correlación fenotipo-genotipo”

FECHA: _____

CODIGO: _____

Nombre:
Expediente:
Domicilio:
Teléfono
Fecha de nacimiento:

ANTECEDENTES PERINATALES:			
Edad gestacional:		Talla materna	
Talla al nacer:		Talla paterna	
Peso al nacer:		TBF	
Z talla:		zTBF	
CARIOTIPO:			
FISH			

DISMORFIAS MAYORES	SI	NO	DISMORFIAS MENORES	SI	NO
OFTAMOLOGIA			Cuello alado		
Cataratas			Ptosis		
Escleras azules			Implantación baja de cabello		
Estrabismo			Implantación baja de pabellones auriculares		
Miopía			Otitis media		
Hipermetropía			Paladar alto y ojival		

Astigmatismo			Micrognatia		
Otros			Retrognatia		
CARDIACAS			Linfedema		
Coartación aortica			Nevos		
Aorta bicúspide			Lengua geogr		
Estenosis aortica valvular			Vitiligo		
Otros			Alopecia		
	SI	NO	DISMORFIAS MENORES	SI	NO
ESQUELETICAS			Dermatoglifos		
Displasia de cadera			Displasia ungueal		
Escoliosis			Oídos		
Deformidad de Madelung			Audición		
Cubito valgo			Pliegue epicantal interno		
Genu valgo			Escleras azules		
Acort 4° y 5° metacarpiano			Miopía/ estrabismo		
Acort de 4° y 5° metatarsiano			Dientes		
Xifosis			Tiroides		
Fusión vertebral			Tórax ancho		
Osteopenia			Teletelia		
Exostosis de tibia			Mamas hipoplasicas		
Ortesis			Fusión de labios mayores		
Cabalgamiento					
Otros					
RENALES					
Riñón en herradura					
Doble colector					
Otros					
DEF CEL GERMINALES					
Fallo gonadal					
Infertilidad					

Disgenesia gonadal					
Tumor gonadal					
Hipoplasia labios menores					
Hiperplasia lab mayores					
Cintillas gonadales					
Laparotomía					

Fenotipo Turner	SI					NO
	Completo		Sutil		Solo talla baja	

ANTECEDENTES FAMILIARES				
	1	2	3	4
DM1				
DM2				
HTA				
SD METAB				
HLP				
DISTIROIDISMO				
OTROS				

1. MADRE/PADRE
2. HERMANOS
3. ABUELOS
4. TIOS

Síndrome Metabólico				
Obesidad Central	Si			No
DM2	Si			No
	Trat			
Intolerancia Carb	Si			No
Resistencia Insulina	Si			No
	Clínica		HOMA	
Dislipidemia	Si			No
	Tipo			
	Trat			
Hipertensión	Si			No

	Trat			
Ácido úrico	Alto		Normal	
Microalbuminuria	Si		No	

Pubertad	SI				NO	
	Espontaneo		Inducida			
	Edad telarca		Estrogenos			
	Edad men		Est Comb			
	Alfafetoproteína		BHC G	Edad Inicio		
	USG Pélvico	Si		No		
		Tamaño útero				
		Endometrio				
		Ovario				

Patología tiroidea	SI					NO
	Bocio		Tiroiditis		Eutiroideo	
					Hipotiroideo	
					Hipertiroideo	
Tx Levotiroxina	Si		NO			

Cardiopatía	Si			No			
	Fecha Dx						
	Tipo						
	Cirugía	Si					No
		Tipo					
	Trat						

Estado Nutricional	ANORMAL		NORMAL
	a) Desnutrido		
	b) Sobrepeso		
	c) Obesidad		
Seguimiento nutrición		Si	No

Área Psicológica	
CI	
Autoestima	
Ansiedad	
Depresión	
Autoimagen	

Densitometría Ósea	ANORMAL		NORMAL
	a) Osteopenia		
	b) Osteoporosis		
	c) Fracturas patológicas		
Tratamiento con GH	SI	NO	

ANEXO 2

11.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

“ESTUDIO CLÍNICO, CITOGÉNÉTICO Y GENÓMICO EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER: CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO”



Se le invita a su hija a participar en un estudio de investigación. Es necesario que usted o su hija decida si participar o no en el estudio. Lea cuidadosamente este formato y pregunte al médico del estudio cualquier duda al respecto.

¿Para qué se efectúa este estudio?

Es un proyecto de investigación para tratar de identificar alteraciones en parte de su material genético que son los cromosomas, y realizar una correlación características Fenotípicas y Genotipo (físicas y genéticas) en pacientes con Síndrome de Turner mediante el estudio clínico completo, citogenético y genómico.

¿En qué consiste el estudio?

Consiste en que el médico especialista en endocrinología diagnostique a las pacientes con Síndrome de Turner y los investigadores del INP del laboratorio de citogenética, realice estudios de citogenética y genómica a partir de sangre periférica y mucosa oral.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Pueden participar pacientes diagnosticados clínicamente con ST con expediente en el INP

¿Quiénes no deben participar en el estudio?

Pacientes transfundidos en un periodo menor a tres meses (Se excluirán de manera temporal) y pacientes que no acepten participar en el estudio o decidan abandonar el estudio, en cualquier momento. No tengan expediente en el INP.

¿Qué se le pedirá a su hijo) que haga?

Se requiere responder un cuestionario, del cual la información será confidencial, donar una muestra de sangre periférica de 3 ml (una cucharita cafetera), también se requiere una muestra de mucosa oral, la cual serán tomadas con todos los requisitos de seguridad: material nuevo y guantes y será practicado por personal con amplia experiencia en la toma de muestra. El tiempo de duración del estudio es de 3 años y no se requiere una visita especial para la realización de este estudio.

¿Quién sufragará los gastos del estudio?

El análisis de la muestra será sin ningún costo para el paciente.

¿Qué efectos indeseables pueden pasar a su hija al participar en el estudio?

Puede haber dolor leve o molestia al pinchar con la aguja durante el extracción de sangre y que pueden presentarse complicaciones mínimas como la formación de un “moretón” o infección en el sitio de punción, pero que el riesgo es muy bajo por contar con condiciones de limpieza y personal capacitado.

¿Qué debo hacer en caso de que tenga mi hijo alguna molestia?

Si se llegara a presentar un moretón es sin dolor y si hubiera más molestias, se puede hablar por teléfono a los Médicos responsables de este estudio.

¿Qué beneficio puede mi hija esperar?

Se generaría información importante respecto a lo que le puede suceder en un futuro a su hija además con la información que se obtenga de este proyecto, se puede ayudar a otras pacientes con la misma enfermedad y a sus familiares también.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?

Dra. Nelly F. Altamirano Medico especialista en endocrinología, Responsable del Proyecto. Teléfono: 10-84-09-00 ext. 1823

Dra. Sara Frías Vázquez Investigador en Ciencias Medicas, Teléfono: 10-84-09-00 ext. 1326

Dra. Matilde Ruiz García Presidente del Comité de Ética Teléfono 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

¿Puede negarse mi hija a participar en este estudio y se le puede pedir que abandone el estudio?

La participación en este estudio es voluntaria, y yo como padre o tutor puede negarse a participar desde un inicio o en el momento que lo deseen, sin perder ningún derecho que actualmente tienes como paciente en el INP.

¿Quiénes van tener información de mis datos y de mi hijo?

Los resultados del estudio sólo los conocerán los Investigadores directamente relacionados con el proyecto y el paciente y tus padres o tutor lo solicitan, se pueden otorgar los resultados del análisis de los cromosomas. Todos los datos van a ser confidenciales si los resultados se presentan en un congreso o en una publicación, será en forma de grupo de pacientes y conservando el anonimato, ya que no va a incluir el nombre de las participantes.

¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas y los estudios de imágenes?

Al realizar la extracción de DNA de sangre periférica

a) La muestra será guardada a 4°C donde solo tendremos acceso los investigadores involucrados directamente al proyecto y se almacenan identificándolas con un código y no con nombres.

b) La muestra va a ser utilizada para este estudio. Las muestras serán guardadas en el Laboratorio de Citogenética del INP para realizar comprobaciones, réplicas o estudios genéticos complementarios para este mismo trabajo. Las muestras sobrantes no utilizadas en este estudio, podrían ser eliminadas en tres años.

c) La muestra será identificada con un código va a ser manejada por los investigadores directamente involucrados

f) Las muestras solo serán identificadas por los investigadores directamente responsables

g) Usted como padre o tutor puedo retirar la muestra en cualquier momento que lo deseen. Acudiendo al laboratorio de Citogenética del INP y pidiéndolo a los Investigadores directamente responsables.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Los investigadores en cuanto tengan los resultados se le informara al Médico especialista en Endocrinología para cuando el paciente lo solicite.

El pacientes puede requerir resultados de los estudio cuando tenga cita con el Médico especialista en Endocrinología siempre y cuando los investigadores directamente involucrados ya tengan los resultados.

He leído y entiendo el presente consentimiento. Mis preguntas han sido contestadas y acepto que mi hija participe en este estudio. Al firmar a continuación, acepto que:

- He leído este formato de consentimiento.
- He tenido la oportunidad de formular preguntas y éstas han sido contestadas.
- Entiendo que la participación de mi hija es voluntaria.
- Acepto que mi hija participe en el estudio
- Doy permiso para que se use y comparta la información referente a mi hija como se describe en este formato
- Puedo elegir que mi hija no participe en el estudio o que lo abandone en cualquier momento, comunicándolo al Doctor del estudio.
- Podría ser que mi hija tenga que abandonar el estudio sin mi consentimiento en caso de requerir otro tratamiento, si sufre alguna lesión relacionada con el estudio o si no sigue el plan de tratamiento del estudio.

Nombre del paciente

Fecha

Nombre y firma del Padre, o Tutor

Nombre y firma de la madre o tutor

Fecha

Nombre y firma de la persona que conduce

Fecha

La revisión del Consentimiento

Nombre y firma de Testigo

Fecha

(Es conveniente que anote su dirección)

Relación que tiene con el voluntario

Nombre y firma de Testigo

Fecha

(Es conveniente que anote su dirección)

Relación que tiene con el voluntario

Recibí copia de este consentimiento

Nombre y firma

Fecha

ANEXO 3

11.3 CARTA DE ASENTIMIENTO



SALUD

“ESTUDIO CLÍNICO, CITOGÉNÉTICO Y GENÓMICO EN PACIENTES CON SÍNDROME DE TURNER: CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO”

Se te invita a participar en un estudio de investigación. Es necesario que decidas si participas o no en el estudio. Lee cuidadosamente este formato y pregunta al médico del estudio cualquier duda al respecto.

¿Para qué se efectúa este estudio?

Es un proyecto de investigación para tratar de identificar alteraciones en parte de su material genético que son los cromosomas, y realizar una correlación características Fenotípicas y Genotipo (físicas y genéticas) en pacientes con Síndrome de Turner mediante el estudio clínico completo, citogenético y genómico.

¿En qué consiste el estudio?

Consiste en que el médico especialista en endocrinología diagnostique a las pacientes con Síndrome de Turner y los investigadores del INP del laboratorio de citogenética, realice estudios de citogenética y genómica a partir de sangre periférica y mucosa oral.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?

Pueden participar pacientes diagnosticados clínicamente con ST con expediente en el INP (Instituto Nacional de Pediatría)

¿Quiénes no deben participar en el estudio?

Pacientes transfundidos en un periodo menor a tres meses (Se excluirán de manera temporal) y pacientes que no acepten participar en el estudio o decidan abandonar el

estudio, en cualquier momento. No tengan expediente en el INP.

¿Qué se me pedirá que haga?

Se requiere responder un cuestionario, del cual la información será confidencial, donar una muestra de sangre periférica de 3 ml (una cucharita cafetera), también se requiere una muestra de mucosa oral, la cual serán tomadas con todos los requisitos de seguridad: material nuevo y guantes y será practicado por personal con amplia experiencia en la toma de muestra. El tiempo de duración del estudio es de 3 años y no se requiere una visita especial para la realización de este estudio.

¿Quién sufragará los gastos del estudio?

El análisis de la muestra será sin ningún costo para el paciente.

¿Qué efectos indeseables puedo tener al participar en el estudio?

Puede haber dolor leve o molestia al pinchar con la aguja durante el extracción de sangre y que pueden presentarse complicaciones mínimas como la formación de un “moretón” o infección en el sitio de punción, pero que el riesgo es muy bajo por contar con condiciones de limpieza y personal capacitado.

¿Qué debo hacer en caso de que tenga alguna molestia?

Si se llegara a presentar un moretón es sin dolor y si hubiera más molestias, se puede hablar por teléfono a los Médicos responsables de este estudio.

¿Qué beneficio puedo esperar?

Se generaría información importante respecto a lo que te puede suceder en un futuro, además con la información que se obtenga de este proyecto, se puede ayudar a otras pacientes con la misma enfermedad que tú tienes y a sus familiares también.

¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?

Dra. Nelly F. Altamirano Medico especialista en endocrinología, Responsable del Proyecto. Teléfono: 10-84-09-00 ext. 1823

Dra. Sara Frías Vázquez Investigador en Ciencias Médicas, Teléfono: 10-84-09-00 ext. 1326

Dra. Matilde Ruiz García. Presidente del Comité de Ética Teléfono 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

¿Puedo negarme a participar en este estudio y se me puede pedir que abandone el estudio?

La participación en este estudio es voluntaria, y puedes negarte a participar desde un inicio o en el momento que lo desees, sin perder ningún derecho que actualmente tienes como paciente en el INP.

¿Quiénes van a tener información de mis datos?

Los resultados del estudio sólo los conocerán los Investigadores directamente relacionados con el proyecto y si tú y tus padres lo solicitan, se pueden otorgar los resultados del análisis de los cromosomas. Todos los datos van a ser confidenciales si los resultados se presentan en un congreso o en una publicación, será en forma de grupo de pacientes y conservando el anonimato, ya que no va a incluir el nombre de las participantes.

¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas y los estudios de imágenes?

Al realizar la extracción de DNA de sangre periférica

a) La muestra será guardada a 4°C donde solo tendremos acceso los investigadores involucrados directamente al proyecto y se almacenan identificándolas con un código y no con nombres.

b) La muestra va a ser utilizada para este estudio. Las muestras serán guardadas en el Laboratorio de Citogenética del INP para realizar comprobaciones, réplicas o estudios genéticos complementarios para este mismo trabajo. Las muestras sobrantes no utilizadas en este estudio, podrían ser eliminadas en tres años.

c) La muestra será identificada con un código y va a ser manejada por los investigadores directamente involucrados

f) Las muestras solo serán identificadas por los investigadores directamente responsables

g) Tu como paciente puedes retirar tu muestra en cualquier momento que lo desees, Acudiendo al laboratorio de Citogenética del INP y pidiéndolo a los Investigadores directamente responsables.

¿Puedo conocer los resultados del estudio?

Puedes requerir junto con tus padres o tutores, los resultados de los estudio cuando tengas cita con el Médico especialista en Endocrinología siempre y cuando los investigadores directamente involucrados ya tengan los resultados.

He leído y entiendo el presente consentimiento. Mis preguntas han sido contestadas y acepto participar en este estudio.

Al firmar a continuación, acepto que:

- He leído este formato de Asentimiento.
- He tenido la oportunidad de formular preguntas y éstas han sido contestadas.
- Mi participación en este estudio es voluntaria.
- Acepto participar en el estudio
- Doy permiso para que se use y comparta la información referente a mí como se describe en este formato
- Puedo elegir no participar en el estudio o abandonarlo en cualquier momento, comunicándolo al Doctor del estudio.

Nombre del paciente _____ Fecha _____

Nombre y firma del Padre, o Tutor _____

Nombre y firma de la madre o tutor _____ Fecha _____

Nombre y firma de la persona que conduce

Fecha

La revisión del Consentimiento

Nombre, firma de Testigo y dirección

Fecha

Relación que tiene con el voluntario

Nombre, firma de Testigo y dirección

Fecha

Relación que tiene con el voluntario

Recibí copia de este Asentamiento

Nombre y firma

Fecha

12 REFERENCIAS:

- Araújo, Claudinéia de, Bianca Borsatto Galera, Marcial Francis Galera, and Sebastião Freitas de Medeiros. 2010. "Características Clínicas e Citogenéticas Da Síndrome de Turner Na Região Centro-Oeste Do Brasil." *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 32(8): 381–85.
- Ban, Yoshiyuki. 2012. "Genetic Factors of Autoimmune Thyroid Diseases in Japanese." *Autoimmune Diseases* 1(1): 1–29.
- Barreto, A. et al. 2010. "Cardiovascular and Renal Anomalies in Turner Syndrome." *Revista da Associação Médica Brasileira* 56(6): 655–59.
- Bianco, B. et al. 2010. "PTPN22 Polymorphism Is Related to Autoimmune Disease Risk in Patients with Turner Syndrome." *Scandinavian Journal of Immunology* 72(3): 256–59.
- Bianco, Bianca et al. 2012. "Analysis of Vitamin D Receptor Gene (VDR) Polymorphisms in Turner Syndrome Patients." *Gynecological Endocrinology* 28(4): 326–29.
- Bispo, A. V.S. et al. 2013. "Effect of Chromosome Constitution Variations on the Expression of Turner Phenotype." *Genetics and Molecular Research* 12(4): 4243–50.
- Bondy, Carolyn A. 2007. "Clinical Practice Guideline: Care of Girls and Women with Turner Syndrome: A Guideline of the Turner Syndrome Study Group." *Journal of*

Clinical Endocrinology and Metabolism 92(1): 10–25.

Carlton, Victoria E.H. et al. 2005. "PTPN22 Genetic Variation: Evidence for Multiple Variants Associated with Rheumatoid Arthritis." *American Journal of Human Genetics* 77(4): 567–81.

Cui, Xiaoxiao et al. 2018. "A Basic Understanding of Turner Syndrome: Incidence, Complications, Diagnosis, and Treatment." *Intractable and Rare Diseases Research* 7(4): 223–28.

Donato, Beatriz, and Maria João Ferreira. 2018. "Cardiovascular Risk in Turner Syndrome." *Revista Portuguesa de Cardiologia* 37(7): 607–21.
<https://doi.org/10.1016/j.repc.2017.08.008>.

Feldman, David. 1997. "Vitamina D." : 1–23.

Feldman, David, and Peter J Malloy. 2014. "Mutations in the Vitamin D Receptor and Hereditary Vitamin D-Resistant Rickets." *BoneKEy Reports* 3.
www.nature.com/bonekey.

Gravholt, Claus H. et al. 2017. "Clinical Practice Guidelines for the Care of Girls and Women with Turner Syndrome: Proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting." *European Journal of Endocrinology* 177(3): G1–70.

Gravholt, Claus Højbjerg, Svend Juul, Rune Weis Naeraa, and Jan Hansen. 1998. "Morbidity in Turner Syndrome." *Journal of Clinical Epidemiology* 51(2): 147–58.

Hook, Ernest B., and Dorothy Warburton. 2014. "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." *Human*

- Genetics* 133(4): 417–24.
- Jørgensen, Kristian T. et al. 2010. “Autoimmune Diseases in Women with Turner’s Syndrome.” *Arthritis and Rheumatism* 62(3): 658–66.
- Kesler, SR. 2007. “Turner Syndrome.” *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 16(3): 709–22.
- Kidd, Jeffrey M. et al. 2008. “Mapping and Sequencing of Structural Variation from Eight Human Genomes.” *Nature* 453(7191): 56–64.
- Kwon, Ahreum et al. 2017. “Risk of Gonadoblastoma Development in Patients with Turner Syndrome with Cryptic Y Chromosome Material.” *Hormones and cancer* 8(3): 166–73.
- Lin, Angela E. et al. 2019. “Recognition and Management of Adults with Turner Syndrome: From the Transition of Adolescence through the Senior Years.” *American Journal of Medical Genetics, Part A* 179(10): 1987–2033.
- Lopez, Marisol et al. 1998. “Frequency of Y Chromosomal Material in Mexican Patients with Ullrich-Turner Syndrome.” *American Journal of Medical Genetics* 76(2): 120–24.
- Maiti, Abhishek, and Sudip Chatterjee. 2014. “Turner Syndrome: Fifteen Years’ Experience in India.” *Journal of Obstetrics and Gynecology of India* 64(1): 121–23.
- Marqui, Trovó de. 2015. “REVISTA PAULISTA DE PEDIATRIA Turner Syndrome and Genetic Polymorphism: A Systematic Review PALAVRAS-CHAVE.” *Revista Paulista de Pediatria (English Edition)* 33(3): 363–70.
- Matsumura, Yutaka et al. 1998. “Identification of the Human Klotho Gene and Its Two

- Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242(3): 626–30.
- Mitchell, Laura E. et al. 2015. “Genome-Wide Association Study of Maternal and Inherited Effects on Left-Sided Cardiac Malformations.” *Human Molecular Genetics* 24(1): 265–73.
- Mortensen, K H et al. 2009. “Increased Prevalence of Autoimmunity in Turner Syndrome-Influence of Age.”
- Nabeshima, Yo Ichi, and Hiroaki Imura. 2008. “ α -Klotho: A Regulator That Integrates Calcium Homeostasis.” *American Journal of Nephrology* 28(3): 455–64.
- Nazli Gonc, E., Alev Ozon, Ayfer Alikasifoglu, and Nurgun Kandemir. 2002. “Type 1 Diabetes Mellitus in a 3 1/2 Year-Old Girl with Turner’s Syndrome.” *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 15(8): 1203–6.
- Peralta López, María et al. 2012. “Association of Vitamin D Receptor Gene Cdx 2 Polymorphism with Bone Markers in Turner Syndrome Patients.” *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 25(7–8): 669–71.
- Pietzner, Vera et al. 2014. “Low-Level Hyperinsulinism with Hypoglycemic Spells in an Infant with Mosaic Turner Syndrome and Mild Kabuki-like Phenotype: A Case Report and Review of the Literature.” *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 27(1–2): 165–70.
- Robles Valdés, Carlos et al. 2003. “Growth, Growth Velocity and Adult Height in Mexican Girls with Turner’s Syndrome.” *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 16(8): 1165–73.

- Ross, Mark T. et al. 2005. "The DNA Sequence of the Human X Chromosome." *Nature* 434(7031): 325–37.
- Rueda, Blanca et al. 2008. "Factores Genéticos Comunes En Autoinmunidad." *Reumatología Clínica* 4: 1–4.
- Shunsuke Yamada, M.D., Ph.D. and Cecilia M Giachell. 2016. "Vascular Calcification in CKD-MBD: Roles for Phosphate, FGF23, AND Klotho." *Physiology & behavior* 176(3): 139–48.
- Struwe, E. et al. 2006. "No Evidence for Angiotensin Type 2 Receptor Gene Polymorphism in Intron 1 in Patients with Coarctation of the Aorta and Ullrich-Turner Syndrome." *Pediatric Cardiology* 27(5): 636–39.
- Sybert, Virginia P, and Mccauley Elizabeth. 2004. "Turner's Syndrome." *the new england journal of medicine*: 1227–38.
- Tan, K. B.L., and George S.H. Yeo. 2009. "Pattern of Turner Syndrome in Singapore (1999-2004)." *Singapore Medical Journal* 50(6): 587–90.
- Thakkinstian, Ammarin et al. 2004. "Meta-Analysis of Molecular Association Studies: Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and BMD as a Case Study." *Journal of Bone and Mineral Research* 19(3): 419–28.
- Uitterlinden, André G. et al. 2001. "Interaction between the Vitamin D Receptor Gene and Collagen Type I α 1 Gene in Susceptibility for Fracture." *Journal of Bone and Mineral Research* 16(2): 379–85.
- Villanueva-Ortega, E. et al. 2017. "Analysis of PTPN22, ZFAT and MYO9B Polymorphisms in Turner Syndrome and Risk of Autoimmune Disease."

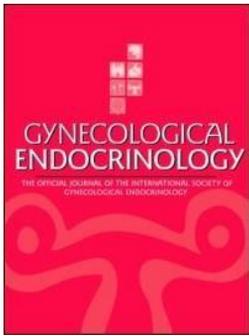
International Journal of Immunogenetics 44(4): 153–57.

Wu, Ping Hsun et al. 2020. “The Association between Single Nucleotide Polymorphisms of Klotho Gene and Mortality in Elderly Men: The MrOS Sweden Study.” *Scientific Reports* 10(1): 1–8.

Xu, Yuechi, and Zhongjie Sun. 2015. “Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging.” *Endocrine Reviews* 36(2): 174–93.

Zhang, Yu et al. 2019. “Association between Vitamin D Supplementation and Mortality: Systematic Review and Meta-Analysis.” *BMJ*. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.l4673>.

13 ARTÍCULO PUBLICADO



Low bone mineral density and renal malformation in Mexican patients with Turner syndrome are associated with single nucleotide variants in vitamin D-metabolism genes

Rehotbevely Barrientos-Rios, Sara Frias, José A. Velázquez-Aragón, Camilo E. Villaroel, Silvia Sánchez, Bertha Molina, Angélica Martínez, Alessandra Carnevale, Benilde García-de-Teresa, Edmundo Bonilla, Christian David Alvarado-Araiza, Alejandro Valderrama-Hernández, Paul Tadeo Ríos-Gallardo, Raúl Calzada-León, Nelly Altamirano-Bustamante & Leda Torres

To cite this article: Rehotbevely Barrientos-Rios, Sara Frias, José A. Velázquez-Aragón, Camilo E. Villaroel, Silvia Sánchez, Bertha Molina, Angélica Martínez, Alessandra Carnevale, Benilde García-de-Teresa, Edmundo Bonilla, Christian David Alvarado-Araiza, Alejandro Valderrama-Hernández, Paul Tadeo Ríos-Gallardo, Raúl Calzada-León, Nelly Altamirano-Bustamante & Leda Torres (2019): Low bone mineral density and renal malformation in Mexican patients with Turner syndrome are associated with single nucleotide variants in vitamin D-metabolism genes, *Gynecological Endocrinology*, DOI: [10.1080/09513590.2019.1582626](https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1582626)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1582626>

 View supplementary material 

Published online: 19 Mar 2019. 

 Submit your article to this journal 

 View Crossmark data 



Low bone mineral density and renal malformation in Mexican patients with Turner syndrome are associated with single nucleotide variants in vitamin D-metabolism genes

Rehotbevely Barrientos-Rios^{a,b}, Sara Frias^{a,c}, José A. Velázquez-Aragón^d, Camilo E. Villaroel^e, Silvia Sánchez^a, Bertha Molina^a, Angélica Martínez^f, Alessandra Carnevale^g, Benilde García-de-Teresa^a, Edmundo Bonilla^b, Christian David Alvarado-Araiza^h, Alejandro Valderrama-Hernández^h, Paul Tadeo Ríos-Gallardo^h, Raúl Calzada-León^h, Nelly Altamirano-Bustamante^h and Leda Torres^a 

^aLaboratorio de Citogenética, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, Mexico; ^bPosgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, Mexico; ^cDepartamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico; ^dLaboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, Mexico; ^eDepartamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, Mexico; ^fDepartamento de Inmunogenética y Enfermedades Metabólicas, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, Mexico; ^gLaboratorio de Enfermedades Mendelianas, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, Mexico; ^hServicio de Endocrinología, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, Mexico

ABSTRACT

Turner syndrome (TS) is a common genetic disorder. TS-phenotype includes short stature, gonadal dysgenesis, cardiac and kidney malformations, low bone mineral density (low-BMD) and thyroiditis. TS-phenotype varies from patient to patient and the cause is not clear, the genomic background may be an important contributor for this variability. Our aim was to identify the association of specific single nucleotide variants in the *PTPN22*, *VDR*, *KL*, and *CYP27B1* genes and vitamin D-metabolism, heart malformation, renal malformation, thyroiditis, and low-BMD in 61 Mexican TS-patients. DNA samples were genotyped for SNVs: rs7975232 (*VDR*), rs9536282 (*KL*), rs4646536 (*CYP27B1*), and rs1599971 (*PTPN22*) using the KASP assay. Chi-square test under a recessive model and multifactorial dimensionality reduction method were used for analysis. We found a significant association between renal malformation and the rs9536282 (*KL*) variant and between rs4646536 (*CYP27B1*) and low-BMD, these variants may have modest effects on these characteristics but contribute to the variability of the TS phenotype. In addition, we identified gene-gene interactions between variants in genes *KL*, *CYP27B1* and *VDR* related to vitamin D-metabolism and low-BMD in TS-patients. Our results support the idea that the genetic background of TS-patients contributes to the clinical variability seen in them.

ARTICLE HISTORY

Received 4 September 2018
Accepted 11 February 2019
Published online 9 March 2019

KEYWORDS

Turner syndrome; low bone mineral density; rs7975232 (*VDR*); rs9536282 (*KL*); rs4646536 (*CYP27B1*)

Introduction

Turner syndrome (TS) is one of the most frequent chromosomal abnormalities, counting 1:2500 female newborns. It is defined by the presence of an X chromosome with a complete or partial absence of the second sexual chromosome [1,2]. Nearly, 60% of TS-patients have a 45,X karyotype, while the rest show structural alterations of one of the sex chromosomes or mosaicism with a normal cell line that coexists with a monosomic or structurally abnormal sex chromosome cell line [3,4].

Clinically, TS-patients present a phenotype that includes, among other manifestations, gonadal dysgenesis, amenorrhea, webbing of the neck, short stature, congenital heart defects and renal malformation [4,5]. TS patients have shown a higher susceptibility than the general population to develop autoimmune conditions like thyroiditis and type I diabetes mellitus [6–8]. Nearly, 80% of TS-patients present low bone mineral density

(low-BMD), leading to an increased risk of osteoporosis [9]. The most frequent birth disorder in TS is congenital heart disease, which is an important cause of morbidity and mortality [10].

It is known that the TS-phenotype results from haploinsufficiency of pseudoautosomal-genes, and although certain phenotype-karyotype correlations have been proposed, this does not explain the phenotypic variability in TS [11]. Studies on genomic variants in autosomal loci have found associations between single nucleotide variants [12] and clinical manifestations in TS-patients; an association between the presence of SNVs in the *VDR* gene and a low-BMD has been described [13–15]. In Latin-American populations, the association between SNVs in *PTPN22* or *VDR* and autoimmune thyroiditis in TS-patients has been observed [16–18]. In addition in elder non-TS females, SNVs in *CYP27B1* have been associated with fracture risk [19] and, different variants in *KL* have been associated with coronary artery

Table 1. Frequency of clinical features in Turner syndrome patients with 45,X karyotype and with other cytogenetic variants.

Clinical features	Turner syndrome patients included in this study			de Araujo <i>et al.</i> [5] n¼ 42		Bispo <i>et al.</i> [29] n¼ 65	
	45,X	Other karyotypes ^a	Total	45,X	Other karyotypes	45,X	Other karyotypes
Short stature (HP:0004322)	n¼ 40 (%)	n¼ 21 (%)	n¼ 61 (%)	n¼ 27 (%)	n¼ 15 (%)	n¼ 40 (%)	n¼ 25 (%)
Short stature (HP:0004322)	40/40 (100)	20/21 (95)	60/61 (98)	27/27 (100)	15/15 (100)	36/40 (90)	21/25 (84)
High arched palate (HP:0000218)	32/40 (80)	16/21 (76)	48/61 (79)	c	c	c	c
Short 4th (HP:0010044) and 5th metacarpals (HP:0010047)	32/40 (80)	11/21 (52)	43/61 (70)	c	c	c	c
Cubitus valgus (HP:0002967)	22/40 (55)	10/21 (48)	32/61 (52)	5/27 (19)	4/15 (27)	5/40 (13)	9/25 (36)
Widely-spaced nipples (HP:0006610)	25/40 (63)	7/21 (33)	32/61 (52)	c	c	c	c
Low posterior hairline (HP:0002162)	23/40 (58)	7/21 (33)	30/61 (49)	23/27 (85)	13/15 (87)	c	c
Heart malformation (HP:0001627)	19/40 (48)	5/21 (24)	24/61 (39)	12/27 (44)	7/15 (47)	10/40 (25)	2/25 (8)
Webbed neck (HP:0000465)	19/40 (48)	4/21 (19)	23/61 (38)	7/27 (26)	7/15 (47)	23/40 (58)	7/25 (28)
Low set ears (HP:0000369)	19/40 (48)	3/21 (14)	22/61 (36)	c	c	c	c
Broad chest (HP:0000914)	17/40 (43)	4/21 (19)	21/61 (34)	c	c	c	c
Multiple nevi (HP:0001054)	13/40 (33)	7/21 (33)	20/61 (33)	c	c	c	c
Thyroiditis (HP:0100646)	14/40 (35)	8/21 (38)	22/61 (36)	5/27 (19)	3/15 (20)	c	c
Eye abnormalities (HP:0000478)	7/40 (18)	4/21 (19)	11/61 (18)	c	c	c	c
Renal malformation (HP:0012210)	7/40 (18)	3/21 (14)	10/61 (16)	7/27 (26)	6/15 (40)	c	c
Low bone mineral density (HP:0004348)	28/34 (82)	13/17 (76)	41/51 ^b (80)	c	c	c	c

^aNomenclature according ISCN 2016 [25]

46,X,i(X)(q10)

46,X,i(Y)(q10)

mos 45,X/46,XX

mos 45,X/47,XXX/46,XX

mos 45,X/46,XY

mos 45,X/46,X,i(X)(q10)

mos 45,X/46,X,+mar

^bBone mineral density studies were only available in 51 Turner syndrome patients.

^cNot reported.

disease [20] or chronic renal failure [21]. *VDR*, *KL*, and *CYP27B1* genes are all involved in the vitamin D-metabolism pathway and their variants may lead to important defects in calcium metabolism, which could affect the immune and bone biology [22,23]. The aim of this research is to explore a possible association between SNVs located in the *KL*, *VDR*, *CYP27B1*, and *PTPN22* genes and the presence of low-BMD, thyroiditis, heart, and renal malformations in Mexican patients with TS.

Materials and methods

Study population

This study was conducted at the Instituto Nacional de Pediatría in Mexico City, with Institutional Ethics and Research Committees approval. Written informed consent was obtained from all participants. Patients had a clinical TS-diagnosis confirmed by karyotyping, they were younger than 18 years old and had Mexican descent (parents and grandparents were born in Mexico). The control group was composed of healthy fertile women with normal phenotype and karyotype.

Cytogenetic analysis

Karyotype in lymphocytes was performed using conventional methods [24]. At least 30 metaphases at 450 G-band resolution were analyzed for each individual, the results were reported according to the ISCN [25].

Clinical assessment

TS-patients had a complete clinical assessment by the cardiology, endocrinology, genetics, nephrology, ophthalmology, and psychology clinics. BMD analysis by dual-energy X-ray absorptiometry of hip, spine, and chest was done in most of them. All clinical

and laboratory data were taken from the patient's clinical record, focusing in some clinical manifestations that affect quality of life, like congenital heart defects, thyroiditis, renal malformation, and low-BMD.

SNV selection and genotyping

The rs7975232 (*VDR*), rs9536282 (*KL*), rs4646536 (*CYP27B1*), and rs1599971 (*PTPN22*) polymorphisms were selected according to the minor allele frequency (MAF) in individuals from Mexican ancestry, aiming of increase the statistical power to detect possible associations; the MAF for these four loci was between 0.15 and 0.48 (Supplementary Table S1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, <http://www.hgvs.org/central-mutation-snp-databases>) and in agreement with previous findings [16–18,26].

Genomic DNA was obtained from blood samples using standard methods. Genotyping of the two possible alleles for each SNV was performed by the KASP assay (LGC Genomics, Beverly, MA, <http://www.lgcgenomics.com/>).

Statistical analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested using Fisher's exact test for all variants (TS-control). For independent variant association between TS and controls, a Chi-square test under a recessive model was performed. We calculated the *p* values, 95% confidence intervals and odds ratios (ORs) with the DeFinetti-Software (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Correction for multiple comparisons was performed with the Benjamini–Hochberg false discovery rate method [27].

Gene–gene interactions were analyzed for the four variants comparing TS and controls by a multifactorial dimensionality reduction (MDR) method, using MDR-software [28]. We applied MDR-standard analysis with default parameters with a 10-fold cross-validation (CV). In order to obtain the best models for the

Table 2. Association of variants *VDR* (rs7975232), *KL* (rs9536282), *CYP27B1* (rs4646536) and *PTPN22* (rs1599971) with clinical manifestations in Turner syndrome patients (TS).

Gene (SNV)	Clinical characteristic	Genotype				Allelic frequency		OR (95%CI)	p	
		n	n	n	n	C	T			
<i>KL</i> (rs9536282)	TS	61	51	9	1	0.909	0.091			
	Heart malformation	24/61	22	2	0	0.958	0.042	0.349	[0.064–1.708]	.385
	Renal malformation	10/61	7	2	1	0.8	0.2	17.800	[1.661–479.134]	.017**
	Thyroiditis	22/61	19	3	0	0.91	0.09	0.573	[0.022–14.75]	.45
	Low BMD	41/51 ^a	33	7	1	0.89	0.109	0.085	[0.032–22.62]	.602
	Total	CC	TC	TT	C	T				
<i>CYP27B1</i> (rs4646536)	TS	61	11	27	23	0.401	0.598			
	Heart malformation	24/61	6	10	8	0.458	0.541	0.444	[0.103–1.922]	.273
	Renal malformation	10/61	1	7	2	0.45	0.55	0.952	[0.077–11.787]	.969
	Thyroiditis	22/61	2	11	9	0.44	0.66	2.746	[0.473–16.213]	.248
	Low BMD	41/51 ^a	6	15	20	0.329	0.67	6.667	[1.971–45.793]	.037**
	Total	AA	CA	CC	A	C				
<i>VDR</i> (rs7975232)	TS	61	7	26	28	0.327	0.672			
	Heart malformation	24/61	4	8	12	0.333	0.666	0.562	[0.106–2.999]	.497
	Renal malformation	10/61	1	5	4	0.35	0.65	1.000	[0.094–10.664]	1.000
	Thyroiditis	22/61	1	10	11	0.35	0.65	3.23	[0.332–31.537]	.292
	Low BMD	41/51 ^a	6	17	18	0.353	0.646	0.259	[0.187–79.980]	.209
	Total	CC	TC	TT	C	T				
<i>PTPN22</i> (rs1599971)	TS	61	11	33	17	0.45	0.549			
	Heart malformation	24/61	2	17	5	0.437	0.562	1.875	[0.294–11.968]	.502
	Renal malformation	10/61	0	7	3	0.35	0.65	5.552	[0.360–118.712]	.140
	Thyroiditis	22/61	4	11	7	0.46	0.54	1.167	[0.204–3.283]	.85
	Low BMD	41/51 ^a	10	21	10	0.5	0.5	0.143	[0.007–3.121]	.103

^aBone mineral density (BMD) studies were only available in 51 TS patients. Bold letters indicate data with difference statistically significant.

**Significant *p* values after the Benjamini-Hochberg correction for multiple comparisons.

MDR-analysis, we used testing accuracy (TA) values and a CV of 10. The *p* values were calculated using the MDR-permutation test module with 10 000 repetitions. The TS-patients grouped by clinical findings – congenital heart defects, thyroiditis, renal malformation and low-BMD – were compared for independent variant association and gene-gene interaction by the same methodologies described for TS and controls.

Results

Study population

We studied 61 patients with TS, the age of TS-studied group ranged from 1 to 18 years old with a median age of 11 years old, and 69 healthy women ranged from 14 to 38 years old with median age of 26 years old. The karyotypes and the clinical manifestations found in this group of TS-patients had similar frequencies to what has been previously reported [4,5,29], and this was true irrespective of the karyotype, as detailed in Table 1.

SNVs association with phenotype

The genotype and allele distribution of these variants in TS and controls depicted in Supplementary Table S2, were all found to be in HWE. No association was found between single variants and belonging to either the TS or the control group. The allele distribution, genotype of the four studied SNVs and their association with the selected clinical features in TS-patients are shown in Table 2. Significant association of single variants and the presence of particular clinical features in TS-patients was found after the Benjamini-Hochberg correction for multiple comparisons between the rs9536282 in *KL* and the presence of renal malformation *p*=.017, OR 17.800 [1.66–479.13]; as well as

rs4646536 (*CYP27B1*) with low-BMD, *p*=.037, OR 6.667 [1.971–45.79]. Meanwhile, variants in the *VDR* and *PTPN22* did not show a statistically significant association with the selected clinical features.

Multifactorial dimensionality reduction analysis identified significant gene-gene interactions between variants in the studied genes that participate in the metabolic pathway of vitamin D: rs9536282 (*KL*), rs4646536 (*CYP27B1*), and rs7975232 (*VDR*). Interaction between these three variants confers a greater risk of low-BMD in TS-patients as shown in Table 3.

Discussion

The aim of this work was to examine a possible association between SNVs located in the *KL*, *VDR*, *CYP27B1*, and *PTPN22* genes and the presence of selected clinical features in Mexican TS-patients. Two single variants were associated to phenotypic features: the rs4646536 variant of the *CYP27B1* is associated to low-BMD and the variant rs9536282 of the *KL* associates to the presence of renal malformation, these SNV may have modest effects on these characteristics but could contribute to the variability of the TS phenotype. Moreover, within the TS-group, gene-gene interaction of variants in *KL*, *CYP27B1*, and *VDR* was associated to low-BMD, suggesting a significant role of vitamin D-metabolism genes in the presentation of this clinical feature in these patients.

It has long been recognized that there is no clear karyotype-phenotype correlation that thoroughly resolves the TS-phenotype. However, certain clear correlations have been noticed like the presence of a Y chromosome that prevents the typical TS short stature [11], or that the phenotype is less severe when the patients present mosaicism with a 46,XX cell line [29]. In this cohort of TS-patients, both the presented clinical manifestations

Table 3. Genes that participate in the vitamin D metabolic pathway show gene–gene interactions that influence the bone mineral density (BMD) status in Turner syndrome patients, as identified by MDR [28].

Gene–gene interaction	Clinical characteristic	Testing accuracy	Cross-validation OR (95%CI)	p Value (10,000 permutations)
rs9536282 (<i>KL</i>), rs7975232 (<i>VDR</i>), rs4646536 (<i>CYP27B1</i>)	LOW BMD	0.74	10/10 19.9 (1.08–36.63)	.035

and their different possible chromosomal constitution have a similar distribution than what has been reported in other populations [4,5,11,29]. Although congenital heart disease, webbed neck and broad chest were found at a higher frequency in the 45,X group, no statistically significant association between those clinical features and a 45,X karyotype was demonstrated (Table 1). A single patient had a karyotype with a Y chromosome and she showed normal stature.

In our patients, the T allele of the rs9536282 (*KL*) variant was more frequent in TS-patients who had a renal malformation comparing to the TS-patients with congenital heart defects as we hypothesized according to the studies in East-Asian population which reported that the *KL* variant rs9536282 could be a susceptibility factor for coronary artery calcification (CAC) [20]. This *KL* variant has been associated with CAC in men, without taking into consideration renal function and calcium/phosphate metabolism-related factors [30,31]. Kidney abnormalities in TS have not been clearly explained yet, the only gene that has been studied is HNF-1b where despite the intronic polymorphism IV8

+ 48insC being present in two TS patients, the authors conclude that there is no direct relationship between this polymorphism and horseshoe kidney in TS [32].

In addition, we found an association in TS-patients between the TT genotype of the variant rs4646536 located in *CYP27B1* and low-BMD. The *CYP27B1* plays a central role in calcium homeostasis and bone growth [33]. To the best of our knowledge, the association between *CYP27B1* variants and low-BMD in TS-patients has not been previously found; nevertheless, it has been reported that *CYP27B1* is an important mediator of bone metabolism [33].

The analysis of the variants in the *VDR* and *PTPN22* genes did not show a statistically significant association with the investigated clinical features; which is different from what was found in Brazilian or Argentinian population [13,16], and similar to a recent report that shows another *PTPN22* variant (rs2476601) that is not associated with autoimmune diseases in TS Mexican patients [17].

We sought gene–gene interactions among variants of genes involved in the metabolic pathway of vitamin D by using the MDR nonlinear method; this gene–gene interaction analysis provides a clue to understand the etiology of phenotype in TS-patients. In the present study, we found gene–gene interactions between the studied variants of *KL*, *CYP27B1*, and *VDR* that confer a greater risk for low-BMD in TS-patients; supporting the role of genes involved in the metabolism of vitamin D, in the bone health of TS-patients.

BMD is directly linked to vitamin D intake; two reports have shown that raising vitamin D serum level is an effective preventive strategy to reduce fracture risk in the elderly [19,34]. Specifically, in TS, current studies have reported that low serum vitamin D concentration may contribute to osteopenia/osteoporosis, two characteristics that are known to be consequences of low-BMD. Low vitamin D levels have been attributed to inadequate sun exposure and low intake in women with TS [9,35]. Our results suggest that in addition to environmental factors, genetic variants in genes that affect vitamin D-metabolism could be associated to low-BMD in TS-patients. In order to better

support our findings, analysis of a larger group of TS-patients as well as replication of these data in TS-patients from other populations is desired. Also, the genotyping strategy chosen in this study confers the limitation that only the specific SNV of interest is studied. We are then unaware of the real allelic variability in these patients, further analysis of other alleles in these genes of interest would also strengthen these findings.

Our results suggest that variants in the *KL* gene could be associated with renal malformation in patients with TS, some studies have found that *KL* downregulation is the earliest biomarker of chronic kidney disease (CKD) and the initiator of CKD-mineral bone disorder [30]. In addition, we observed that variants in genes that have a role in vitamin D-metabolism seem to be contributing to low-BMD in TS-patients, supporting that the genetic background of TS-patients contributes to the clinical feature variability seen in them.

Ethical approval

The Ethics and Research Committees from the Instituto Nacional de Pediatría approved this study (084/2010 and 057/2015).

Disclosure statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

We acknowledge all patients who participated in the study, the Academic Writing Team of the Coordinación de Estudios de Posgrado, UNAM for their help with this manuscript and María Antonieta Mora for fruitful discussions.

Funding

This work is supported by the FONCYCIT 95419, CONACYT-FOSSIS 142040, INP 084/2010 and 057/2015. CONACYT-scholarship 250639 for RBR.

ORCID

Leda Torres  <http://orcid.org/0000-0001-5336-6610>

References

- [1] Nielsen J, Wohlert M. Sex chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1990;26:209–223.
- [2] Domínguez Hernández C, Torres Morales A, Álvarez Hernández L, et al. Turner syndrome: experience with a select group from the Mexican population. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2013;70:465–473.
- [3] Levitsky LL, Luria AH, Hayes FJ, et al. Turner syndrome: update on biology and management across the life span. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015;22:65–72.

- [4] Robles Valdés C, del Castillo Ruiz V, Oyoqui J, et al. Growth, growth velocity and adult height in Mexican girls with Turner's syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003;16:1165–1173.
- [5] de Araujo C, Galera BB, Galera MF, et al. Clinical and cytogenetic aspects of the Turner syndrome in the Brazilian Western region. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2010;32:381–385.
- [6] Mortensen KH, Cleemann L, Hjerrild BE, et al. Increased prevalence of autoimmunity in Turner syndrome – influence of age. *Clin Exp Immunol.* 2009;156:205–210.
- [7] Witkowska-SRedek E, Borowiec A, Kucharska A, et al. Thyroid autoimmunity in girls with Turner syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1022:71–76.
- [8] Fukuda I, Hizuka N, Kurimoto M, et al. Autoimmune thyroid diseases in 65 Japanese women with Turner syndrome. *Endocr J.* 2009; 56:983–986.
- [9] Gravholt CH, Lauridsen AL, Brixen K, et al. Marked disproportional-ity in bone size and mineral, and distinct abnormalities in bone markers and calcitropic hormones in adult turner syndrome: a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2798–2808.
- [10] Bondy CA, Group TSS. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:10–25.
- [11] Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med.* 2004;351:1227–1238.
- [12] Zhang F, Lupski JR. Non-coding genetic variants in human disease. *Hum Mol Genet.* 2015;24:R102–R110.
- [13] Peralta Lopez M, Miras M, Silvano L, et al. Vitamin D receptor genotypes are associated with bone mass in patients with Turner syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2011;24:307–312.
- [14] Peralta Lopez M, Centeno V, Miras M, et al. Association of vitamin D receptor gene Cdx2 polymorphism with bone markers in Turner syndrome patients. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2012;25:669–671.
- [15] Thakkestian A, D'Este C, Eisman J, et al. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res.* 2003;19:419–428.
- [16] Bianco B, Verreschi ITN, Oliveira KC, et al. *PTPN22* polymorphism is related to autoimmune disease risk in patients with Turner syndrome. *Scand J Immunol.* 2010;72:256–259.
- [17] Villanueva-Ortega E, Ahedo B, Fonseca Sánchez MA, et al. Analysis of *PTPN22*, *ZFAT* and *MYO9B* polymorphisms in Turner syndrome and risk of autoimmune disease. *Int J Immunogenet.* 2017;44: 153– 157.
- [18] Bianco B, Verreschi IT, Oliveira KC, et al. Analysis of vitamin D receptor gene (*VDR*) polymorphisms in Turner syndrome patients. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28:326–329.
- [19] Clifton Bligh RJ, Nguyen TV, Au A, et al. Contribution of a common variant in the promoter of the 1- α -hydroxylase gene (*CYP27B1*) to fracture risk in the elderly. *Calcif Tissue Int.* 2011;88:109–116.
- [20] Zhai C, Tang G, Qian G, et al. Polymorphism of *klotho* G-395A and susceptibility of coronary artery disease in East-Asia population: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:1582–1588.
- [21] Xu X, Liang X, Hu G, et al. Renal function and *Klotho* gene polymorphisms among Uyghur and Kazak populations in Xinjiang. *China Med Sci Monit.* 2015;21:44–51.
- [22] Anderson PH, Lam NN, Turner AG, et al. The pleiotropic effects of vitamin D in bone. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;136:190–194.
- [23] Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta.* 2006;371:1–12.
- [24] Hernández-Jardines A, Molina B, del Castillo V, et al. Detection of short-term chromosomal damage due to therapeutic ¹³¹I exposure in patients with thyroid cancer. *Rev Invest Clin.* 2010;62:31–38.
- [25] McGowan Jordan J, Simons A, Schmid M. *ISCN 2016. An international system for human cytogenomic nomenclature (2016)*. In: McGowan Jordan J, Simons A, Schmid M, editors. *Karyotype Designation*; chap. 4, pp. 37–46. Basel, Switzerland: Karger; 2016.
- [26] Trovo de Marqui AB. Turner syndrome and genetic polymorphism: a systematic review. *Rev Paul Pediatr.* 2015;33:364–371.
- [27] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B (Methodol).* 1995;57:289–300.
- [28] Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theor Biol.* 2006;241:252–261.
- [29] Bispo AV, Dos Santos LO, Burégio Frota P, et al. Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype. *Genet Mol Res.* 2013;12:4243–4250.
- [30] Hu MC, Kuro-O M, Moe OW. *Klotho* and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol.* 2013;180:47–63.
- [31] Morita H, Takeda Y, Fujita S, et al. Gender specific association between serum fibroblast growth factor 23/a-*Klotho* and coronary artery and aortic valve calcification. *J Atheroscler Thromb.* 2015;22: 1338–1346.
- [32] D'Amato E, d'Annunzio G, Calcaterra V, et al. Horseshoe kidney malformation in Turner syndrome is not associated with *HNF-1beta* gene mutations. *Pediatr Nephrol.* 2008;23:137–140.
- [33] Zalewski A, Ma NS, Legeza B, et al. Vitamin D-dependent rickets type 1 caused by mutations in *CYP27B1* affecting protein interactions with adrenodoxin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101:3409–3418.
- [34] Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, et al. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 2005;293:2257–2264.
- [35] Bakalov VK, Bondy CA. Fracture risk and bone mineral density in Turner syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9:145–151.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00133

Matrícula: 210380828

ESTUDIO CLÍNICO Y GENÓMICO
EN PACIENTES CON SÍNDROME DE
TURNER: CORRELACIÓN
FENOTIPO-GENOTIPO

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 18:00 horas del día 21 del mes de octubre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
DR. JOSE ANTONIO VELAZQUEZ ARAGON
DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ
DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: REHOTBEVELY BARRIENTOS RIOS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



REHOTBEVELY BARRIENTOS RIOS
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALBA FERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DR. JOSE ANTONIO VELAZQUEZ ARAGON

VOCAL

DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ

SECRETARIA

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ