



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“EXPRESIÓN DE MIR-33, VARIANTES DE APOE Y  
COLESTEROL HDL COMO FACTORES DE RIESGO EN  
SÍNDROME DE DOWN”**

**TESIS**

QUE PRESENTA

**LIC. KENIA KRISTEL ESPARZA OCAMPO**

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

DIRECTOR(ES)

**DR. JAVIER A. MAGAÑA GOMEZ  
DRA. CARLA E. ANGULO ROJO**

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A FEBRERO DE 2024.



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## DEDICATORIA

A mis padres, quienes han sido mi ejemplo y sustento,  
por lo que estoy eternamente agradecida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONACYT) por el apoyo económico otorgado. Al programa de la Maestría en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa por permitirme formar parte de esta institución. Asimismo, a cada uno de los miembros del programa por los conocimientos compartidos y al Centro de Investigación Aplicada a la Salud Pública (CIASaP) por el espacio y apoyo del equipo.

Un agradecimiento especial a mis directores de tesis, Dr. Javier Magaña Gómez y Dra. Carla Ernestina Angulo Rojo, por sus consejos, comentarios y críticas para mi crecimiento.

A mis compañeros de laboratorio, por formar un gran equipo, y a mi familia y amigos por el apoyo durante este proceso.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. Bases teóricas del síndrome de Down.....	6
4.1.1. Mecanismo genético.....	7
4.1.1.1. Trisomía regular.....	7
4.1.1.2. Translocación.....	8
4.1.1.3. Mosaicismo.....	11
4.1.2. Epidemiología.....	11
4.1.3. Región crítica del cromosoma 21.....	12
4.2. Patologías asociadas.....	13
4.2.1. Dislipidemias y síndrome de Down.....	15
4.3. Apolipoproteína E.....	16
4.4. miR-33.....	20
4.5. Antecedentes.....	23
V. JUSTIFICACIÓN.....	25
VI. HIPÓTESIS.....	26
VII. OBJETIVOS.....	27
7.1. Objetivo general.....	27
7.2. Objetivos específicos.....	27
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
8.1. Diseño experimental.....	28
8.1.1. Tipo de estudio.....	28
8.1.2. Población de estudio.....	28
8.1.3. Criterios de selección.....	29
8.1.3.1. Criterios de inclusión.....	29
8.1.3.2. Criterios de eliminación.....	29

<b>8.2. Metodología</b> .....	29
<b>8.2.1. Evaluación antropométrica</b> .....	29
<b>8.2.2. Muestra sanguínea</b> .....	30
<b>8.2.3. Evaluación bioquímica</b> .....	31
<b>8.2.4. Cuantificación de miRNAs</b> .....	31
8.2.4.1. Purificación de miRNAs totales .....	31
8.2.4.2. Retro-transcripción (RT), síntesis de c-DNA .....	32
8.2.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa tiempo real (qPCR) .....	32
<b>8.2.5. Genotipificación de APOE</b> .....	33
8.2.5.1. Extracción de DNA.....	33
8.2.5.2. Discriminación alélica mediante sondas Taqman.....	34
<b>8.2.6. Análisis estadístico</b> .....	36
<b>IX. RESULTADOS</b> .....	37
<b>9.1. Población de estudio</b> .....	37
<b>9.1. Características antropométricas de la población</b> .....	39
<b>9.2. Análisis bioquímicos de la población de estudio</b> .....	41
<b>9.3. Niveles de expresión de los microRNAs de estudio</b> .....	44
<b>9.4. Genotipificación de apolipoproteína E</b> .....	53
9.4.1. Frecuencia genotípica.....	53
9.4.2. Frecuencia alélica .....	53
<b>9.5. Correlación de variables</b> .....	57
<b>X. DISCUSIÓN</b> .....	67
<b>XI. CONCLUSIONES</b> .....	80
11.1. Conclusión general .....	80
11.2. Conclusiones específicas .....	80
<b>XII. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO</b> .....	81
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	82
<b>XIV. ANEXOS</b> .....	86
11.1. Documentos complementarios .....	86
<b>XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES</b> .....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Translocación de cromosoma 21 en cromosoma 14.....	10
Objetivos de las terapias para la EA basadas en APOE.....	19
Regulación del microRNA del metabolismo de c-HDL.....	22
Incidencia del mecanismo genético del síndrome de Down en la población de estudio. .....	38
Categorización de percentiles de IMC/Edad.....	40
Media de concentración de c-HDL en los grupos de estudio.....	42
Media de concentración de colesterol total en los grupos de estudio.....	43
Niveles de expresión de miR-33a en los grupos de estudio.....	45
Niveles de expresión de miR-33b en los grupos de estudio.....	46
Niveles de expresión de miR-33a por grupos de edad en los grupos de estudio.....	48
Niveles de expresión de miR-33b por grupos de edad en los grupos de estudio.....	49
Frecuencia alélica.....	54
Frecuencia genotípica.....	58
Genotipo y concentración de c-HDL en los grupos de estudio.....	59
Concentración de colesterol total en los grupos de estudio, según el genotipo de APOE.....	60
Alelo de riesgo y c-HDL en los grupos de estudio.....	62
Alelo de riesgo y concentración de colesterol total en los grupos de estudio.....	63
Alelo de riesgo y expresión de miR33a en los grupos de estudio.....	65
Alelo de riesgo y miR33 en los grupos de estudio.....	66

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
Condiciones para la retro-transcripción y síntesis de cDNA.....	32
Condiciones para reacción en cadena de polimerasa tiempo real .....	33
Variantes polimórficas evaluadas para el gen de APOE .....	34
Reacción para ensayos de discriminación alélica por qPCR .....	35
Secuencias de nucleotídicas para la discriminación alélica por qPCR para APOE...	35
Condiciones de amplificación para qPCR .....	36
Características antropométricas de los grupos de estudio .....	39
Concentraciones bioquímicas en los grupos de estudio .....	41
Correlación de miR33a con variables de interés .....	51
Correlación de miR33b con variables de interés .....	52
Frecuencia genotípica y alélica del RS 7412 .....	55
Frecuencia genotípica y alélica del RS 429358.....	56

## I. RESUMEN

**Introducción.** El síndrome de Down (SD) es la cromosomopatía más común, debido a la presencia de una copia extra del cromosoma 21. Tiene una prevalencia estimada de 12 casos por cada 10,000 habitantes. La esperanza de vida de la población con SD ha aumentado de manera significativa en las últimas décadas, de 5 años en 1950, hasta alrededor de 60 años de vida en la actualidad. Esto ha contribuido al aumento de enfermedades en esta población, pero al mismo tiempo ha brindado la posibilidad de llevar a cabo mayor número de estudios de riesgo de enfermedad en los pacientes adultos. Recientemente se ha estudiado la apoproteína E (APOE) involucrada en el transporte de lípidos y su relación con enfermedades como Alzheimer. Estudios con miRNAs también han sido más frecuentes en la actualidad, miR-33 ha sido relacionado con la biogénesis del colesterol HDL (c-HDL) al regular la expresión de ABCA1, a su vez HDL se ha relacionado con mayor riesgo de deterioro cognitivo que puede llevar a Alzheimer. **Objetivo.** Establecer la expresión de miR-33, isoformas de APOE y colesterol HDL como factores de riesgo en síndrome de Down. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio de cohorte, de tipo transversal, con alcance descriptivo y relacional. Se estudió a personas con síndrome de Down de 3 a 18 años de ambos sexos. Se tomaron muestras de sangre para cuantificar perfil lipídico y glucosa. La cuantificación de miR-33 se realizó por PCR en tiempo real a partir del plasma purificando miRNAs totales. La genotipificación de las isoformas de APOE se realizó utilizando sondas TaqMan Applied Biosystems. **Resultados.** Se observó baja estatura en el grupo con síndrome de Down en comparación al grupo control, además de niveles significativamente menores de c-HDL. El miR-33 se mostró disminuido en el grupo SD. Sin embargo, la presencia del alelo  $\epsilon 4$  de APOE relacionado a riesgo, se asoció con menores concentraciones de c-HDL en el grupo con SD. **Conclusiones.** Se identificó una asociación entre la presencia del alelo  $\epsilon 4$  de APOE considerado de riesgo y las bajas concentraciones de c-HDL en esta población con alta prevalencia de Alzheimer, sugiriendo que el genotipo de riesgo se asocia con la baja concentración de HDL, que a su vez podría considerarse un factor de riesgo para el desarrollo temprano de Alzheimer.

**Palabras clave:** Síndrome de Down, apolipoproteína E, miR-33, colesterol HDL.

## II. ABSTRACT

**Introduction.** Down syndrome (DS) is the most common chromosomopathy, due to the presence of an extra copy of chromosome 21. It has an estimated prevalence of 12 cases per 10,000 inhabitants. The life expectancy of the population with DS has increased significantly in recent decades, from 5 years in 1950 to around 60 years of life today. This has contributed to the increase in diseases in this population, but at the same time has provided the possibility of carrying out a greater number of disease risk studies in adult patients. Recently, apolipoprotein E (APOE) involved in lipid transport and its relationship with diseases such as Alzheimer's have been studied. Studies with miRNAs have also been more frequent nowadays, miR-33 has been related to the biogenesis of HDL cholesterol (HDL-c) by regulating the expression of ABCA1, in turn HDL has been related to a higher risk of cognitive impairment that can lead to Alzheimer's. **Aim.** Establish the expression of miR-33, APOE isoforms and HDL cholesterol as risk factors in Down syndrome. **Materials and methods.** A cross-sectional cohort study was carried out, with a descriptive and relational scope. People with Down syndrome from 3 to 18 years of age of both sexes were studied. Blood samples were taken to quantify lipid profile and glucose. The quantification of miR-33 was performed by real-time PCR from plasma purifying total miRNAs. Genotyping of APOE isoforms was performed using TaqMan Applied Biosystems probes. **Results.** Short stature was observed in the group with Down syndrome compared to the control group, in addition to significantly lower levels of HDL-C. miR-33 was shown to be decreased in the SD group. However, the presence of the risk-related APOE  $\epsilon$ 4 allele was associated with lower HDL-C concentrations in the DS group. **Conclusions.** An association was identified between the presence of the APOE  $\epsilon$ 4 allele considered risk and low HDL-C concentrations in this population with a high prevalence of Alzheimer's, suggesting that the risk genotype is associated with low HDL concentration, which in turn could perhaps be considered a risk factor for the early development of Alzheimer's.

**Key words:** Down syndrome, apolipoprotein E, mir-33.

### III. INTRODUCCIÓN

El síndrome de Down (SD) es un trastorno genético causado por la presencia de un cromosoma 21 parcial o completo extra, lo cual da como resultado una trisomía caracterizada por discapacidad intelectual y rasgos físicos característicos (de Graaf y col., 2017). A nivel mundial el SD tiene una incidencia entre 1 de cada 1,000 y 1 de cada 1,100 recién nacidos aproximadamente (INSP, 2021). La edad materna mayor a 35 años se ha sido relacionada con un aumento del riesgo de anomalías cromosómicas congénitas (de Graaf y col., 2017).

En condiciones normales cada una de las células humanas tiene 23 pares de cromosomas a nivel del núcleo (H. Basile, 2008). La información presente es heredada a los descendientes, cada uno de los padres hereda aporta un cromosoma de cada para, 22 pares autosomas y un par de cromosomas sexuales (X o Y) (H. Basile, 2008). El nombramiento de los cromosomas deriva de su tamaño, siendo el cromosoma 1 el mayor, aunque ocurrió un error al nombrar a los pares 21 y 22 ya que el cromosoma 21 es el menor y debió ser nombrado como cromosoma 22 (H. S. Basile, 2008). A pesar de ello, se mantuvo esta nomenclatura para evitar confusiones, conservando al al par causante del síndrome de Down como el cromosoma 21, aun siendo el de menor tamaño (H. Basile, 2008).

El fenotipo característico de la trisomía 21, sugiere cómo funcionan los desequilibrios causados por una ganancia genómica como las micro duplicaciones (Antonarakis, 2017). Se han realizado muchas investigaciones explorando el genoma funcional, con base en la secuencia del cromosoma 21 (Antonarakis, 2017). Al mismo tiempo se han utilizado modelos de ratones y cultivos celulares, lo que ha brindado la

oportunidad de observar y descifrar las consecuencias moleculares que pueden traer un desequilibrio en la ganancia de información en el genoma (Antonarakis, 2016).

En la actualidad, se ha observado un aumento significativo en la esperanza de vida de la población con SD, gracias a los avances que han surgido para la prevención, diagnóstico y tratamiento de comorbilidades de esta población (de la Piedra y col., 2017). En las últimas décadas su esperanza de vida incrementó, desde los 9 años, en los primeros reportes del síndrome, a 16 años en 1968 hasta alrededor de 60 años de vida en la actualidad (Iulita y col., 2022; Penrose, 1949).

El aumento en la longevidad ha influido en la mayor prevalencia de enfermedades en esta población, pero al mismo tiempo ha permitido realizar mayor cantidad de estudios de riesgo de enfermedades en los pacientes adultos (Tenneti y col., 2017). A pesar de haber sido considerados un modelo “libre de ateroma” en la antigüedad, las personas con SD han mostrado mayor incidencia a dislipidemias como hipertrigliceridemia y colesterol HDL (c-HDL) bajo, en comparación con la población general, independiente al estado nutricional presente en los individuos (de la Piedra y col., 2017; Tenneti y col., 2017)

Recientemente se ha estudiado la apolipoproteína E (APOE) involucrada en el transporte lípidos y la relación de sus isoformas con enfermedades como alzheimer, lo cual es un indicio de su posible papel en población con SD, ya que el síndrome predispone a la población al deterioro cognitivo (Williams y col., 2020). Estudios con miRNAs también han sido más frecuentes en la actualidad y, en cuanto a dislipidemias, miR-33 ha sido relacionado con la biogénesis del colesterol HDL y la excreción de colesterol, al regular la expresión de ABCA1, isoforma A1 del transportador

dependiente de ATP, y la síntesis de ácidos biliares y su secreción (Williams y col., 2020). Por lo anterior, es necesario establecer si existe una interacción entre las variantes de APOE y los niveles de expresión de miR-33, además del impacto en los niveles de c-HDL circulantes en personas con SD.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Bases teóricas del síndrome de Down

El síndrome de Down (SD) es la discapacidad intelectual más común, debido a la presencia de un cromosoma 21 extra, descrito inicialmente por John Langdon Down en 1866 (Antonarakis, 2017). Alrededor de 90 años después, en 1959, se describió como una anomalía genómica, secuenciando posteriormente el brazo largo del cromosoma 21 (HSA21) en el año 2000, resaltando su importancia en el SD (Antonarakis, 2017; Hamburg y col., 2019). El SD puede presentarse por distintos mecanismos, comúnmente la anomalía cromosomal se encuentra en todas las células; sin embargo, en algunos casos puede presentarse solo en algunas, por el mecanismo de mosaicismo. Incluso, puede presentarse triplicada solo parte del cromosoma 21, por el mecanismo de translocación (Hamburg y col., 2019).

Actualmente existe un progreso considerable al entender los genes codificantes de proteínas presentes en HSA21, convirtiendo en un área de interés el estudio del impacto fenotípico que tienen los genes en HSA21 sobre el alzheimer temprano (Antonarakis, 2016). La relación entre el alzheimer y el SD, se ha propuesto desde alrededor de cuatro décadas después de la primera descripción de alzheimer, cuando algunos investigadores reportaron casos que sugerían que los adultos con SD mostraban la neuropatología característica que se presenta a nivel cerebral en la enfermedad de Alzheimer (Zigman y col., 2007).

#### **4.1.1. Mecanismo genético**

Se han explicado diversos mecanismos moleculares que causan o modifican el riesgo para los fenotipos que se presentan en el SD (Patterson, 2009). En la mayoría de los casos (95%) la etiología del SD se correlaciona principalmente a una no disyunción del cromosoma 21 durante la meiosis materna, lo que se da durante la separación de pares de cromátidas homólogas (Patterson, 2009). También en una pequeña proporción se debe al material genético extra de solo una parte del brazo largo del cromosoma 21, es decir, está asociado a translocaciones (3%), otra pequeña proporción es debido a un mosaicismo de este (2%), en donde solo algunas de las células se encuentran afectadas por la trisomía, el cual se genera por herencia o por alteraciones estructurales directas del cigoto (Montoya, 2011; Patterson, 2009).

##### *4.1.1.1. Trisomía regular*

La trisomía regular es el mecanismo genético más común, para este síndrome. La mayor parte de los casos de esta trisomía (95%) se presentan debido a una alteración ocurrida durante la primera división meiótica, a lo que se le llama “trisomía regular” o completa (H. Basile, 2008). Ocurre cuando en uno de los padres se presenta una disyunción incompleta de la meiosis, resultando dos células anormales, una célula de 24 y otra de 22 cromosomas, y no 23 de manera normal (H. Basile, 2008). Por lo tanto, cuando la célula de 24 cromosomas es fecundada por una célula haploide, el individuo resultante tendría 47 cromosomas, es decir, una trisomía 21, pero si la célula de 22 cromosomas es fecundada resultaría en un individuo de, es decir una monosomía (H. Basile, 2008). Cada progenitor transmite un cromosoma de cada par posterior a separar los pares de cromosomas. Pero al no haber una disyunción

correcta, se heredan ambos cromosomas del par original, los que sumados al único cromosoma que da el otro progenitor resultan 3 (Perez Chavez, 2014). La nomenclatura científica de la trisomía 21 es 47, XX, +21 para mujeres y 47, XY, +21 para hombres (Basile, 2008; Perez, 2014).

En la meiosis I (MI) ocurren la mayor cantidad de defectos por no disyunción, mientras que en la meiosis II (MII) ocurren alrededor del 20% de estos. De igual manera, existe una menor prevalencia de trisomía derivadas del padre ocurriendo en la MII y MII un 3 y 5% respectivamente (Perez Chavez, 2014).

La mayor parte de las trisomías 21 provienen de una no disyunción de la MI materna, asociándose a datos que han relacionado una incidencia mayor de SD con una edad materna avanzada, incluso cuando el SD se presenta debido a mecanismo genéticos distintos, y la influencia de factores ambientales y envejecimiento celular (Patterson, 2009; Perez, 2014).

#### *4.1.1.2. Translocación*

El segundo mecanismo genético más común que da paso al SD es la translocación, con una frecuencia del 3% de los casos (H. Basile, 2008). Este mecanismo presenta a gran parte de los cromosomas afectados con una rotura en su estructura, resultando un cromosoma completo o fragmento libre adherido a otro cromosoma, frecuentemente a un cromosoma 14, resultando en un recuento genético aparentemente de 46 cromosomas, sin mostrar la carga genética extra (Figura 1) (H. S. Basile, 2008; Perez Chavez, 2014).

Debido a esto es análisis genético de los progenitores toma importancia, con el objetivo de conocer si existe un portador de la translocación o la translocación ocurrió posterior a la fecundación, hasta el individuo con SD (H. Basile, 2008). Por ejemplo, se podría presentar en uno de los padres, un recuento de 45 cromosomas, donde uno de ellos estará afectado con una translocación al momento de heredar la información genética (H. Basile, 2008). En esta variante no ocurre un problema en la disyunción, sino que un cromosoma tiene un fragmento extra con los genes del cromosoma translocado. Aun se trata de una trisomía, ya que la información genética extra de ese cromosoma se sigue presentando (Basile, 2008; Pérez Chávez, 2014).

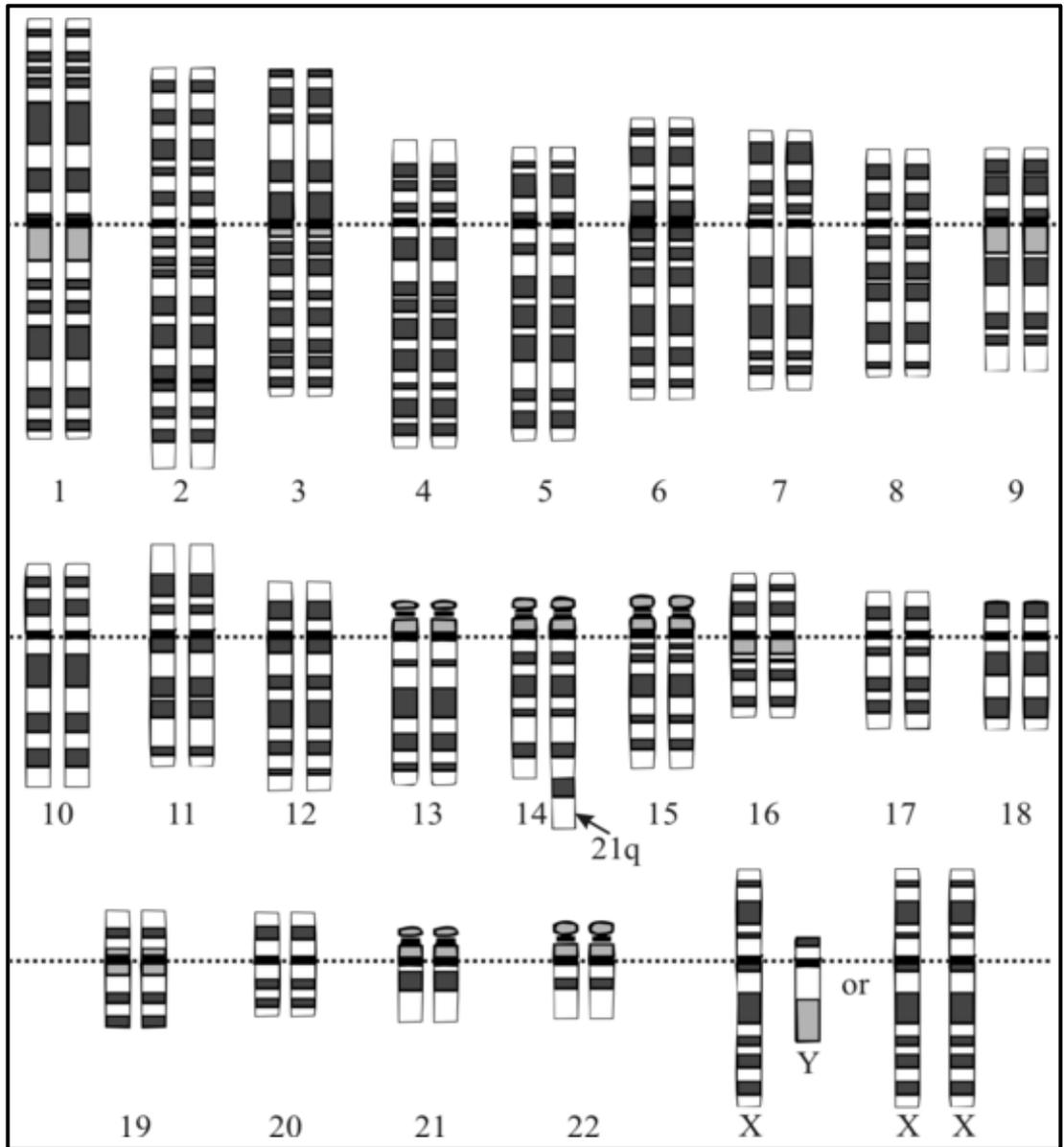


Figura 1. Translocación de cromosoma 21 en cromosoma 14.

#### *4.1.1.3. Mosaicismo*

El mecanismo menor frecuente de este síndrome es el mosaicismo, con una prevalencia del 2% de los casos, su menor frecuencia se debe a que el error genético se presenta después de la concepción ya que resulta de una no disyunción en la mitosis de la célula embrionaria durante las primeras divisiones celulares, por lo tanto la presencia de la mutación no se encuentra en todas las células, si no en la línea celular derivada de la primera célula con la trisomía, resultando en un mosaicismo, es decir que se presentan dos tipos de poblaciones distintas en los cromosomas (H. Basile, 2008). Un porcentaje de células presentaría la alteración genética mientras que el otro porcentaje tendría la cantidad de cromosomas adecuado (H. Basile, 2008). En los individuos con mosaicismo, se pueden observar células mutadas y células normales, el porcentaje de células afectadas dependerá del momento en que haya ocurrido la mutación (H. Basile, 2008; Perez Chavez, 2014).

La carga genética extra aportada por la trisomía 21, sin importar el mecanismo genético causante, es el responsable de los fenotipos característicos del síndrome al igual que de los fenotipos variables, debido a la expresión genética que presentan estas alteraciones (H. S. Basile, 2008).

#### **4.1.2. Epidemiología**

El SD ha sido caracterizado como uno de los trastornos genéticos más comunes, con una incidencia a nivel mundial entre 1 de cada 1,000 y 1 de cada 1,100 recién nacidos (INSP, 2021). Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado el fallecimiento de 303,000 recién nacidos cada año a causa de anomalías

congénitas. Además, se ha relacionado la edad materna con el aumento en la probabilidad de la presencia de SD en el bebé (de Graaf y col., 2017; OMS, 2022).

En México, se ha estimado una incidencia de SD de 3.7 casos por cada 10,000 nacimientos, además del aumento del riesgo de la edad materna para que el síndrome se presente, con una edad  $\geq 35$  años, al observarse que el 42% de los casos se han encontrado en este grupo de edad materna (Sierra Romero y col., 2014). Sin embargo, se considera que es posible prevenir algunas anomalías congénitas con los cuidados prenatales adecuados (OMS, 2022).

#### **4.1.3. Región crítica del cromosoma 21**

El cromosoma 21 se considera el cromosoma más estudiado en humanos (Antonarakis, 2017). Años después de que se reportara a la trisomía 21 como la causante del SD, se secuenció el brazo largo del cromosoma 21 (Antonarakis, 2017). A este brazo largo del cromosoma 21 se le ha denominado HSA21 y en su terminal distal se encuentra la región crítica del síndrome de Down, es decir, la región triplicada del cromosoma que contiene los genes que podrían explicar las patologías que se relacionan con este síndrome (Antonarakis, 2017; Montoya, 2011).

La severidad de los fenotipos característicos del SD se ha atribuido a esta región, con un contenido estimado de 630 genes diferentes (Kazemi, 2016). Investigaciones sobre los genes de esta región crítica han ayudado a entender como la presencia excesiva de algunas proteínas puede afectar las características fenotípicas propias del síndrome, estableciendo una correlación genotipo-fenotipo (Kłosowska, 2017).

Se ha observado que HSA21 codifica gran variabilidad de RNAs no codificantes, que al estar sobreexpresados podrían influir en los diferentes fenotipos que se presentan en el SD, en los que también podría influir la fracción funcional que se encuentra en el cromosoma (Antonarakis, 2017). A su vez, algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), pueden afectar la expresión de genes al modificar una parte funcional importante de alguna proteínas alterando sus codones, o al presentarse en sitios de unión. Por lo que, los SNPs, contribuyen al fenotipo variable de la trisomía 21 (Antonarakis, 2017).

La característica más importante considerada en el SD es la discapacidad intelectual, además de afecciones relacionadas como defectos congénitos cardiacos, anomalías gastrointestinales, debilidad neuromuscular, características dismórficas de la cabeza, cuellos y vías respiratorias, discapacidad visual y audiovestibular, características faciales y físicas, desórdenes hematopoyéticos y aumento en la incidencia de otros desórdenes médicos al compararse con la población general y enfermedad de Alzheimer temprana (Kazemi, 2016).

#### **4.2. Patologías asociadas**

Además de la discapacidad intelectual y las enfermedades congénitas presentes en el SD, se pueden presentar otras patologías asociadas a alteraciones metabólicas que de igual manera tienen mayor prevalencia en esta población que en la población en general, tales como obesidad, diabetes, leucemia y demencia (Kłosowska, 2017). Las manifestaciones clínicas presentadas en el SD son causadas por el exceso de material genético con el que cuentan estos individuos al tener un cromosoma 21 parcial

o total extra (Kłosowska, 2017). La obesidad, además de las dislipidemias, contribuyen a un mayor riesgo de cardiopatías usualmente presentes en SD que tienen diferentes evoluciones y manifestaciones clínicas (de la Piedra y col., 2017). La aterosclerosis es el precursor en la fisiopatología para estos padecimientos. A su vez, la obesidad abdominal está considerada uno de los factores de riesgo para desarrollar síndrome metabólico donde comúnmente se observan dislipidemias (de la Piedra y col., 2017; Real de Asua y col., 2014).

La enfermedad de Alzheimer es un padecimiento que se relaciona comúnmente con SD, ya que en esta población se observan afecciones neuropatológicas, como lesiones neurofibrilares y placa neuríticas similares a las presentadas en la enfermedad de Alzheimer, que afecta a todos los individuos con SD que sobreviven a los 30 años o más (Mazurek, 2015). Las discapacidades intelectuales que suelen observarse en SD, con la edad progresan rápidamente a demencia a causa de células dañadas por estrés oxidativo y al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (H. S. Basile, 2008; Mazurek & Wyka, 2015).

La frecuencia de esta enfermedad y su aparición temprana en presencia de la condición podría deberse a que uno de los factores principales que influyen en el desarrollo de Alzheimer, es el gen APP, que codifica la proteína precursora  $\beta$ - amiloide incrementando la producción y acumulación de placas amiloides a nivel cerebral, y contribuyen al envejecimiento prematuro de esta enfermedad (Farriols Danés, 2012b). APP se localiza en el cromosoma 21 por lo que, el exceso de material genético extra que provoca la presencia del cromosoma extra podría relacionar al SD con el desarrollo de Alzheimer (Farriols Danes, 2012).

De este modo, aunque la esperanza de vida ha aumentado tanto los individuos con SD como la población general, la diferencia se debe al proceso de envejecimiento en la personas que presentan la condición suele iniciar en etapas más tempranas en comparación con la población en general. Proceso que afecta la capacidad que tiene el DNA de repararse, y a su vez aumenta la edad biológica y con ello la mortalidad temprana (Farriols Danés, 2012b). En personas con la trisomía 21 se estima un inicio del envejecimiento en aproximadamente los 40 años de edad, y con esto el desarrollo de enfermedades y el deterioro cognitivo y funcional (Farriols Danés, 2012a). Las distintas comorbilidades que podrían presentarse en las personas con SD de mayor edad limitan sus capacidades e incluso amenazan su vida (Saghazadeh y col., 2017).

#### **4.2.1. Dislipidemias y síndrome de Down**

La obesidad que comúnmente se presenta en la población con SD, junto a la insulinoresistencia, también considerada común en estas personas, se relacionan con perfiles lipídicos menos favorables, es decir más aterogénicos, observando niveles de triglicéridos altos y niveles de c-HDL bajos (Adelekan y col., 2012). Sin embargo, los estudios realizados en el perfil lipídico de niños con SD han producido resultados inconclusos, aunque en personas sin la condición genética, las dislipidemias se consideran un factor de riesgo principal para el desarrollo de aterosclerosis y, por ende un aumento del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Adelekan y col., 2012).

Anteriormente se ha reportado una baja incidencia de lesiones ateroscleróticas en individuos con SD aún al presentar alteraciones en el perfil lipídico, sugiriendo que tenían muy bajo riesgo de presentar eventos coronarios (de la Piedra y col., 2017).

Mientras que en la adultez, se ha estimado que tiene hasta cuatro veces más riesgo de cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular (de la Piedra y col., 2017). Lo que eleva la necesidad de brindar atención a la salud a largo plazo de estos pacientes (Buonuomo y col., 2016; de la Piedra y col., 2017).

Un estudio en niños con SD mostró a estos pacientes con colesterol LDL y triglicéridos más altos que sus hermanos sin la condición genética, además de HDL más bajo sin varianza por el índice de masa corporal (Kłosowska, 2017). Con el aumento en la esperanza de vida de esta población debido a la mejora en la atención médica de los últimos años, también se ha observado que la muerte por aterosclerosis en adultos con SD es cada vez más frecuente (Tenneti y col., 2017).

La incidencia de ateroma es superior en pacientes con SD al compararlos con la población general. Se ha sugerido, a partir de estudios epidemiológicos significativos, que pacientes con SD presentan un riesgo de mortalidad mayor debido a enfermedad isquémica cardíaca y cerebrovascular (Kłosowska, 2017). La enfermedad arterial coronaria es un factor de riesgo para Alzheimer y aunque su mecanismo no ha sido elucidado aun, los factores de riesgo en personas diagnosticadas en etapas tardías de la enfermedad incluyen edad avanzada, historia familiar, demencia y la presencia de uno o más alelos de apolipoproteína E  $\epsilon$ 4 (Kłosowska, 2017).

#### **4.3. Apolipoproteína E**

La APOE está involucrada en el transporte lipídico (Kok y col., 2009). Es una lipoproteína polimórfica y un transportador importante de colesterol en el cerebro (Kok y col., 2009). Esta lipoproteína polimórfica interviene en funciones celulares diversas

como la señalización neuronal, la neuroinflamación y el metabolismo de la glucosa (Williams y col., 2020). Dentro de los factores de riesgo que se han identificado principalmente para el desarrollo de Alzheimer esta la presencia del alelo  $\epsilon 4$  de la APOE (Williams y col., 2020). Su variación en dos sitios polimórficos diferentes codifica para tres alelos,  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ , los cuales determinan seis genotipos. APOE  $\epsilon 4$  se ha relacionado con un incremento del riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer, mientras que APOE  $\epsilon 2$  parece tener un efecto protector, al disminuir un 40% el riesgo de desarrollo de Alzheimer en personas homocigotas (Kok y col., 2009; Williams y col., 2020). La manera en que se manifiestan las isoformas de APOE en la enfermedad de Alzheimer son indicios de su acción en personas con SD, ya que la presencia del síndrome se vuelve un factor de riesgo para el deterioro cognitivo (Kok y col., 2009). Se ha observado específicamente que portadores de APOE  $\epsilon 4$  tienen un mayor deterioro cognitivo con el envejecimiento (Kok y col., 2009).

La APOE plasmática participa sobre las vías metabólicas sistémicas (Williams y col., 2020). Sin embargo, aunque la alteración que podría ejercer sobre el sistema nervioso central aun no está dilucidada, los estudios realizados sugieren su participación en distintas vías de señalización (Williams y col., 2020). Recientemente se han buscado terapias que modifiquen las funciones patológicas de APOE, asimismo que preserven o mejoren las funciones de APOE que generan beneficios (Williams y col., 2020). Se han evaluado los potenciales objetivos terapéuticos para el deterioro cognitivo de Alzheimer basados en APOE (Figura 2), reportando que APOE no solo afecta el metabolismo de los lípidos sino distintas funciones del sistema nervioso

central y la neurodegeneración del alzhéimer asociada a sus isoformas (Williams y col., 2020).



#### 4.4. miR-33

Recientemente se ha propuesto que una cantidad importante de microRNAs (miRNAs) regulan más de la mitad de los genes en humanos. Los miRNAs, a su vez, han sido relacionados con la regulación de procesos biológicos importantes en los últimos años, incluyendo el desarrollo y regulación de la progresión de enfermedades y la influencia del envejecimiento sobre ellas. Se sabe que tiene un rol importante en la regulación del metabolismo lipídico, especialmente lípidos circulantes, asociándose con alteraciones en la circulación de colesterol y triglicéridos, factores importantes para riesgo cardiovascular (Aryal y col., 2017).

La familia de miRNAs miR-33 consta del miR-33a y miR-33b, codificados por los intrones de los genes SREBF2 y SREBF1 respectivamente. miR-33 controla la biogénesis del c-HDL y la excreción de colesterol, al regular la expresión de ABCA1, isoforma A1 del transportador dependiente de ATP, identificada de manera reciente como uno de los principales reguladores del colesterol HDL de células a apolipoproteínas (Figura 3). A su vez, se ha observado la implicación de miR-33 en la regulación de la síntesis de ácidos biliares y su secreción (Aryal y col., 2017; Horie y col., 2010).

Las variantes miR-33a y miR-33b se dirigen al sustrato 2 del receptor de insulina y a algunas enzimas de oxidación de ácidos grasos, provocando una regulación positiva de dicho miRNAs y a su vez una disminución de colesterol HDL, una reducción en la señalización de insulina y en la  $\beta$ -oxidación celular. Debido al papel observado de miR-33 en el metabolismo del colesterol y los lípidos, diferentes estudios han evaluado su inhibición en modelos animales, observando elevación en las

concentraciones de c-HDL en plasma y por ende, protección contra aterosclerosis (Martino y col., 2015).

Además de su relación con aterosclerosis y niveles de HDL, se ha observado que miR-33 regula las funciones celulares asociadas a enfermedad cardiovascular como la progresión de aterosclerosis incluso de manera independiente a la regulación de HDL, por medio de la activación de macrófagos, biogénesis mitocondrial y autofagia. El mecanismo que vincula a este miRNA con aterosclerosis parece estar relacionado con la atenuación de células del músculo liso vascular y la expansión a la neoíntima, al dirigirse a la proteína morfogenética ósea 3, que participa en el desarrollo de tejido (Aryal y col., 2017).

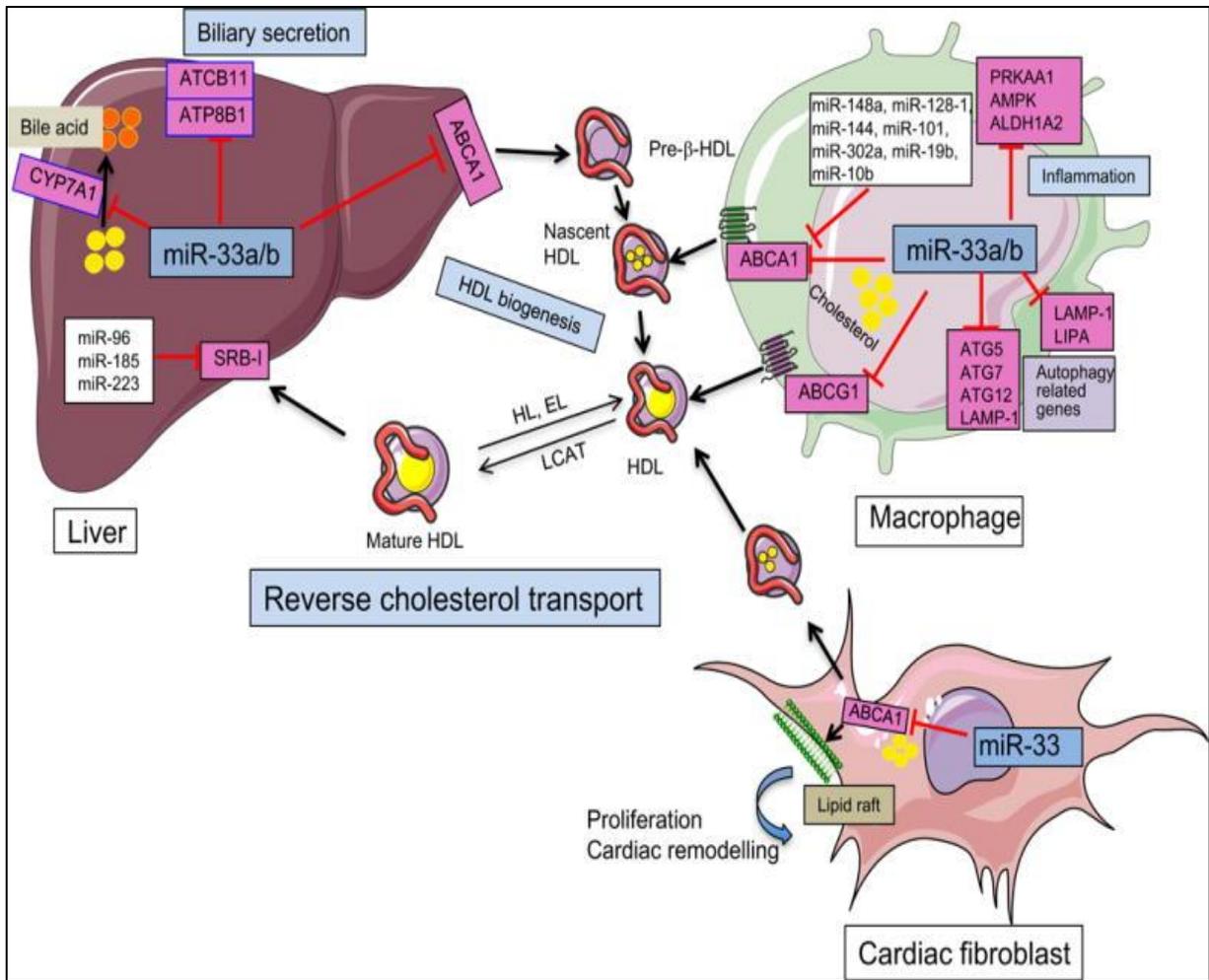


Figura 3. Regulación del microRNA del metabolismo de c-HDL.

#### **4.5. Antecedentes**

Actualmente, se estudian distintos dominios cognitivos en personas con SD, incluyendo lenguaje, memoria y coordinación motora, ya que estas características pueden variar entre individuos con la condición genética y de diferentes edades, especialmente avanzadas con desarrollo de demencia en distinto grado (Hamburg y col., 2019).

La relación entre c-HDL y la producción de placas beta amiloides en el Alzheimer depende del contenido de colesterol en las membranas celulares (Krzyszowska y col., 2022). Pocos estudios han analizado la relación entre el genotipo de APOE con enfermedades cerebrales relacionadas con la enfermedad de Alzheimer y que incluyan a personas más jóvenes o de mediana edad, como puede ser la población con SD. Por lo tanto, no existen datos epidemiológicos de la población que se basen en la relación de APOE y cambios cerebrales (Kok y col., 2009).

En los últimos años, muchas investigaciones han evidenciado la importante participación de miRNAs en la regulación del metabolismo lipídico y por lo tanto la enfermedad cardiovascular. En cuanto a tratamiento con miRNAs relacionados con miR-33 específicamente, como ablación genética, ha mostrado un incremento del colesterol HDL en plasma en modelos de ratones (Aryal y col., 2017). El c-HDL es capaz de suprimir la producción amiloide disminuyendo el colesterol celular al activar el transporte reverso de colesterol mediado por transportadores ABC (Krzyszowska y col., 2022).

Se realizó un estudio con animales con tratamiento de anti-miR-33, demostrando que la inhibición de este miRNA, incrementa la lipídación de APOE a nivel cerebral y

por lo tanto reducía los niveles de péptidos  $\beta$ -amiloides, inducido por ABCA1 (Horie y col., 2010).

El presente estudio considera importante establecer la interacción entre SD, presencia de isoformas de APOE y expresión de miR-33, junto al impacto que tenga sobre las concentraciones de lípidos circulantes como el colesterol total y c-HDL.

## V. JUSTIFICACIÓN

El SD es uno de los trastornos genéticos más comunes y cuenta con una amplia diversidad fenotípica. El aumento de la esperanza de vida de las personas con SD también ha incrementado la prevalencia de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, metabólicas y neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Esto hace necesario estudiar nuevas perspectivas alrededor de las patologías que no solían presentarse en esta población. Estudios recientes evidencian una alteración del perfil lipídico en SD independiente del estado nutricional de los individuos, representando un factor de riesgo cardiovascular. A pesar de que los mecanismos moleculares causantes de estos cambios aún no están dilucidados, moléculas como los miRNAs, al estar involucradas en múltiples procesos celulares relacionados al perfil lipídico y la homeostasis del colesterol, también podrían ser parte de dichos mecanismos. Esto sumado a la caracterización de variantes en el fondo genético, como APOE  $\epsilon$ 4, que también puedan contribuir al desarrollo de dislipidemias. La capacidad de los miRNAs de conservarse entre especies sugiere que tiene potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedad cardiovascular, con diferentes enfoques para analizar esta posibilidad. Por ello, es importante conocer estos miRNAs y su expresión en población predisponente como personas con SD ya que no existen reportes que establezcan si existe una interacción entre las concentraciones de miR-33, la variante APOE  $\epsilon$ 4 y los niveles de c-HDL, en la población con SD. El abordaje de esta pregunta de investigación permitirá determinar el posible uso de biomarcadores para dislipidemia y neurodegeneración enfocados a estrategias preventivas en esta población vulnerable.

## **VI. HIPÓTESIS**

Existe una mayor expresión de miR-33, un perfil lipídico adverso y mayor frecuencia del genotipo  $\epsilon 4$  de APOE, considerado de riesgo, en personas con síndrome de Down, respecto a un grupo control.

## **VII.OBJETIVOS**

### **7.1. Objetivo general**

Establecer la relación entre la expresión de miR-33, isoformas de APOE y concentración de c-HDL como factores de riesgo en síndrome de Down

### **7.2. Objetivos específicos**

7.2.1. Objetivo 1. Caracterizar a los grupos de estudio de acuerdo con las variables antropométricas, clínicas y bioquímicas

7.2.2. Objetivo 2. Determinar el patrón de expresión de los miRNAs miR-33a5p y miR33b3p en los diferentes grupos de estudio

7.2.3. Objetivo 3. Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes de APOE en los grupos de estudio

7.2.4. Objetivo 3. Establecer la correlación entre las alteraciones en el perfil lipídico existentes, expresión de miR-33a5p y miR-33b3p y las variantes de la APOE en la población de estudio, y la posible influencia de covariables

## **VIII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1. Diseño experimental**

#### **8.1.1. Tipo de estudio**

Se realizó un estudio de cohorte de tipo transversal, con alcance descriptivo y correlacional

#### **8.1.2. Población de estudio**

La población de estudio fueron personas con síndrome de Down cuyos tutores otorgaron con firma el consentimiento informado. Además, se conformó un grupo control de personas consideradas sanas y sin la condición genética. La captación de participantes se realizó en el Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDOCS) de Culiacán Rosales, y en Ahome, Sinaloa en colaboración con la Dirección de Salud Municipal. Para ello, se brindó una sesión de información inicial con los tutores y participantes para ofrecerles la oportunidad de enrolarse en el estudio e informarles de los objetivos y procedimientos, además de los posibles riesgos y beneficios, mismos que fueron plasmados en el consentimiento. A los individuos que decidieron aceptar se les tomó una muestra de sangre para realizar estudios bioquímicos. Se realizaron medidas de antropometría para su análisis y correlación. Adicionalmente, se les realizó una ficha de identificación con datos generales, no patológicos y patológicos mediante una historia clínica a los participantes y tutores. El presente estudio fue analizado y aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigación Aplicada a la Salud Pública de la Universidad Autónoma de Sinaloa, cumpliendo con los lineamientos establecidos.

### **8.1.3. Criterios de selección**

#### *8.1.3.1. Criterios de inclusión*

Se reclutaron personas con diagnóstico citogenético de síndrome de Down, de 3 a 18 años, de ambos sexos, que contaran con el consentimiento informado firmado por el padre o tutor para el grupo de síndrome de Down. Se incluyeron participantes con alteraciones de la glándula tiroides y cirugías. El grupo control se integró con personas sin síndrome de Down, entre 3 y 18 años, de ambos sexos, que contaran con el consentimiento informado firmado por el padre o tutor.

#### *8.1.3.2. Criterios de eliminación*

Se excluyeron a aquellos participantes con los que no fue posible obtener la firma en la carta de consentimiento informado, así como datos antropométricos o historia clínica incompletos, además de una muestra sanguínea inadecuada para el análisis bioquímico y molecular.

## **8.2. Metodología**

### **8.2.1. Evaluación antropométrica**

En cada participante se realizaron mediciones de peso corporal, estatura y circunferencia de cintura y cadera, sin zapatos, con ropa ligera, con una aproximación de 0.1 cm para la estatura y una aproximación de 0.1 kg para el peso. Las mediciones antropométricas se realizaron de acuerdo con los procedimientos estandarizados por la sociedad internacional para el avance de la cineantropometría (ISAK) (Marfell-Jones y col., 2006). Con base en el peso y la estatura se obtuvo el índice de masa corporal

(IMC), un indicador sensible y de gran utilidad para la evaluación antropométrica del estado nutricional. Se obtuvo mediante el cociente del peso (en kg) entre la estatura al cuadrado ( $m^2$ ). Posteriormente se clasificaron los valores obtenidos en bajo peso, peso saludable, sobrepeso y obesidad de acuerdo con las tablas de percentiles de IMC para la edad del Instituto Nacional de Pediatría para personas con el síndrome de Down en el grupo SD, considerando  $<5$  como bajo peso, de 5 a 90 como peso saludable, de 90 a 95 como sobrepeso y  $>95$  como obesidad (Flores Arizmendi y col., 2022). Para la clasificación de IMC del grupo control se utilizaron las tablas de percentiles de IMC para la edad de la CDC considerando  $<5$  como bajo peso, de 5 a 85 como peso saludable, de 85 a 95 como sobrepeso y  $>95$  como obesidad (CDC, 2000).

### **8.2.2. Muestra sanguínea**

Para las determinaciones bioquímicas, cuantificación de miRNAs y genotipificación, se colectaron muestras sanguíneas de sangre periférica a partir de punción venosa, en condiciones de 10-12 horas de ayuno, en tubos con EDTA y gel SST para su posterior centrifugado, a 3500rpm, durante 10 min. A partir del suero obtenido de los tubos de gel SST se realizó la cuantificación del perfil bioquímico de colesterol total (C.Total), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), colesterol de lipoproteínas de alta densidad (c-HDL). A partir del plasma obtenido del tubo con EDTA, se realizó la cuantificación de glucosa, utilizando reactivos marca HUMAN, respetando las instrucciones del fabricante, además de obtener plasma y paquete celular por medio de centrifugado para almacenar a  $-80^{\circ}C$  hasta proceder al análisis molecular de miRNAs y la genotipificación de apolipoproteína E.

### **8.2.3. Evaluación bioquímica**

El colesterol total se determinó después de la hidrólisis enzimática y la oxidación. El c-HDL se cuantificó por medio de una prueba con dos pasos específicos, en el primero se eliminaron y destruyeron los quilomicrones, y el colesterol VLDL y LDL por reacción enzimática, y en el segundo paso se determinó el colesterol restante de la fracción HDL a través de reacciones enzimáticas establecidas. Los triglicéridos se determinaron después de la hidrólisis enzimática con lipasas utilizando los estándares proporcionados por el kit y quinoneimina como indicador para todos los parámetros (Grundy, 2001).

Cada determinación se hizo por duplicado de manera ciega para el técnico de laboratorio. Los resultados de las pruebas bioquímicas se clasificaron de acuerdo con los puntos de corte establecidos por el Programa Nacional de Educación en Colesterol (NCEP, por sus siglas en inglés) para la obtención de indicadores de riesgo cardiometabólico como dislipidemias, en la concentración de glucosa en ayunas, circunferencia de cintura e índice cintura-cadera (NCEP, 2001). Dichos puntos de corte se utilizaron debido a que actualmente no existen valores específicos para SD.

### **8.2.4. Cuantificación de miRNAs**

#### *8.2.4.1. Purificación de miRNAs totales*

La cuantificación de miR-33 se realizó a partir del plasma purificando miRNAs totales mediante extracción fenólica utilizando TRIZOL (Reagent Invitrogen Life Technologies) a partir de 200 µl de plasma de cada participante. Este método se basa en extracción y precipitación del RNA total, con cloroformo y etanol respectivamente a

partir de la fase acuosa. Finalmente se diluyó en 8 µl de agua libre de RNAsa para su almacenamiento a -80°C hasta su uso.

#### 8.2.4.2. Retro-transcripción (RT), síntesis de c-DNA

La síntesis de cDNA universal se realizó utilizando el kit miRCURY™ y LNA™ miR RT (QIAGEN Cat. No. 339340) en un volumen de 10 µl, a partir de 7 µl de cada RNA purificado en cada reacción, siguiendo las condiciones establecidas (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Condiciones para la retro-transcripción y síntesis de cDNA**

Condiciones para RT		
Pasos	Tiempo	Temperatura
Transcripción inversa	60 min	45°C
Inactivación de la reacción	5 min	95°C
Almacenamiento	∞	4°C

#### 8.2.4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa tiempo real (qPCR)

A partir de la obtención de cDNA se cuantificó miR-33a-5p y miR-33b-3p mediante qPCR, utilizando el sistema miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN, Hiden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando oligonucleótidos sentido específicos para cada sentido de miR-33. Finalmente, la reacción de PCR se realizó en un volumen de 7 µl, con el RNA pequeño nucleolar 48

(SNORD48) como control constitutivo, en el termociclador tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems) siguiendo las condiciones establecidas (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Condiciones para reacción en cadena de polimerasa tiempo real**

Condiciones para qPCR					
Etapa 1	Etapa 2 x 40 ciclos		Melt curve stage +0.3°C		
95°C	95°C	56°C	95°C	60°C	95°C
2 min	10 seg	1 min	15 seg	1 min	15 seg

La cuantificación relativa se realizó mediante el método Pfaffl (Chini y col., 2007). Para obtener las eficiencias se utilizó el software LinRegPCR (Seveno y col., 2009).

## 8.2.5. Genotipificación de APOE

### 8.2.5.1. Extracción de DNA

Para la genotipificación de las isoformas de APOE, se extrajo DNA genómico a partir de leucocitos sanguíneos obtenidos por gradiente de densidad mediante el sistema DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, catálogo 69504) (QIAGEN, Hilden, Germany) acorde a las instrucciones del fabricante. La integridad del DNA se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

### 8.2.5.2. Discriminación alélica mediante sondas Taqman

Al obtener el DNA genómico se realizó la discriminación alélica por medio de una PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan®. La qPCR se realizó en el termociclador tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems). La mezcla de reacción fue realizada para cada muestra por duplicado, incluyendo controles negativos de acuerdo con los procedimientos establecidos.

Los oligonucleótidos utilizados en la discriminación alélica fueron específicos para la identificación de los alelos para las variantes del gen de acuerdo con el manual de uso MAN0009593 de ThermoFisher Scientific. Las variantes polimórficas evaluadas para el gen de APOE se muestran en el cuadro 3.

**Cuadro 3. Variantes polimórficas evaluadas para el gen de APOE**

Gen	SNP	Cambio	Locus
APOE	rs7412	C>T	chr19:45411979
APOE	rs429358	T>C	chr19:44908684

Las reacciones de amplificación fueron preparadas en un volumen total de 5 µL para cada muestra de DNA genómico, como se observa en el cuadro 4. Las sondas de las variantes polimórficas utilizadas en la discriminación alélica del gen de APOE se muestran en el cuadro 5.

**Cuadro 4. Reacción para ensayos de discriminación alélica por qPCR**

Reactivo	Volumen por muestra
Sonda TaqMan	2.5 µL
APOE	0.1 µL
DNA Genómico (concentración variable)	2.4 µL

**Cuadro 5. Secuencias de nucleotídicas para la discriminación alélica por qPCR para APOE**

SNP	Secuencia [VIC/FAM]
rs7412	CCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAG[C/T]GCCTGGCAGTGTAC CAGGCCGGGGC
rs429358	GCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG[C/T]GCGGCCGCCTGGT GCAGTACCGCGG

Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación por PCR siguiendo las condiciones mostradas en el cuadro 6. Finalmente, se realizó una post-lectura a 60 °C por 30 s, para obtener la fluorescencia final de cada muestra mediante el software StepOnePlus versión 2.3 (Applied Biosystems). Los datos obtenidos permitieron realizar una discriminación alélica por medio del programa Taqman Genotyper Software (Applied Biosystems).

## Cuadro 6. Condiciones de amplificación para qPCR

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la polimerasa	95 °C	10 minutos	HOLD
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	40
Alineación / extensión	60 °C	1 minuto	

### 8.2.6. Análisis estadístico

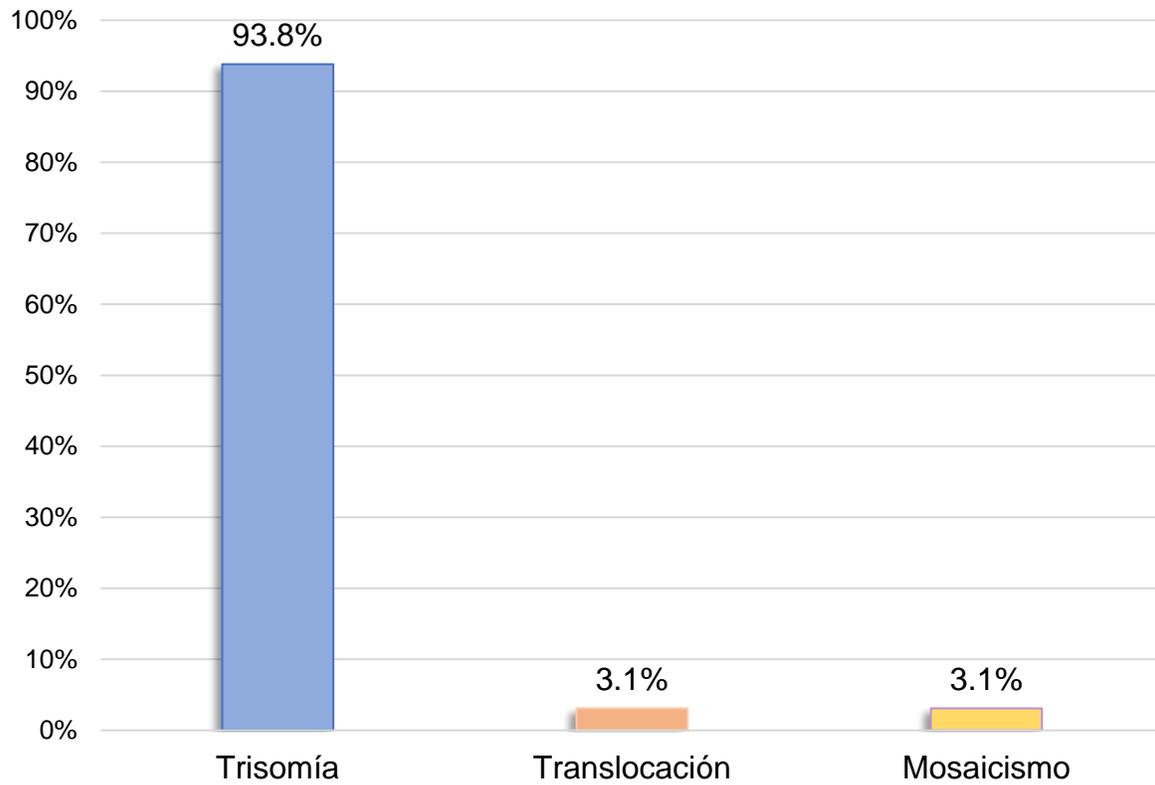
Previo al análisis estadístico se comprobó que los datos obtenidos tuvieran una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y fueron expresados como el valor de la media  $\pm$  desviación estándar para el dato descriptivo o el error estándar para el análisis inferencial. Para las variables cualitativas se calcularon frecuencias y porcentajes; mientras que para las variables cuantitativas se estimaron medidas de tendencia central y dispersión, para las diferencias de frecuencias se utilizó  $X^2$  mientras que las medianas fueron analizadas por prueba de Mann-whitney. Posteriormente, se determinaron correlaciones utilizando la prueba Spearman. Finalmente, se estimó el riesgo relativo de indicadores bioquímicos tomando en cuenta un intervalo de confianza del 95%. Todos los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 8, considerando una significancia estadística con un valor de  $P < 0.05$ .

## IX. RESULTADOS

### 9.1. Población de estudio

Con el objetivo de determinar el patrón de expresión de miR-33 asociado al metabolismo del colesterol y las isoformas de la apolipoproteína E, se realizó un muestreo de 91 personas con síndrome de Down entre 9 meses y 64 años, de ambos sexos, de los cuales se incluyeron en el análisis a 50 personas con síndrome de Down entre 3 y 18 años (Grupo SD) y 50 controles de las mismas edades y sexo (Grupo CT). Se excluyeron a aquellos pacientes que no cumplían con el rango de edad seleccionado, además de los que no fue posible obtener la autorización o firma en la carta de consentimiento informado, y a los que tenían datos antropométricos incompletos o una muestra sanguínea no adecuada para su análisis bioquímico y molecular.

A los participantes del grupo SD se le realizó el cariotipo correspondiente para el diagnóstico citogenético del síndrome de Down en colaboración con una citogenetista. En los resultados se observó la frecuencia con la que se presentó cada mecanismo genético, encontrando un 93.8% de trisomía regular o libre, 3.1% de translocación y 3.1% de mosaicismo (Figura 4).



**Figura 4. Incidencia del mecanismo genético del síndrome de Down en la población de estudio.**

### 9.1. Características antropométricas de la población

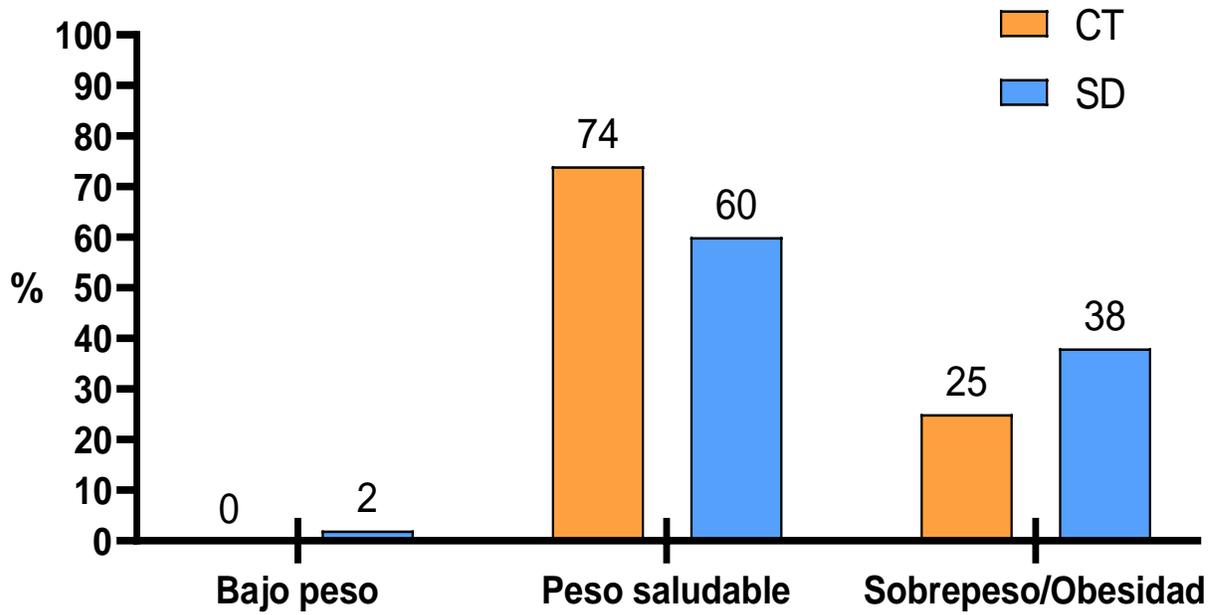
Las características antropométricas de la población mostraron una media de peso corporal menor en las personas con síndrome de Down ( $34.4 \pm 15.6$  Kg) que en el grupo control ( $41.9 \pm 21.9$  Kg) . La media de estatura del grupo con síndrome de Down ( $125.1 \pm 17.7$  cm) fue menor significativamente en comparación con la del grupo control ( $141.0 \pm 20.1$  cm) (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Características antropométricas de los grupos de estudio**

<b>Variable</b>	<b>Grupo CT Media±D.E.</b>	<b>Grupo SD Media±D.E.</b>	<b>P</b>
<b>Peso (kg)</b>	41.9±21.9	34.4±15.6	0.0551
<b>Estatura (cm)</b>	141.0±20.1	125.1±17.7	<b>0.0001</b>
<b>Circunferencia de cintura (cm)</b>	65.8±13.9	65.0±15.3	0.9837
<b>Circunferencia de cadera (cm)</b>	77.0±17.1	75.4±14.5	0.0656

Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.). CT: Control, SD: Síndrome de Down.  $P < 0.05$  se consideró significativo.

Para determinar la presencia o ausencia de sobrepeso u obesidad del grupo SD se clasificó el IMC de la población utilizando los percentiles de IMC para la edad para personas con SD del Instituto Nacional de Pediatría, y los percentiles de IMC para la edad de la CDC. Hubo mayor cantidad de participantes del grupo CT clasificados con peso saludable y mayor cantidad de participantes del grupo SD clasificados como sobrepeso/obesidad. Las frecuencias de clasificación de peso entre los grupos tuvieron diferencias significativas ( $P=0.0464$ ) (Figura 5).



**Figura 5. Categorización de percentiles de IMC/Edad.**

Porcentaje de frecuencia de clasificación de peso según el IMC/Edad. CT: Grupo control, SD: Grupo síndrome de Down.

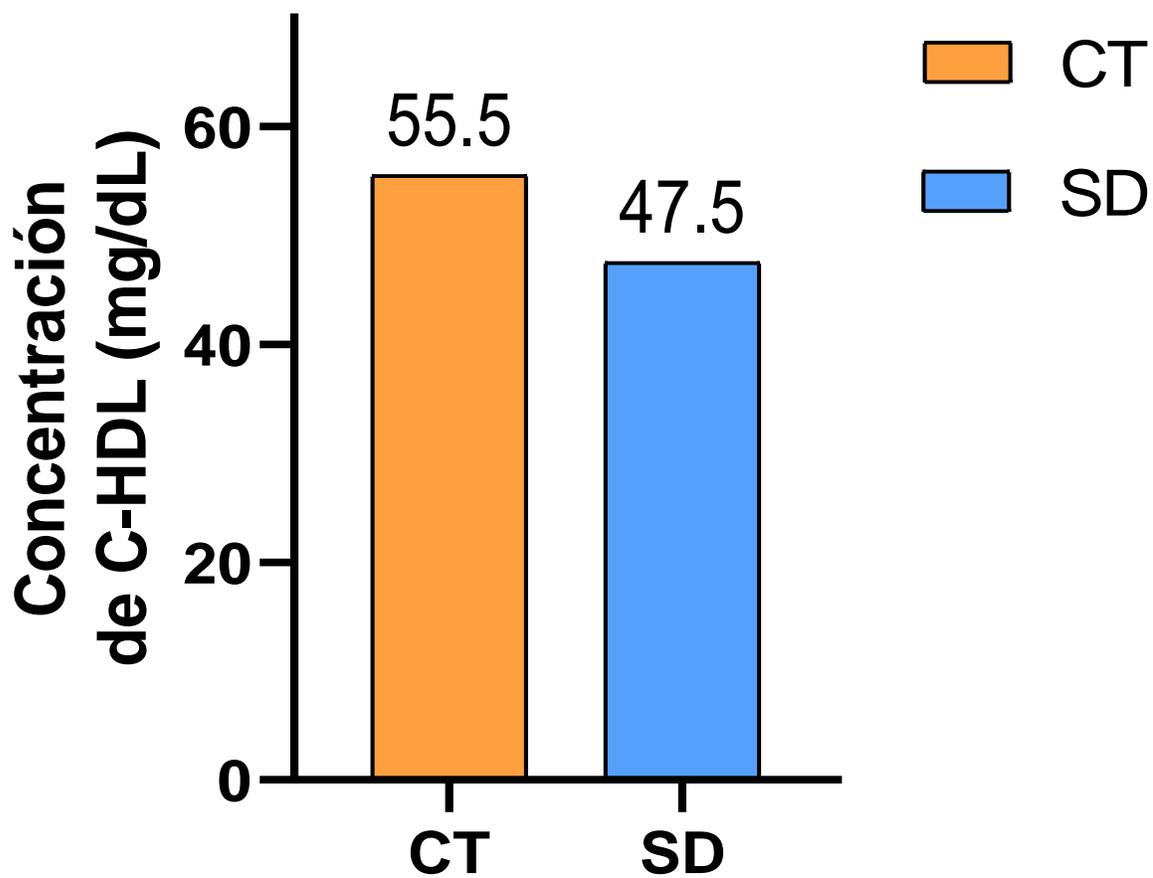
## 9.2. Análisis bioquímicos de los grupos de estudio

Los datos bioquímicos obtenidos se analizaron por grupo de estudio, obteniendo una media de c-HDL menor en el grupo SD ( $47.5 \pm 13.2$  mg/dL) en comparación con el grupo CT ( $55.5 \pm 13.7$  mg/dL), mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ). La concentración de triglicéridos también mostró diferencias significativas entre los grupos con mayor concentración en el grupo SD ( $97.4 \pm 38.05$  mg/dL) contra el grupo CT ( $75.9 \pm 36.0$  mg/dL). Mientras que el colesterol, no mostró diferencias significativas entre los grupos (Cuadro 8)

**Cuadro 8. Concentraciones bioquímicas en los grupos de estudio**

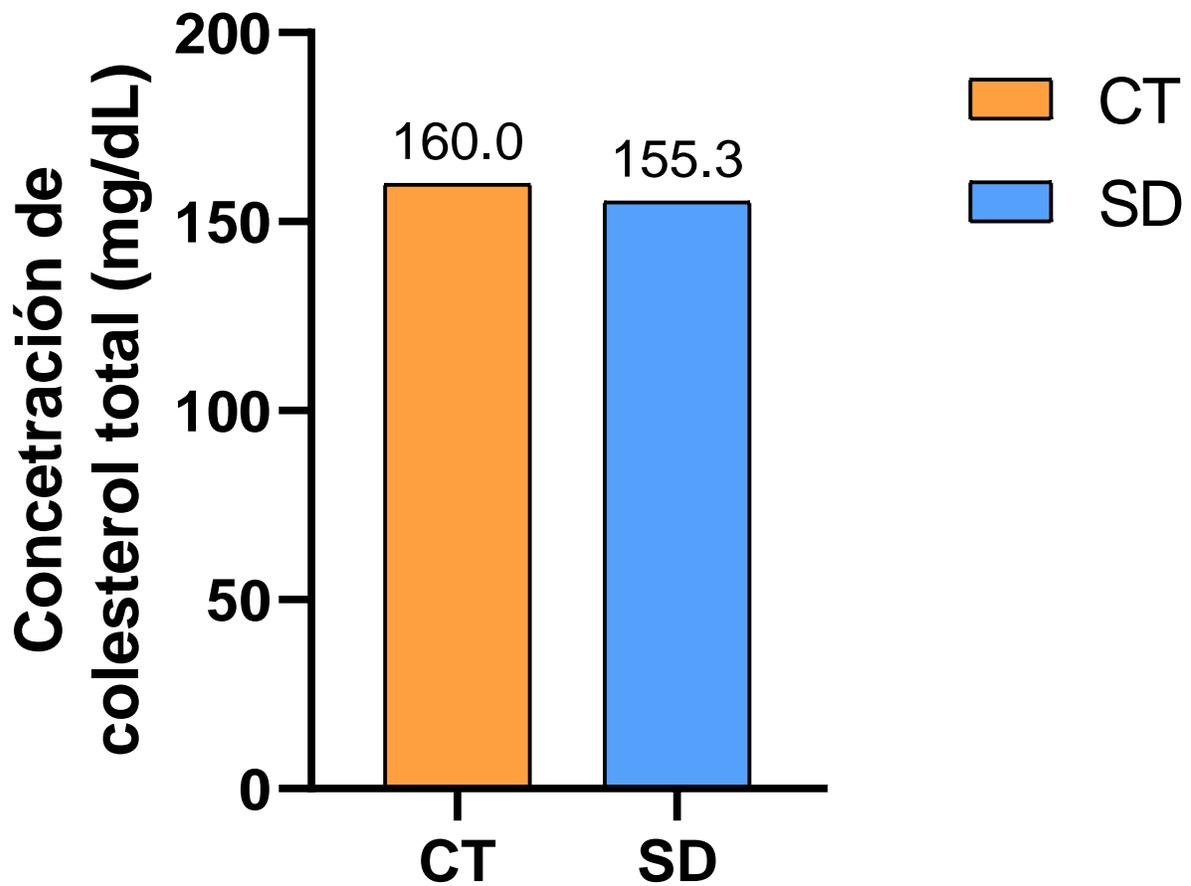
<b>Variable</b>	<b>Grupo CT</b> Media $\pm$ D.E	<b>Grupo SD</b> Media $\pm$ D.E	<b>P</b>
<b>Colesterol total</b> (mg/dL)	160.0 $\pm$ 32.4	155.3 $\pm$ 31.3	0.5097
<b>Triglicéridos</b> (mg/dL)	75.9 $\pm$ 36.0	97.4 $\pm$ 38.05	<b>0.0020</b>
<b>c-HDL</b> (mg/dL)	55.5 $\pm$ 13.7	47.5 $\pm$ 13.2	<b>0.0039</b>
<b>c-LDL</b> (mg/dL)	89.2 $\pm$ 21.5	88.1 $\pm$ 29.1	0.8447
<b>c-VLDL</b> (mg/dL)	14.6 $\pm$ 6.3	19.9 $\pm$ 8.5	<b>0.0002</b>
<b>Glucosa</b> (mg/dL)	92.1 $\pm$ 14.8	92.7 $\pm$ 7.6	0.8021
<b>HbA1c</b> (mg/dL)	5.1 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.4	0.6458

Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar (D.E.). CT: Control, SD: Síndrome de Down, C-HDL: Colesterol HDL, c-LDL: Colesterol LDL, HbA1c: Hemoglobina glicada.  $P < 0.05$  se consideró significativo.



**Figura 6. Media de concentración de c-HDL en los grupos de estudio.**

CT: Control, SD: Síndrome de Down. C-HDL: Colesterol HDL. Se observó una tendencia de menor concentración de c-HDL en el grupo SD que en el grupo CT.



**Figura 7. Media de concentración de colesterol total en los grupos de estudio.**

CT: Control, SD: Síndrome de Down. Se observaron concentraciones de colesterol total similares en ambos grupos de estudio.

### 9.3. Niveles de expresión de los microRNAs de estudio

Se seleccionaron miR-33 a y b en sentidos 5'-3' y 3'-5', es decir miR-33a3p, miR-33a5p, miR-33b3p y miR-33b5p, para estudiar su posible relación con la apolipoproteína E y el metabolismo del colesterol. Para ello, se realizaron pruebas de amplificación con distintas concentraciones de oligonucleótidos, además de ciclos y condiciones de desnaturalización y amplificación en el termociclador. miR-33a5p y miR-33b3p tuvieron mejor amplificación, por lo que se seleccionaron para evaluarlos en la población de estudio y fueron cuantificados por qRT-PCR. Posteriormente los valores fueron analizados mediante el método Pfaffl.

Se realizó una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, observando que los datos son no paramétricos. Por lo tanto, se realizó una T-Student con medianas encontrado niveles de expresión de miR-33a del grupo SD de 0.044, siendo menor a la expresión del grupo CT de 1.077, esto con una diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) (Figura 8). Asimismo, se realizó sobre los datos de expresión una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, observando que los datos son no paramétricos. Por lo tanto, se realizó una T-Student con medianas encontrado una tasa de cambio menor en el grupo SD de 0.145, en comparación con el grupo CT de 1.322, con diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) (Figura 9).

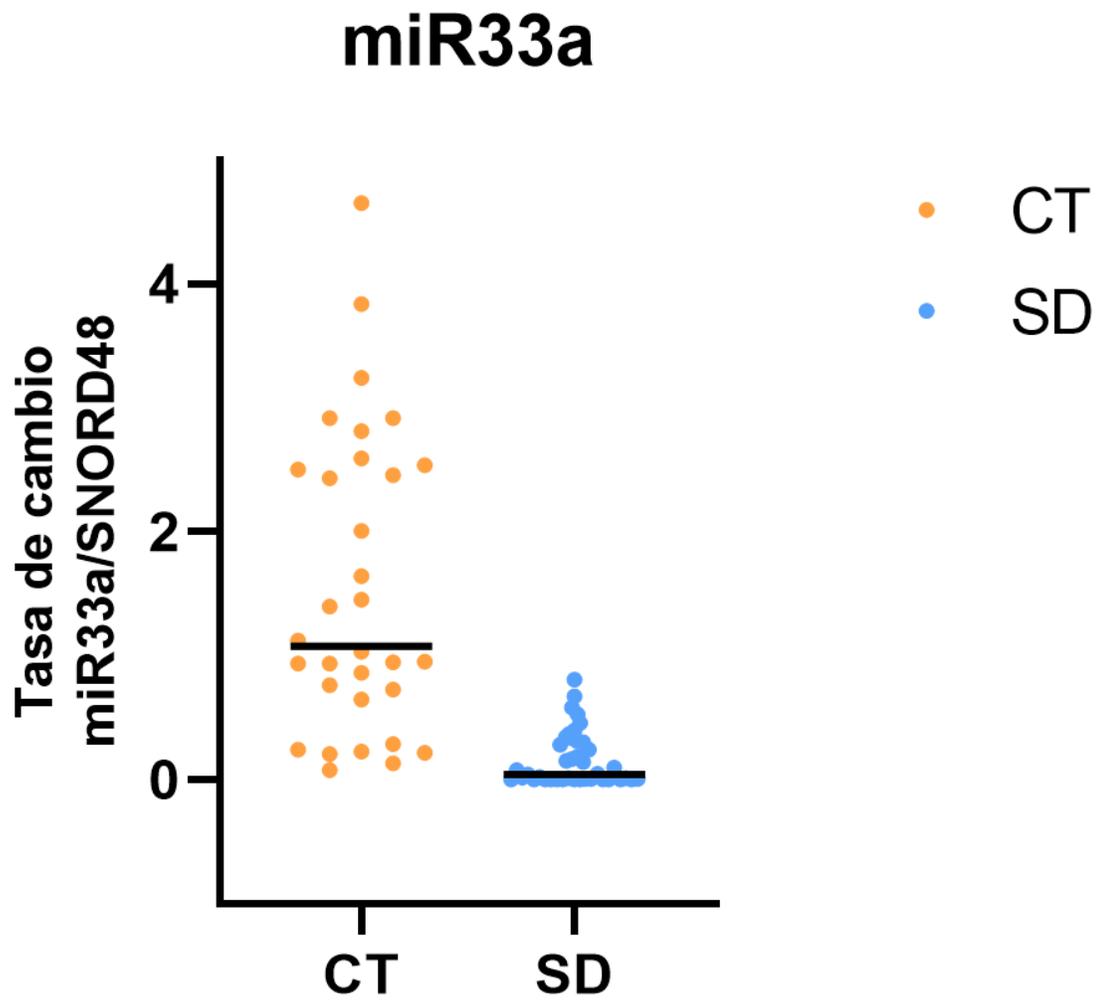


Figura 8. Niveles de expresión de miR-33a en los grupos de estudio

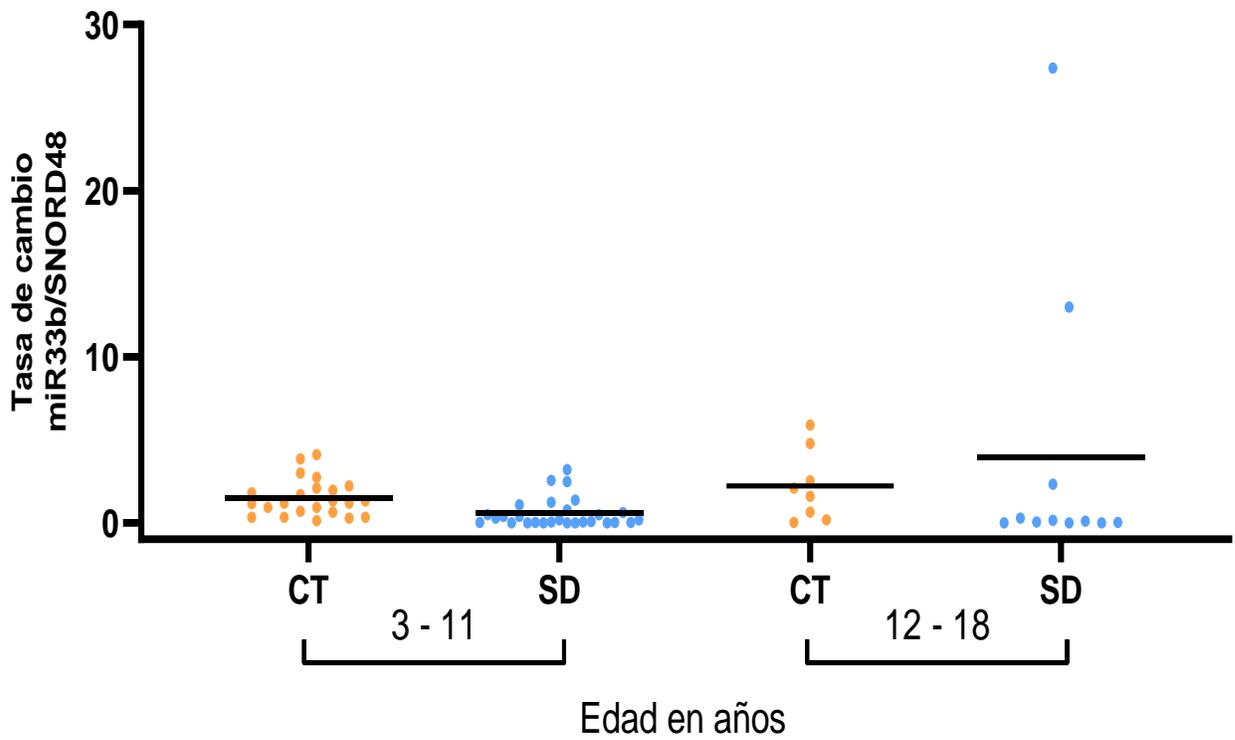
CT: Control, SD: Síndrome de Down.



Se evaluó la expresión de miRNAs por grupos etarios de infancia y adolescencia, dividiendo a la población en subgrupos de 3 a 11 años y de 12 a 18 años. Los niveles de expresión de miR33a mostraron menor expresión en el grupo SD en ambos subgrupos etarios, con una media de expresión de 1.560 para el grupo CT de 3 a 11 años y una media de expresión para el grupo SD de 0.207, al igual que mayor expresión del grupo etario de 12 a 18 años, con una media de expresión de 1.527 del grupo CT y 0.134 para el grupo SD, con una significancia estadísticamente de  $P < 0.0001$  (Figura 10).

Los niveles de expresión de miR33b se mostraron menores en el grupo SD en ambos subgrupos etarios, con una media de 1.560 para el grupo CT de 3 a 11 años contra 0.207 para el grupo SD, al igual que mayor expresión del grupo etario de 12 a 18 años, con una media de 1.527 del grupo CT contra 0.134 para el grupo SD, con una significancia estadística de  $P < 0.0001$  (Figura 11).





**Figura 11. Niveles de expresión de miR-33b por grupos de edad en los grupos de estudio.**

CT: Control, SD: Síndrome de Down.

Posteriormente, se realizó una correlación de los miRNAs con distintas variables entre los grupos de estudio. En estas correlaciones de miR33a no se observaron asociaciones significativas entre su expresión y las variables de interés (Cuadro 9).

La expresión de miR33b mostró una correlación inversa y estadísticamente significativa con la concentración de triglicéridos y de C-VLDL del grupo SD con una r de -0.348 y -0.367 (P=0.019 y P=0.013), respectivamente (Cuadro 10).

**Cuadro 9. Correlación de miR33a con variables de interés**

<b>miR33a</b>	<b>CT</b>	<b>SD</b>
Edad	0.074 (P=0.694)	0.014 (P=0.923)
Estatura (cm)	0.199 (P=0.309)	-0.075 (P=0.609)
Peso corporal (Kg)	0.216 (P=0.258)	-0.011 (P=0.938)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0.061 (P=0.756)	0.119 (P=0.418)
Grasa corporal (%)	0.014 (P=0.941)	0.151 (P=0.432)
C.Cintura	0.040 (P=0.836)	0.076 (P=0.609)
C.Cadera	0.047 (P=0.807)	0.025 (P=0.863)
ICC	-0.157 (P=0.413)	0.048 (P=0.746)
HbA1c (%)	-0.185 (P=0.327)	0.003 (P=0.981)
Glucosa (mg/dL)	-0.084 (P=0.657)	-0.062 (P=0.672)
Colesterol total (mg/dL)	0.006 (P=0.971)	-0.088 (P=0.547)
Triglicéridos (mg/dL)	-0.024 (P=0.897)	-0.199 (P=0.174)
C - HDL (mg/dL)	-0.094 (P=0.617)	0.001 (P=0.995)
C - VLDL (mg/dL)	0.018 (P=0.920)	-0.196 (P=0.179)
C - LDL (mg/dL)	0.126 (P=0.506)	0.001 (P=0.995)

Los valores representan el valor de r (valor de P). P <0.05 se consideró significativo. CT: Control, SD: Síndrome de Down, IMC: Índice de Masa Corporal, C.Cintura: Circunferencia de cintura, C.Cadera: Circunferencia de cadera, ICC: Índice Cintura Cadera, HbA1c: Hemoglobina glicada, C-HDL: Colesterol HDL, C-VLDL: Colesterol VLDL, C-LDL: Colesterol LDL.

**Cuadro 10. Correlación de miR33b con variables de interés**

<b>miR33b</b>	<b>CT</b>	<b>SD</b>
Edad	-0.001 (P=0.993)	0.009 (P=0.951)
Estatura (cm)	0.129 (P=0.510)	-0.019 (P=0.896)
Peso corporal (Kg)	0.252 (P=0.186)	-0.094 (P=0.535)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0.174 (P=0.373)	-0.159 (P=0.295)
Grasa corporal (%)	0.028 (P=0.883)	0.041 (P=0.839)
C.Cintura	0.172 (P=0.372)	-0.133 (P=0.386)
C.Cadera	0.119 (P=0.535)	-0.074 (P=0.630)
ICC	0.053 (P=0.784)	-0.102 (P=0.505)
HbA1c (%)	0.167 (P=0.368)	-0.081 (P=0.596)
Glucosa (mg/dL)	0.151 (P=0.424)	-0.045 (P=0.764)
Colesterol total (mg/dL)	0.061 (P=0.746)	-0.197 (P=0.192)
Triglicéridos (mg/dL)	0.038 (P=0.841)	<b>-0.348</b> <b>(P=0.019)</b>
C - HDL (mg/dL)	-0.005 (P=0.976)	0.062 (P=0.683)
C - VLDL (mg/dL)	0.006 (P=0.971)	<b>-0.367</b> <b>(P=0.013)</b>
C - LDL (mg/dL)	0.121 (P=0.521)	-0.206 (P=0.174)

Los valores representan el valor de r (valor de P). P <0.05 se consideró significativo. CT: Control, SD: Síndrome de Down, IMC: Índice de Masa Corporal, C.Cintura: Circunferencia de cintura, C.Cadera: Circunferencia de cadera, ICC: Índice Cintura Cadera, HbA1c: Hemoglobina glicada, C-HDL: Colesterol HDL, C-VLDL: Colesterol VLDL, C-LDL: Colesterol LDL.

#### **9.4. Genotipificación de apolipoproteína E**

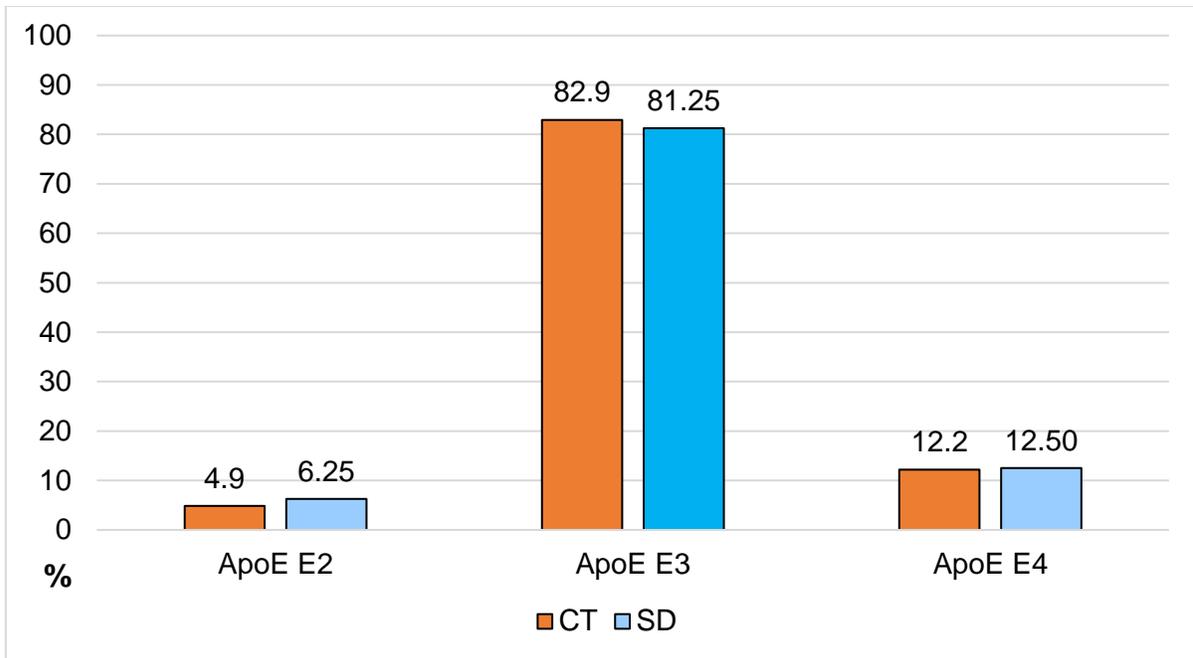
Posterior a la extracción de DNA del total de las muestras, se realizó la genotipificación de los grupos de estudio. Las siguientes frecuencias genotípica y alélicas fueron observadas.

##### **9.4.1. Frecuencia genotípica**

Se observó mayor frecuencia del genotipo E3/E3, con un 72.5% en la población con SD y 68.3% en el grupo control. El genotipo E4/E4 estuvo presente en el 2.5% del grupo SD, y 2.4% en el grupo CT. Los genotipos heterocigotos E2/E4 y E3/E4 se presentaron en el 5% y 15% del grupo SD y en el 0% y 19% del grupo CT respectivamente. Finalmente, el genotipo E2/E2 solo se observó en un 2.5% del grupo SD (Figura 12).

##### **9.4.2. Frecuencia alélica**

A pesar de que el genotipo E4/E4 estuvo presente en un bajo porcentaje de la población, al calcular las frecuencias alélicas se observó que el alelo E4, considerado de riesgo para el desarrollo de Alzheimer, estuvo presente en el 12.5% de la población con SD, y en el 12.2% del grupo CT (Figura 13).



**Figura 12. Frecuencia alélica.**

Los valores representan el porcentaje de la frecuencia alélica de la población de estudio. CT: Control, SD: Síndrome de Down, APOE: Apolipoproteína E, E: Épsilon.

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidos de los grupos SD y CT también se muestran de manera independiente para cada uno de los polimorfismos de APOE (Cuadro 11-12).

**Cuadro 11. Frecuencia genotípica y alélica del RS 7412**

Polimorfismo	Grupo	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica	
		Genotipo	%	Alelo	%
RS 7412	CT	CC	90.2	C	95.1
		CT	9.8		
		TT	0.0	T	4.9
		<b>Total</b>	100		
		SD	CC	90.0	C
	CT		7.5		
	TT		2.5	T	6.3
	<b>Total</b>		100		

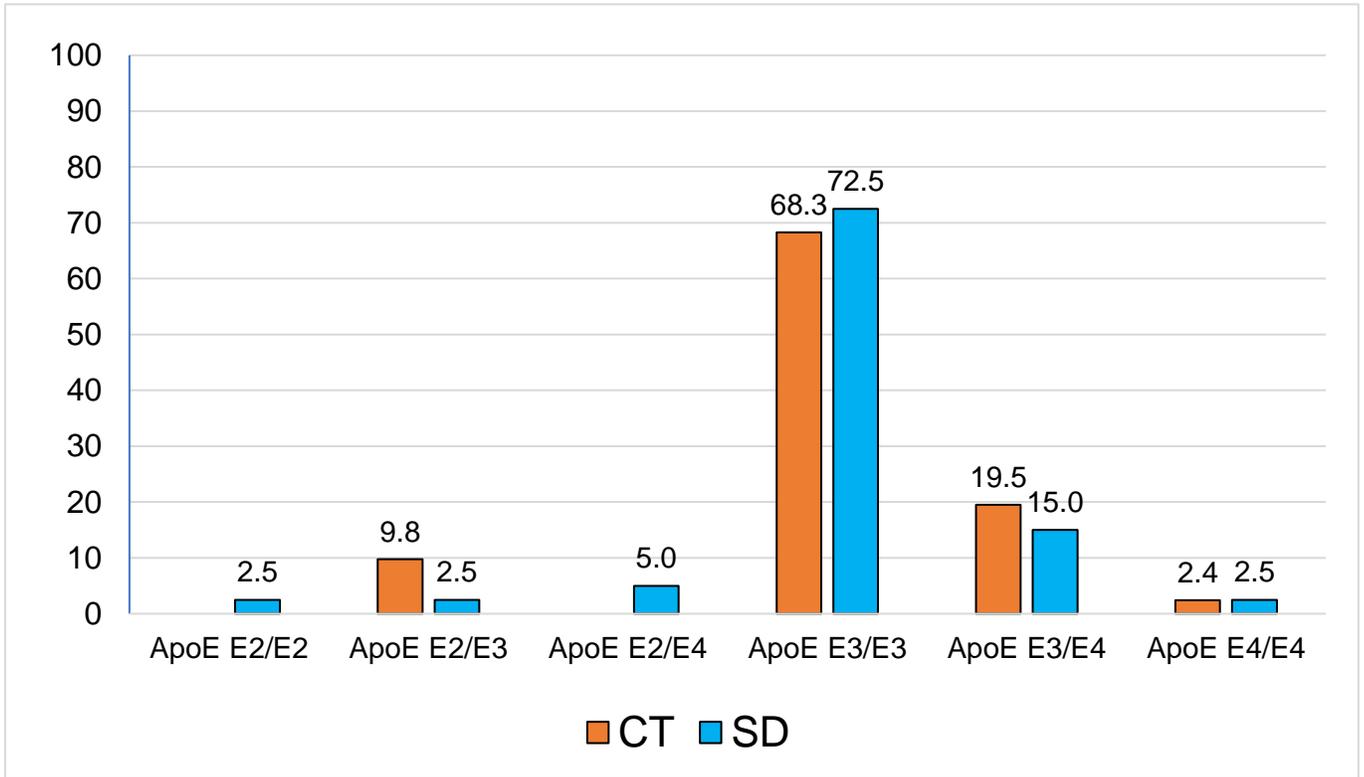
**Cuadro 12. Frecuencia genotípica y alélica del RS 429358**

Polimorfismo	Grupo	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica	
		Genotipo	%	Alelo	%
RS 429358	CT	CC	2.5	C	12.2
		CT	19.5		
		TT	78.0	T	87.8
		<b>Total</b>	100		
		SD	CC	2.5	C
	CT		15.0		
	TT		82.5	T	90.0
	<b>Total</b>		100		

Posteriormente se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de una  $X^2$ . Obtuvimos una  $X^2$  de 1.1111 para RS 7412 y 5.184 para RS 429358 del grupo SD, siendo menores al valor de 5.99 que establece un intervalo de confianza de 0.05 y 2 grados de libertad. Por lo que, de acuerdo con las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas de ambos polimorfismos, corroboramos que nuestra población cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

## **9.5. Correlación de variables**

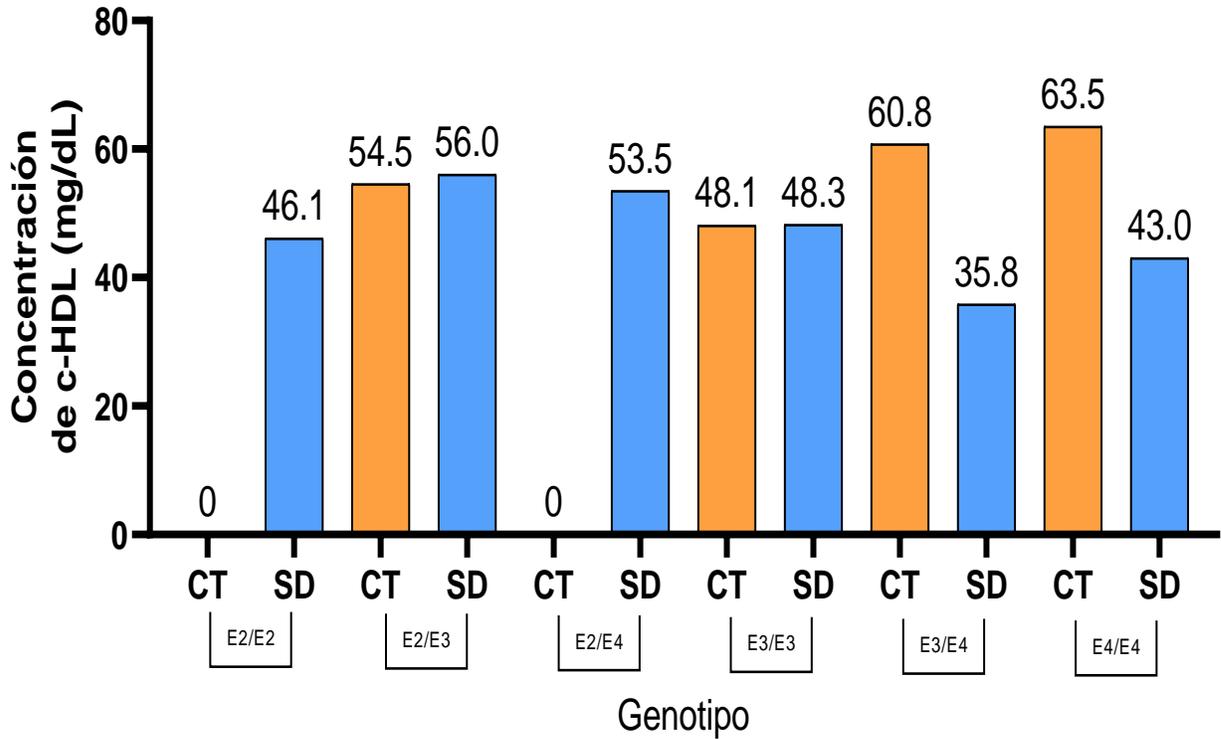
Al relacionar los genotipos con la concentración de c-HDL, se observó que la población con el genotipo asociado a riesgo E4/E4, mostró mayores concentraciones en el grupo CT, con una media de 63.5 mg/dL contra una media de 43.0 mg/dL (Figura 14). Respecto a la concentración de colesterol total, se observó mayor en el grupo CT con genotipo E4/E4, respecto al grupo SD (199.2 mg/dL y 118.0 mg/dL, respectivamente) (Figura 15).



**Figura 13. Frecuencia genotípica.**

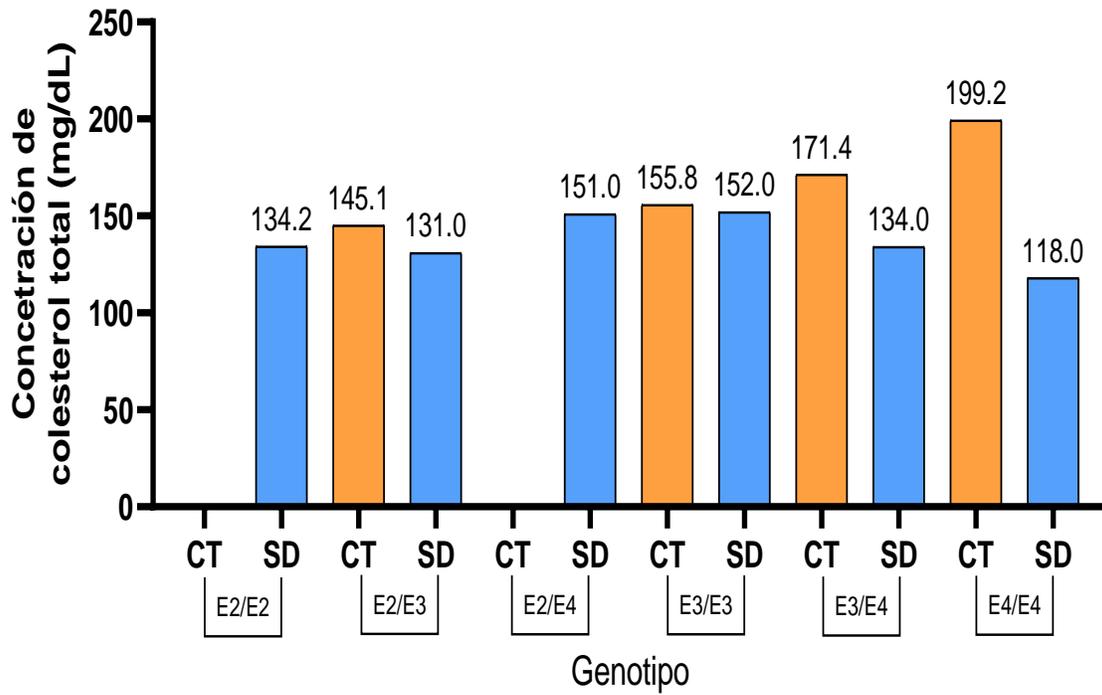
Los valores representan el porcentaje de la frecuencia genotípica de la población de estudio. CT: Control, SD: Síndrome de Down, APOE: Apolipoproteína E, E: Épsilon.

%



**Figura 14. Genotipo y concentración de c-HDL en los grupos de estudio.**

Los valores representan la media de concentración de los grupos de estudio. C-HDL: Colesterol HDL, CT: Control, SD: Síndrome de Down, E: Épsilon de apolipoproteína E.

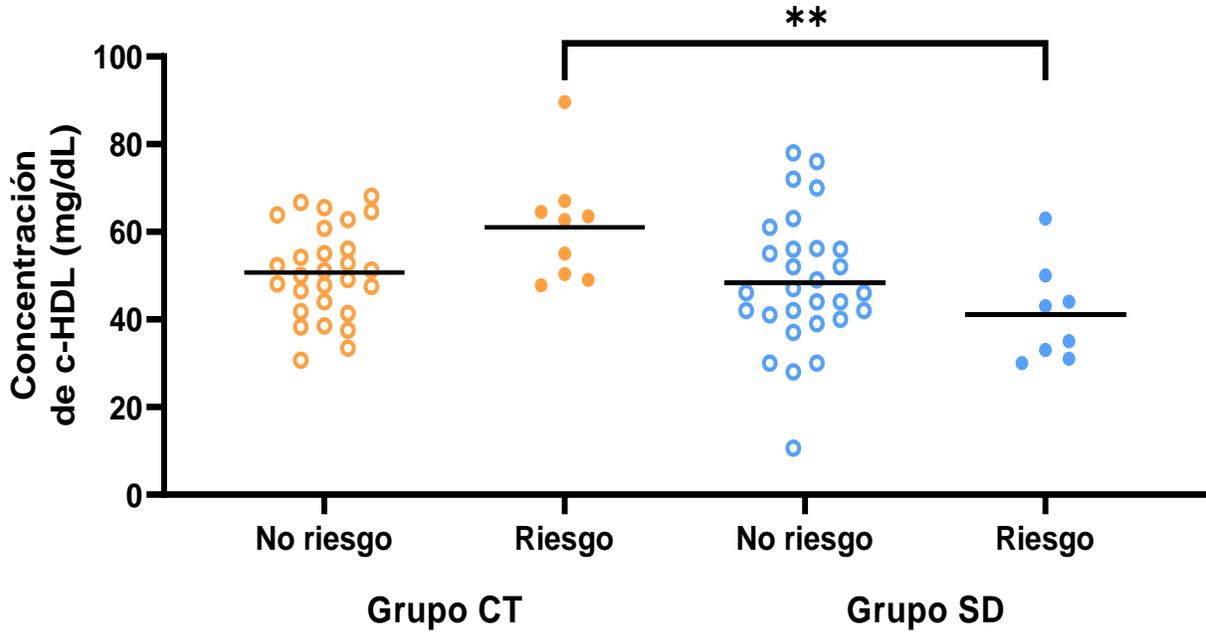


**Figura 15. Concentración de colesterol total en los grupos de estudio, según el genotipo de APOE.**

Los valores representan la media de concentración de los grupos de estudio. CT: Control, SD: Síndrome de Down, E: Épsilon de apolipoproteína E.

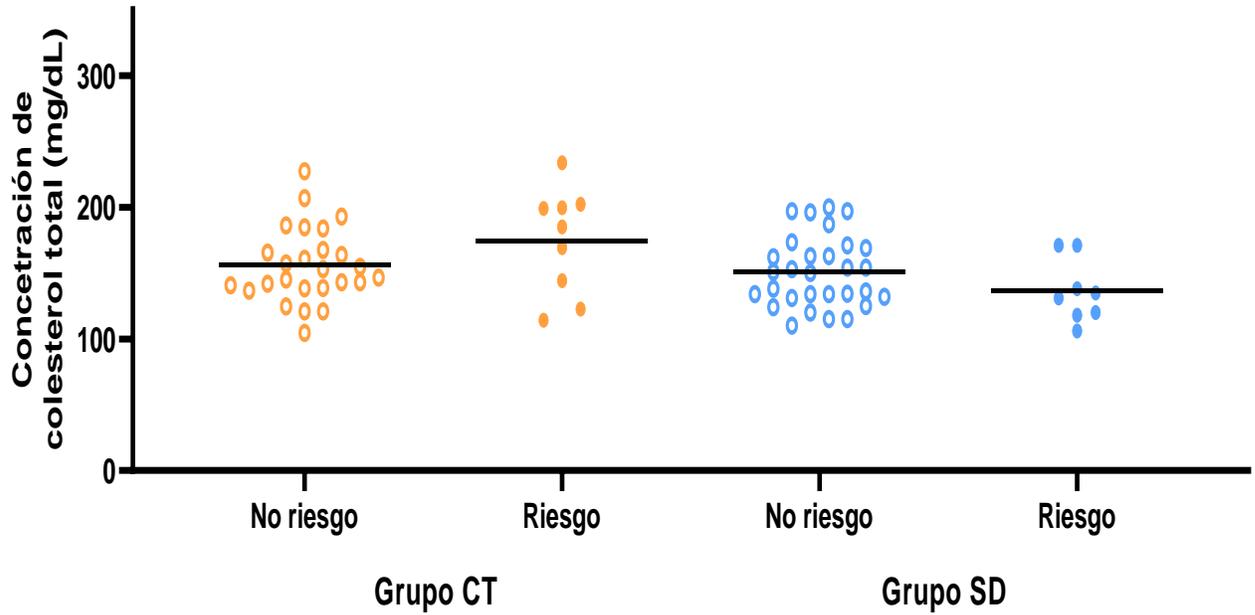
Se agrupó a la población como en riesgo y no riesgo de acuerdo con la presencia o ausencia del alelo de riesgo para el desarrollo de Alzheimer, E4, relacionándolos con las concentraciones de c-HDL y colesterol total. La media de c-HDL fue menor en la población de riesgo con SD, con una media de 41.1 mg/dL y 48.4 mg/dL en el subgrupo de no riesgo con SD. Por el contrario, la media de c-HDL fue mayor en la población CT de riesgo, con una media de 61.0 mg/dL contra 50.7 mg/dL para el subgrupo de no riesgo del grupo CT. Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los subgrupos de riesgo de ambos grupos de estudio con una concentración de 41.1 mg/dL para SD y 61.0 mg/dL para CT (P=0.0043) (Figura 16).

De igual manera se relacionó a estos subgrupos de riesgo y no riesgo con las concentraciones de colesterol total sin observar diferencias significativas. En la población con SD, se obtuvo una media de 136.3 mg/dL en el subgrupo de riesgo y 150.8 mg/dL en el de no riesgo. Mientras que en el grupo CT, se obtuvo una media de 174.5 mg/dL en el subgrupo de riesgo y 155.8 mg/dL en no riesgo (Figura 17).



**Figura 16. Alelo de riesgo y c-HDL en los grupos de estudio.**

Los puntos representan las concentraciones de c-HDL en los grupos de estudio de acuerdo con la presencia del alelo de APOE de riesgo. C-HDL: Colesterol HDL, CT: Control, SD: Síndrome de Down, Riesgo: Presencia del alelo de apolipoproteína E E4, \*\*P<0.01.

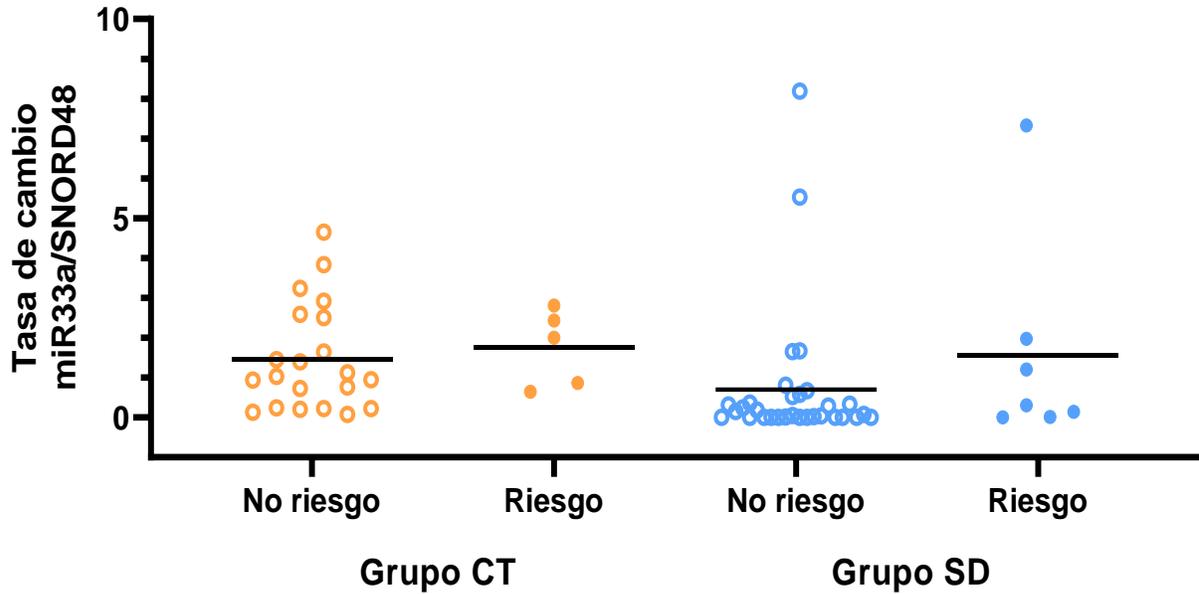


**Figura 17. Alelo de riesgo y concentración de colesterol total en los grupos de estudio.**

Los puntos representan las concentraciones de colesterol en los grupos de estudio de acuerdo con la presencia del alelo de APOE de riesgo. CT: Control, SD: Síndrome de Down, Riesgo: Presencia del alelo de apolipoproteína E E4.

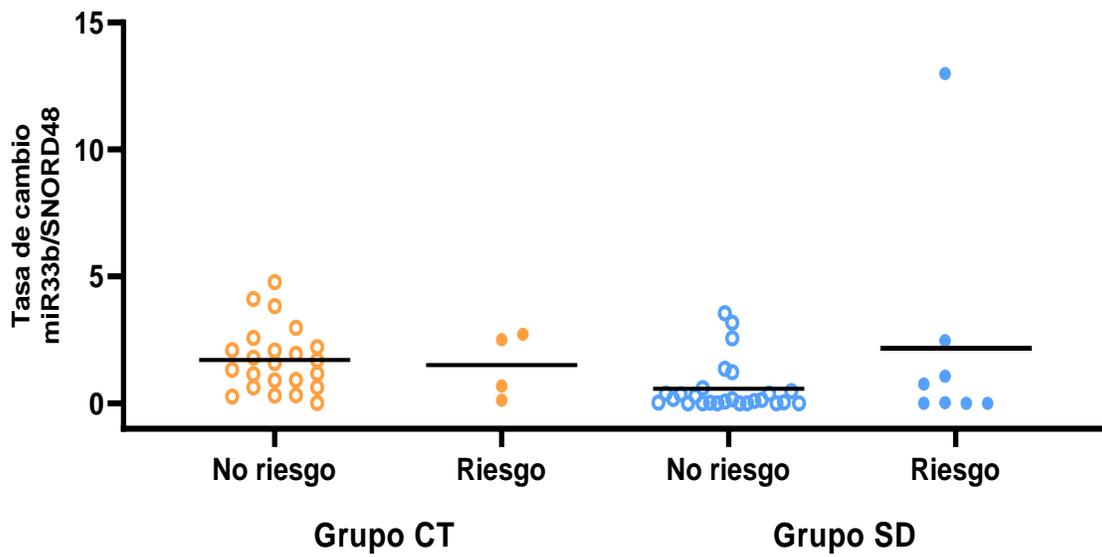
Para establecer el efecto deletéreo del alelo de riesgo, se relacionaron los subgrupos de riesgo y no riesgo de desarrollo de Alzheimer según el genotipo con la tasa de expresión de miR33a y miR33b. El grupo SD con riesgo mostró una sobreexpresión de miR33a de 1.567 y de 0.701 en el subgrupo no riesgo. La población control tuvo menor diferencia con una tasa de expresión de 1.752 en el subgrupo de riesgo y 1.407 en no riesgo (Figura 18).

Asimismo, miR33b mostró mayor expresión en individuos considerados con riesgo del grupo SD con una tasa de expresión de 2.170 y 0.585 para individuos con no riesgo. Mientras que el grupo CT mostro una tasa de expresión de 1.514 en el subgrupo de riesgo y 1.716 en no riesgo (Figura 19).



**Figura 18. Alelo de riesgo y expresión de miR33a en los grupos de estudio.**

Los puntos representan la tasa de expresión de miR33a en los grupos de estudio de acuerdo con la presencia del alelo de ApoE de riesgo. CT: Control, SD: Síndrome de Down, Riesgo: Presencia del alelo de apolipoproteína E E4.



**Figura 19. Alelo de riesgo y miR33 en los grupos de estudio.**

Los puntos representan las tasa de expresión de miR33b en los grupos de estudio de acuerdo con la presencia del alelo de ApoE de riesgo. CT: Control, SD: Síndrome de Down, Riesgo: Presencia del alelo de apolipoproteína E E4.

## X. DISCUSIÓN

La obesidad junto a la insulinoresistencia que comúnmente se presentan en personas con síndrome de Down, se relacionan con perfiles lipídicos menos favorables (concentración de triglicéridos alta y concentración de c-HDL bajos), es decir más aterogénicos (Adelekan y col., 2012). Sin embargo, los estudios realizados en el perfil lipídico de niños con SD han producido resultados inconclusos.

Los estudios de personas con síndrome de Down mayormente incluyen evaluaciones antropométricas y bioquímicas. A diferencia de ellos, el presente estudio analizó datos de niños de 3 a 18 años con y sin SD, realizando mediciones antropométricas, bioquímicas, así como la cuantificación del microRNA 33a5p y 33b3p, involucrado en la posible alteración en los niveles de HDL en personas con SD, además de la cuantificación de c-HDL y la genotipificación del gen de la apolipoproteína E, que participa en el transporte lipídico por medio de la actividad del c-HDL (Aryal y col., 2017).

Para realizar un correcto diagnóstico del SD es necesario realizar un análisis citogenético. Nuestros resultados mostraron que la frecuencias de los mecanismos genéticos en nuestra población fue de 93.8% para trisomía regular o libre, 3.1% para translocación y 3.1% para mosaicismo, similar a las frecuencias comúnmente reportadas con 96.2% de la población con mecanismo genético regular, traslocación de 3.1% y mosaicismo de 0.6% (Haider y col., 2023).

Por cualquiera de sus mecanismos, el material genético extra que aporta la presencia de esta trisomía causa los fenotipos característicos del síndrome, así como los fenotipo variables que pueden observarse, debido a la manera en que se expresan

genéticamente estas alteraciones (Basile, 2008). Dentro de esta diversidad de expresión génica se encuentran características antropométricas y bioquímicas frecuentes. También patologías asociadas a alteraciones metabólicas con mayor prevalencia como obesidad, diabetes, y demencia (Kłosowska, 2017).

En nuestra población, las características antropométricas mostraron una media de peso menor en las personas con SD ( $34.4 \pm 15.6$  kg) que en el CT ( $40.9 \pm 21.9$  kg), pero con una media de estatura significativamente menor en nuestro grupo SD ( $125.1 \pm 17.7$  cm) que en el grupo CT ( $141.0 \pm 20.1$  cm). Distintos autores han encontrado medias de estatura menores en SD (Adelekan y col., 2012; Krzesinska y col., 2022; Pérez-Villarreal y col., 2022). Se ha relacionado una parte importante de la patogénesis de la baja estatura en niños con SD a un déficit cuantitativo y cualitativo de eje hipotálamo-hipófisis y una disminución en la actividad de la hormona crecimiento endógeno (Shaki y col., 2023).

La baja estatura presentada en el grupo SD influyó directamente en el valor del índice de masa corporal. Con los percentiles de IMC para la edad para personas con síndrome de Down y de la CDC para los grupos SD y CT respectivamente, se observó mayor cantidad de participantes del grupo CT (74%) con peso saludable contra un 60% del grupo SD y mayor cantidad de participantes del grupo SD (38%) con sobrepeso/obesidad contra un 25% del grupo CT, obteniendo diferencias significativas entre los grupos ( $P=0.0464$ ). Este mismo patrón fue reportado recientemente en población pediátrica con SD con sobrepeso y obesidad de acuerdo con su IMC y anteriormente, también se estudió población pediátrica, observando al 62% con

sobrepeso y obesidad según el IMC, relacionándolo con circunferencia de cintura y cadera (Cresp-Barría, 2014; Oreskovic y col., 2023)

Autores de otro estudio realizado en 2021 en la misma población, solo reportaron al 15% de su población en sobrepeso y obesidad (Garcia-de la Puente y col., 2021). Sin embargo, encontraron una asociación entre las dislipidemias y la presencia de obesidad, especialmente una correlación del IMC con la concentración de triglicéridos (Garcia-de la Puente y col., 2021). Dichos autores no utilizaron grupo control como referencia, pero observando a autores como Adelekan y col. (2012) que utilizaron a hermanos de los participantes como grupo control, reportaron mayores IMC comparados con su grupo control, como se esperaba. Esto reafirma que la prevención de la obesidad en esta población, debe convertirse en un objetivo prioritario, para la reducción de su morbilidad ya que, como se menciona anteriormente, el SD puede asociarse a enfermedades metabólicas (Cresp-Barría, 2014).

La obesidad considerada frecuente en SD, también se relaciona a perfiles lipídicos menos favorables, en donde se observan especialmente niveles altos de triglicéridos junto a niveles bajos de c-HDL (Adelekan y col., 2012). Esto concuerda con nuestros resultados ya que, al analizar el perfil lipídico, los del grupo SD tuvieron una media de c-HDL significativamente menor ( $47.5 \pm 13.2$  mg/dL) en comparación con el grupo CT ( $55.5 \pm 13.7$  mg/dL) ( $P=0.0039$ ). En 2023 un estudio observó también una media menor de c-HDL en su grupo con SD, en comparación con su grupo control con una media de 52.2, con diferencias significativas (Manfredo y col., 2023).

A su vez, en 2022 47 adolescentes con SD entre 9 y 18 años y un grupo control de la misma edad sin la condición fueron evaluados, encontrando significativamente

menor concentración de c-HDL en el grupo con SD ( $53.0 \pm 11.0$  mg/dL) en comparación al grupo CT ( $63.0 \pm 12.0$  mg/dL) (Krzyszowska y col., 2022). Previamente se reportaron niveles bajos de c-HDL en un grupo de estudio con SD comparado con el de los hermanos de los participantes que conformaban su grupo control (Adelekan y col., 2012). Estudio más recientes de autores como Garcia-de la Puente y col. (2021) y Pecoraro y col. (2023) reportaron al c-HDL bajo como su dislipidemia más común, presentándose en el 45.9% y el 12.5% de su población con SD respectivamente.

Los bajos niveles de c-HDL se han relacionado con obesidad e inactividad física, además de considerarse un marcador de riesgo de arterioesclerosis y especialmente enfermedad coronaria (Garcia-de la Puente y col., 2021). Las HDL son uno de los principales transportadores de colesterol en sangre debido a su papel en el transporte inverso del colesterol, influye positivamente en la salud cardiovascular, incluso el aumento del nivel de HDL también se ha relacionado a proporcionar efectos neuroprotectores, asociando a esta lipoproteína con la longevidad, la mejora de la cognición y la supervivencia libre de demencia (Kłosowska, 2017).

Junto a la baja concentración de c-HDL, la hipertrigliceridemia es una de las dislipidemias reportadas con más frecuencia en las personas con SD. En nuestros resultados la concentración de triglicéridos también mostró diferencias significativas entre los grupos con mayor concentración en el grupo SD ( $97.4 \pm 38.05$  mg/dL) contra el grupo CT ( $75.9 \pm 36.0$  mg/dL). Datos similares también fueron observados por Adelekan y col. (2012), quienes reportaron una media de TG de  $105.7 \pm 53.6$  mg/dL en su grupo con SD, mayor a la media de  $76.5 \pm 33.2$  mg/dL observada en su grupo CT, es decir, que su población SD presentó mayor frecuencia de c-HDL bajo e

hipertrigliceridemia como dislipidemia combinada, misma observada en el 17.9% de la población con SD del estudio realizado por Garcia-de la Puente y col. (2021), mientras que el 26.2% de su población presentó hipertrigliceridemia aislada.

A su vez diferentes estudios evaluaron concentraciones de TG en 2023, un estudio reportó una media mayor de TG en su grupo SD (102.9 mg/dL) que en su grupo CT (86.9 md/dL), mientras que otros autores seccionaron a su población en subgrupos de 3 a 5 años, 6 a 12 años, 13 a 18 años, y un último subgrupo de 19 años en adelante, sin encontrar concentraciones de triglicéridos altos en los primeros subgrupos, con concentraciones de 135, 99 y 113 mg/dL respectivamente, a diferencia del subgrupo de adultos que mostró una media 126 para triglicéridos con un máximo de 301 (Manfredo y col., 2023; Oreskovic y col., 2023). Sin embargo, este último estudio tuvo participantes con SD y obesidad en todos sus subgrupos, lo que pudo haber influido sobre la aparición de dislipidemias en los participantes adultos (Oreskovic y col., 2023). Otro autores como Krzesinska y col. (2022), a pesar de no encontrar concentraciones de triglicéridos altos en sus grupos estudio, pudieron observar concentraciones mayores en su grupo SD con una media de 72 mg/dL, al comparar sus grupos de estudio, con una media del grupo CT de 60 mg/dL.

En el estudio realizado en niños con SD comparados con sus hermanos sin la condición, se describieron concentraciones de c-HDL bajo y TG, colesterol y c-LDL altos en los participantes con SD sin varianza en el IMC de los grupos de estudio (Adelekan y col., 2012). En nuestra evaluación bioquímica del grupo SD observamos una media de concentración disminuida de c-HDL y aumentada para TG con diferencias significativas en ambos parámetros, pero con las concentraciones de

colesterol de nuestros grupos de estudio no tuvieron diferencias significativas, con  $160\pm 32.4$  y  $155.3\pm 31.3$  mg/dL para los grupos SD y CT respectivamente ( $P=0.5097$ ).

Resultado similares fueron encontrados en 2017, en población con SD para los parámetros de c-HDL, y TG, aunque con concentraciones altas de C.Total en el 11.9% de su población y de c-LDL en el 13.8% (de la Piedra y col., 2017). A diferencia de nuestros resultados de c-LDL que no mostraron diferencias significativas, el grupo con SD tuvo una media de  $88.1\pm 29.1$  mg/dL y el grupo CT de  $89.2\pm 21.5$  mg/dL, aunque nuestro grupo de estudio fueron 50 niños con SD a diferencia de la población de dicho estudio conformada por 218 niños y adolescentes con SD, lo que pudo influir con el aumento en la frecuencia de dislipidemias (de la Piedra y col., 2017).

El número de estudios de dislipidemias en personas en SD ha aumentado significativamente en los últimos años, principalmente por el aumento en la esperanza de vida de esta población y la reciente causa de muerte por aterosclerosis en adultos con SD reportada cada vez más recurrentemente (Tenneti y col., 2017).

Es importante la evaluación de estos parámetros y su relación con posibles variables que lleven al desarrollo de enfermedades con frecuencia asociadas al SD. Los miRNAs han sido relacionados con la regulación de procesos biológicos importantes en los últimos años, incluyendo el desarrollo y regulación de la progresión de enfermedades (Aryal y col., 2017). Distintos miRNAs se han relacionado con la patogénesis de enfermedad cardiovascular, teniendo un papel importante en el control de la inflamación, estimulando la degeneración aterosclerótica de las paredes de las arterias (Martino y col., 2015). También se asocian con la regulación del metabolismo lipídico, especialmente lípidos circulantes, y con alteraciones en la circulación de

colesterol y triglicéridos, factores importantes para riesgo cardiovascular (Aryal y col., 2017). Específicamente miR-33a y miR-33b participan en la homeostasis del colesterol por medio de la formación de HDL (Martino y col., 2015). Debido al papel observado de estos miRNAs en el metabolismo del colesterol, diferentes estudios han evaluado su inhibición en modelos animales, observando concentraciones de c-HDL en plasma aumentada y por lo tanto, protección contra aterosclerosis (Martino y col., 2015).

En cuanto a SD, distintos reportes han demostrado que miR-33 se encuentra sobreexpresado en esta población (Zhang y col., 2021). En el presente estudio se analizó la tasa de expresión de miR-33a5p y miR-33b3p, observando que miR-33a tuvo menor expresión en el grupo SD, con una media de  $0.166 \pm 0.215$  en comparación a la media del grupo CT de  $1.554 \pm 1.208$  ( $P < 0.0001$ ). El miR-33b tuvo menor expresión en el grupo SD, con una media de  $0.666 \pm 1.064$  sobre la media del grupo CT de  $1.683 \pm 1.469$  ( $P < 0.0001$ ).

Por el contrario, en 2021 se realizó un estudio en un modelo de ratones con C.Total alto para evaluar la expresión de miR-33 en tejido muscular, adiposo y hepático (Zhang y col., 2021). Su estudio buscó relacionar los parámetros bioquímicos con la expresión de miR-33, encontrando una mayor expresión de miR-33 en el grupo experimental en comparación al grupo control, en tejido adiposo (Zhang y col., 2021). En los tejidos hepático y muscular, la tasa de expresión de miR-33 fue mayor en el grupo control, lo que sugiere que la expresión de miRNAs puede variar en diferentes tejidos (Zhang y col., 2021).

A su vez un estudio en población pediátrica analizó miR-33a y miR-33b asociándolo con hipercolesterolemia familiar, encontrarán mayor expresión de los

miRNAs en participantes con hipercolesterolemia en comparación con participantes sin alteraciones lipídicas (Martino y col., 2015). Estos resultados sugieren que la presencia de dislipidemias podría influir en la expresión de miR-33. Sin embargo, el estudio fue realizado en niños sin condiciones genéticas aparentes, por lo que no debe descartarse que la presencia de material genético extra, como en la trisomía 21, pueda modificar la tasa de expresión de miR-33 aún con la presencia de dislipidemias (Martino y col., 2015).

Anteriormente, se analizó a ratones deficientes en miR-33 encontrando niveles del c-HDL en sangre significativamente mayores que en ratones sin deficiencia, estableciendo un rol importante de miR-33 en la expresión de ABCA1 para la biogénesis del HDL (Horie y col., 2010). La diferencia entre los resultados de nuestro estudio con los de autores mencionados sobre la expresión de miR-33 podría estar influenciada por la presencia de la condición genética y la edad de nuestra población.

En nuestro análisis también se evaluó la expresión de miR-33 por grupos etarios de infancia y adolescencia, agrupando a la población en subgrupos de 3 a 11 años y de 12 a 18 años. Los niveles de expresión de miR33a mostraron menor expresión en el grupo SD en ambos subgrupos etarios, con una media de expresión de 1.560 para el grupo CT de 3 a 11 años y una media de expresión para el grupo SD de 0.207, al igual que menor expresión del grupo SD de grupo etario de 12 a 18 años, con una media de expresión de 0.134 y 1.527 del grupo CT, con una significancia estadística de  $P < 0.0001$ .

Resultados similares se observaron en los niveles de expresión de miR33b con menor expresión en el grupo SD en ambos subgrupos etarios, con una media de

expresión de 1.560 para el grupo CT de 3 a 11 años contra una media de expresión para el grupo SD de 0.207, asimismo en subgrupo de 12 a 18 años una media de expresión de 1.527 del grupo CT contra 0.134 para el grupo SD, con una significancia estadísticamente de  $P < 0.0001$ .

Autores como Pérez-Villarreal y col. (2022) han evaluado la expresión de miRNAs como miR-155 y let-7c en personas con síndrome de Down, encontrando un aumento en la tasa de expresión en comparación con su grupo control. Sin embargo, el estudio fue realizado en personas de todas las edades, utilizando subgrupos de edad de 20 años o menores y 21 años o mayores, por lo que el haber analizado personas jóvenes en el presente estudio, de 3 a 18 años, podría influir en la expresión del miRNA, sugiriendo que la tasa de expresión de miR33 podría aumentar con la edad (Pérez-Villarreal y col., 2022).

A pesar de no encontrar sobreexpresado miR-33 en nuestro grupo SD, al relacionarlo con covariables, observamos que correlacionó estadísticamente con la concentración de triglicéridos del grupo SD con una  $r$  de 0.348 ( $P = 0.019$ ). Resultados similares fueron reportados en 2021, se encontró una correlación negativa entre la concentración de TG y la expresión de miR-33 en tejido hepático y muscular de un modelo de ratones, mientras que en tejido graso tuvieron una correlación positiva entre esta dos variables (Zhang y col., 2021).

Los resultados de estos autores refuerzan la teoría de que miR-33 participa en la regulación de colesterol intracelular y la homeostasis del colesterol plasmático, por lo que evaluar a miR-33 en SD en otros tejidos, podría brindarnos nuevos resultados que

sostengan la teoría de la asociación entre este microRNA y el metabolismo del colesterol, y la apolipoproteína E, también analizada en nuestro estudio.

La manera en la que se manifiestan las isoformas de APOE en Alzheimer son indicios de su acción en la población con SD, ya que la presencia del síndrome se vuelve un factor de riesgo para el deterioro cognitivo (Kok y col., 2009). Se ha observado específicamente que portadores de APOE E4 tienen un mayor deterioro cognitivo con el envejecimiento (Kok y col., 2009). Dentro de los resultados expuestos observamos en las frecuencias genotípicas de APOE, una mayor frecuencia del genotipo E3/E3, en un 72.5% de nuestra población con síndrome de Down y 68.3% en el grupo control, el genotipo E4/E4 estuvo presente en el 2.5% del grupo SD, y 2.4% en el grupo CT. Los genotipos heterocigotos E2/E4 y E3/E4 se presentaron en el 5% y 15% del grupo SD y en el 0% y 19% del grupo CT respectivamente. Finalmente, el genotipo E2/E2 solo se observó en un 2.5% del grupo SD. Sin embargo, a pesar de que el genotipo E4/E4 estuvo presente en un bajo porcentaje de la población, al calcular las frecuencias alélicas se observó que el alelo E4, considerado de riesgo para el desarrollo de Alzheimer, estuvo presente en el 12.5% de la población con síndrome de Down, y en el 12.2% del grupo CT.

Actualmente un estudio reportó al 25% de su población con SD con la presencia del alelo APOE E4, mientras que en los participantes con algún grado de demencia se presentó en el 36% (Fleming y col., 2023). Anteriormente se evaluaron la frecuencia alélica en personas con enfermedad de Alzheimer, encontrando que las placas seniles fueron más frecuentes en individuos portadores del alelo E4 (Kok y col., 2009). Tomando en cuenta que las personas con SD se consideran población de riesgo para

el desarrollo de esta enfermedad, la genotipificación de APOE podría utilizarse como valor predictor de riesgo en esta condición.

Al analizar los genotipos presentes en nuestra población con diferentes covariables, se observó que, de la población con el genotipo asociado a riesgo, E4/E4, el grupo CT mostró mayores concentraciones de c-HDL con una media de 63.5 mg/dL contra una media del grupo SD de 43.0 mg/dL. Este resultado, concuerda con la asociación observada entre la presencia del alelo E4 de APOE como factor de riesgo genético para el desarrollo de Alzheimer, patología frecuente en personas con SD (Williams y col., 2020).

Nuestros resultados de frecuencias genotípicas y alélicas fueron similares a los esperados. En individuos latinoamericanos con ascendencia mayormente europea y nativa americana la frecuencia del polimorfismo RS 7412 para el alelo C es de 97.4% y 2.6% para el alelo T (NCBI, 2022). Nuestro grupo SD presentó una frecuencia de 93.7 y 6.2% para el alelo C y T respectivamente. Mientras que las frecuencias alélicas de RS 429358 fueron iguales en nuestro grupo SD, con 10.0% para el alelo C y 90% para el alelo T, que las frecuencias esperadas para Latinoamérica con los mismos porcentajes, con equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población.

Las concentraciones de colesterol según el genotipo no tuvieron diferencias significativas entre los grupos. Mientras que, las concentraciones de c-HDL y colesterol analizadas por genotipo de riesgo y no riesgo, es decir la presencia o ausencia del alelo de riesgo para el desarrollo de Alzheimer, mostraron una media de c-HDL menor en la población de riesgo con SD, con una media de 41.1 mg/dL y 48.4 mg/dL en el subgrupo de no riesgo con SD. Por el contrario, la media de c-HDL fue mayor en la

población de riesgo y CT, con una media de 61.0 mg/dL contra 50.7 mg/dL para el subgrupo de no riesgo del grupo CT. Se observaron diferencias significativas entre los grupos subgrupos de riesgo de ambos grupos de estudio con concentraciones de 41.1 y 61.0 mg/dL para SD y CT respectivamente ( $P=0.0043$ ).

Nuestros resultados concuerdan con lo esperado según la posesión de uno o más alelos APOE E4 como riesgo para enfermedad de Alzheimer (Kłosowska, 2017; Williams y col., 2020). A su vez se ha demostrado que las dislipidemias también pueden estar relacionadas con el desarrollo de esta enfermedad (Kłosowska, 2017). Asimismo, el SD se consideran una condición de riesgo de la enfermedad, por lo que era de esperarse que los individuos con la presencia del alelo EA tuvieran menores concentraciones de c-HDL que el grupo CT (Fortea y col., 2021). La relación que se observa entre la presencia del alelo E4 y la menor concentración de c-HDL, sustenta la teoría de que en personas consideradas población de riesgo para el desarrollo de alzheimer temprano como la población SD, la presencia del alelo E4 y baja concentraciones de c-HDL participan en el deterioro cognitivo que lleva al desarrollo de la enfermedad, e incluso podrían utilizarse como marcadores de alta predisposición de esta.

Finalmente, en los resultados expuestos de los subgrupos de riesgo y no riesgo de desarrollo de alzheimer, se observó la tasa de expresión de miR33a y miR33b y en ambos hubo mayor expresión en individuos de riesgo en comparación con los individuos no riesgo, para el grupo de SD. Mientras que en los grupos CT observamos tasas de expresión similares en los subgrupos de riesgo y no riesgo.

En nuestro estudio no se observó sobreexpresión de miRNAs en individuos con SD a pesar de ser portadores del alelo de riesgo para alzheimer y presentar menores concentraciones de c-HDL en comparación con individuos sin la condición, lo que podría deberse a las características de la población en la que se ha evaluado este miRNA en otros estudios. Existen estudios en modelos de ratones han evaluado la tasa de expresión en diferentes tejidos y no en plasma, lo que podrían resultar en una expresión diferente (Zhang y col., 2021). Otros estudios realizados en niños sin SD sugieren que la condición genética *per se* podría influir en la expresión (Martino y col., 2015). Pérez-Villarreal y col. (2022) evaluó la expresión de miR33 en personas con SD; sin embargo, su población incluyó adultos con SD, lo que podría implicar la posibilidad de que se presente una sobreexpresión de miR33 en etapa adulta.

Es de nuestro conocimiento que la evaluación de la tasa de expresión de miR33, la genotipificación de APOE para identificar el alelo de riesgo y su asociación con concentraciones de c-HDL, no se había realizado en población pediátrica con SD, incluso los estudios que existen de miR33 en SD son escasos, mientras que no se había evaluado al alelo E4 de apolipoproteína previo al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, en esta población.

## **XI. CONCLUSIONES**

### **11.1. Conclusión general**

Las personas con síndrome de Down presentan concentraciones desfavorables de c-HDL y riesgo de sobrepeso u obesidad a pesar de la edad temprana. No existe una sobreexpresión de miR-33 en población pediátrica con síndrome de Down lo que vuelve necesario estudiarlo en otras etapas de la vida.

Este estudio permitió identificar una asociación entre la presencia del alelo  $\epsilon 4$  de APOE considerado de riesgo y las bajas concentraciones de c-HDL en esta población con alta prevalencia de alzheimer, sugiriendo que el genotipo de riesgo se asocia con la baja concentración de HDL, que a su vez podría considerarse un factor de riesgo para el desarrollo temprano de alzheimer.

### **11.2. Conclusiones específicas**

- 38% de las personas con SD presentaron sobrepeso y obesidad.
- La tasa de expresión de miR33a y miR33b fue menor en el grupo SD.
- Los individuos con SD tuvieron una media de c-HDL significativamente menor que el grupo CT.
- El alelo E4 de APOE se presentó en el 12.5% de la población con SD. Nuestra población cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg.
- La población con el genotipo de riesgo mostró menores concentraciones de c-HDL en el grupo SD en comparación con el grupo CT.

## **XII.PERSPECTIVAS DEL PROYECTO**

A partir de los estudios y discusiones presentados, las perspectivas nos dirigen a evaluar la expresión de miR-33 en población adulta con síndrome de Down. Esto con la finalidad de confirmar o refutar si en esta población, la sobreexpresión del miRNA puede ocurrir en la adultez y asociarla con el desarrollo temprano de alzheimer frecuente en ellos, incluso evaluar estas variables en personas con SD que ya hayan desarrollado la patología. Por otro lado, analizar los factores que podrían estar influyendo en la acción de ABCA1 para descartar otras vías de asociación entre síndrome de Down y la acumulación placas  $\beta$ -amiloides. Finalmente, estudiar a profundidad la relación observada entre el alelo de riesgo de APOE y las bajas concentraciones de c-HDL contribuirían al esclarecimiento del porque la población con SD tiene mayor riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer de inicio temprano.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adelekan, T., Magge, S., Shults, J., Stallings, V., & Stettler, N. (2012). Lipid profiles of children with Down syndrome compared with their sibilings. *Pediatrics*, 129, 1382-1387.
- Antonarakis, S. E. (2017). Down syndrome and complexity of genome dosage imbalance. *Nature reviews*, 18, 147-163.
- Aryal, B., Singh, A. K., Rotllan, N., Price, N., & Fernandez-Hernando, C. (2017, Jun). MicroRNAs and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 28(3), 273-280. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000420>
- Basile, H. (2008). Retraso mental y genética del síndrome de Down. *ALCMEON*, 15, 9-23.
- Basile, H. S. (2008). Retraso mental y genética, Síndrome de Down. *Clínica Neuropsiquiátrica*, 15, 9-23.
- Buonuomo, P. S., Bartuli, A., Mastrogiorgio, G., Vittucci, A., Di Camillo, C., Bianchi, S., Marafon, D. P., Villani, A., & Valentini, D. (2016). Lipid profiles in a large cohort of Italian children with Down syndrome. *European Journal of Medical Genetics*, 59, 392-395.
- CDC. (2000). Percentiles niños y niñas de 2 a 20 años. *Centro-Nacional-de-Estadísticas-de-Salud. Centro Nacional para la Prevención de Enfermedades Crónicas y Promoción de Salud*.
- Chini, V., Foka, A., Dimitracopoulos, G., & Spiliopoulou, I. (2007, Nov). Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models. *Lett Appl Microbiol*, 45(5), 479-484. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02208.x>
- Cresp-Barría, M. C.-N., Felipe; Ojeda-Nahuelcura, Rodrigo; Machuca-Barría, Claudia; Carrasco-Jiménez, Ángela. (2014). Correlación de variables antropométrica como predictor de salud, en una población de niños y adolescentes con síndrome de Down de Temuco, Chile. *Rev. Fac. Med.*, 62, 193-198.
- de Graaf, G., Buckley, F., & Skotko, B. G. (2017, Apr). Estimation of the number of people with Down syndrome in the United States. *Genet Med*, 19(4), 439-447. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.127>
- de la Piedra, M. J., Alberti, G., Cerda, J., Cárdenas, A., Paul, M. A., & Lizama, M. (2017). Alta frecuencia de dislipidemias en niños y adolescentes con síndrome de Down. *Revista Chilena de Pediatría*, 88, 595-601.
- Farriols Danés, C. (2012a). Aspectos específicos del envejecimiento en el síndrome de Down. *Revista médica internacional sobre el síndrome de Down*, 16, 3-10.
- Farriols Danés, C. (2012b). Aspectos específicos del envejecimiento en el síndrome de Down. *Revista Médica Internacional Sobre el Síndrome de Down*, 16, 3-10.
- Fleming, V., Helsel, B. C., Ptomey, L. T., Rosas, H. D., Handen, B., Laymon, C., Christian, B. T., Head, E., Mapstone, M., Lai, F., Krinsky-McHale, S., Zaman, S., Ances, B. M., Lee, J. H., Hartley, S. L., & Alzheimer's Biomarker Consortium - Down Syndrome, C. (2023). Weight Loss and Alzheimer's Disease in Down Syndrome. *J Alzheimers Dis*, 91(3), 1215-1227. <https://doi.org/10.3233/JAD-220865>

- Flores Arizmendi, K. A., Garcia De La Puente, S., Gonzalez Navarro, M., Bonillo Suarez, L., De Leon Becerra, A. G., Valderrama Hernandez, A., Santos Rios, R., & Altamirano Bustamante, N. (2022, Apr). Growth charts for Mexican children with Down syndrome. *Am J Med Genet A*, 188(4), 1170-1183. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62637>
- Fortea, J., Zaman, S. H., Hartley, S., Rafii, M. S., Head, E., & Carmona-Iragui, M. (2021, Nov). Alzheimer's disease associated with Down syndrome: a genetic form of dementia. *Lancet Neurol*, 20(11), 930-942. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(21\)00245-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(21)00245-3)
- Garcia-de la Puente, S., Flores-Arizmendi, K. A., Delgado-Montemayor, M. J., & Vargas-Robledo, T. T. (2021, Feb 13). Lipid profile of Mexican children with Down syndrome. *BMC Pediatr*, 21(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12887-021-02542-1>
- Grundy, S. M. (2001, Oct 11). United States Cholesterol Guidelines 2001: expanded scope of intensive low-density lipoprotein-lowering therapy. *Am J Cardiol*, 88(7b), 23j-27j. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(01\)01931-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(01)01931-2)
- Haider, A., Khan, S., Kuraishi, R. T., & Akhtar, M. S. (2023, Feb). Cytogenetic study of subtypes of Down syndrome and its relation with pattern of congenital cardiac defects. *J Pak Med Assoc*, 73(2), 270-274. <https://doi.org/10.47391/jpma.5422>
- Hamburg, S., Lowe, B., Startin, C. M., Padilla, C., Coppus, A., Silverman, W., Fortea, J., Zaman, S., Head, E., Handen, B. L., Lott, I., Song, W., & Strydom, A. (2019, Aug 30). Assessing general cognitive and adaptive abilities in adults with Down syndrome: a systematic review. *J Neurodev Disord*, 11(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s11689-019-9279-8>
- Horie, T., Ono, K., Horiguchi, M., Nishi, H., Nakamura, T., Nagao, K., Kinoshita, M., Kuwabara, Y., Marusawa, H., Iwanaga, Y., Hasegawa, K., Yokode, M., Kimura, T., & Kita, T. (2010, Oct 5). MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(40), 17321-17326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008499107>
- INSP. (2021). Entendamos el Síndrome de Down. *Instituto Nacional de Salud Pública*. Iulita, M. F., Garzón Chavez, D., Klitgaard Christensen, M., Valle Tamayo, N., Plana-Ripoll, O., Rasmussen, S. A., Roqué Figuls, M., Alcolea, D., Videla, L., Barroeta, I., Benejam, B., Altuna, M., Padilla, C., Pegueroles, J., Fernandez, S., Belbin, O., Carmona-Iragui, M., Blesa, R., Lleó, A., Bejanin, A., & Fortea, J. (2022, May 2). Association of Alzheimer Disease With Life Expectancy in People With Down Syndrome. *JAMA Netw Open*, 5(5), e2212910. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.12910>
- Kazemi, M. (2016). Síndrome de Down, estado actual, retos y perspectivas futuras. Kłosowska, A. Ć., Agnieszka; Jankowski, Maciej; Wierzba, Jolanta. (2017). DOWN SYNDROME, INCREASED RISK OF DEMENTIA AND LIPID DISTURBANCES. *Developmental Period Medicine*, 1-5.
- Kok, E., Haikonen, S., Luoto, T., Huhtala, H., Goebeler, S., Haapasalo, H., & Karhunen, P. J. (2009, Jun). Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. *Ann Neurol*, 65(6), 650-657. <https://doi.org/10.1002/ana.21696>

- Krzesinska, A., Klosowska, A., Salaga-Zaleska, K., Cwiklinska, A., Mickiewicz, A., Chyla, G., Wierzba, J., Jankowski, M., & Kuchta, A. (2022, Jul 27). Lipid Profile, Lp(a) Levels, and HDL Quality in Adolescents with Down Syndrome. *J Clin Med*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/jcm11154356>
- Manfredo, J., Capone, G., Yanek, L., McCarter, R., Zemel, B., Kelly, A., & Magge, S. N. (2023, Jul). Cardiometabolic risk in young adults with Down syndrome. *Am J Med Genet A*, 191(7), 1758-1768. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63197>
- Marfell-Jones, M., Olds, T., Carter, S., & Carter, L. (2006). Estandares Internacionales para Mediciones Antropométricas. *Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría*.
- Martino, F., Carlomosti, F., Avitabile, D., Persico, L., Picozza, M., Barilla, F., Arca, M., Montali, A., Martino, E., Zanoni, C., Parrotto, S., & Magenta, A. (2015, Dec). Circulating miR-33a and miR-33b are up-regulated in familial hypercholesterolaemia in paediatric age. *Clin Sci (Lond)*, 129(11), 963-972. <https://doi.org/10.1042/CS20150235>
- Mazurek, D., & Wyka, J. (2015). Down syndrome - Genetic and nutritional aspects of accompanying disorders. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 66, 189-194.
- Mazurek, D. W., Joanna. (2015). DOWN SYNDROME – GENETIC AND NUTRITIONAL ASPECTS OF ACCOMPANYING DISORDERS. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 66, 189-194.
- Montoya. (2011). Estudio genómico de region critica del crom21 en down.
- NCBI, N. L. o. M.-. (2022). *dbSNP Short Genetic Variations* National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN10492700>
- NCEP. (2001, May 16). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*, 285(19), 2486-2497. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>
- OMS. (2022). Organización Mundial de la Salud.
- Oreskovic, N. M., Baumer, N. T., Di Camillo, C., Cornachia, M., Franklin, C., Hart, S. J., Kishnani, P. S., McCormick, A., Milliken, A. L., Patsiogiannis, V., Pawlowski, K. G., Santoro, S. L., Sargado, S., Scoppola, V., Torres, A., Valentini, D., Vellody, K., Villani, A., & Skotko, B. G. (2023, Mar). Cardiometabolic profiles in children and adults with overweight and obesity and down syndrome. *Am J Med Genet A*, 191(3), 813-822. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63088>
- Patterson, D. (2009, Jul). Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Hum Genet*, 126(1), 195-214. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0696-8>
- Pecoraro, L., Ferron, E., Solfa, M., Mirandola, M., Lauriola, S., Piacentini, G., & Pietrobelli, A. (2023, Oct). Body composition and laboratory parameters in children with down syndrome: The DONUT study. *Clin Nutr ESPEN*, 57, 253-257. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2023.07.003>
- Penrose, L. (1949). Incidencia del mongolismo en la población general. *University of London*.
- Pérez-Villarreal, J. M., Aviña-Padilla, K., Beltrán-López, E., Guadrón-Llanos, A. M., López-Bayghen, E., Magaña-Gómez, J., Meraz-Ríos, M. A., Varela-Echavarría, A., & Angulo-Rojo, C. (2022, Jun). Profiling of circulating chromosome 21-

- encoded microRNAs, miR-155, and let-7c, in down syndrome. *Mol Genet Genomic Med*, 10(6), e1938. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1938>
- Perez Chavez, D. A. (2014). <Pérez (2014) Síndrome de Down, mecanismo genético..pdf>.
- Real de Asua, D., Parra, P., Costa, R., Moldenhauer, F., & Suarez, C. (2014, Nov). Evaluation of the impact of abdominal obesity on glucose and lipid metabolism disorders in adults with Down syndrome. *Res Dev Disabil*, 35(11), 2942-2949. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2014.07.038>
- Saghazadeh, A., Mahmoudi, M., Dehghani Ashkezari, A., Oliaie Rezaie, N., & Rezaei, N. (2017). Systematic review and meta-analysis shows a specific micronutrient profile in people with Down Syndrome: Lower blood calcium, selenium and zinc, higher red blood cell copper and zinc, and higher salivary calcium and sodium. *PLoS One*, 12(4), e0175437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175437>
- Seveno, D., Vaillant, A., Rioboo, R., Adão, H., Conti, J., & De Coninck, J. (2009, Nov 17). Dynamics of wetting revisited. *Langmuir*, 25(22), 13034-13044. <https://doi.org/10.1021/la901125a>
- Shaki, D., Hershkovitz, E., Tamam, S., Bollotin, A., David, O., Yalovitsky, G., Loewenthal, N., Carmon, L., Walker, D., Nowak, R., & Haim, A. (2023). GH treatment in pediatric Down syndrome: a systematic review and mini meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14, 1135768. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1135768>
- Sierra Romero, M. D. C., Navarrete Hernandez, E., Canun Serrano, S., Reyes Pablo, A. E., & Valdes Hernandez, J. (2014, Sep-Oct). [Prevalence of Down syndrome using certificates of live births and fetal deaths in Mexico 2008-2011]. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 71(5), 292-297. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2014.09.002> (Prevalencia del síndrome de Down en México utilizando los certificados de nacimiento vivo y de muerte fetal durante el periodo 2008-2011.)
- Tenneti, N., Dayal, D., Sharda, S., Panigrahi, I., Didi, M., Attri, S. V., Sachdeva, N., & Bhalla, A. K. (2017, Aug 28). Concentrations of leptin, adiponectin and other metabolic parameters in non-obese children with Down syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 30(8), 831-837. <https://doi.org/10.1515/jpem-2016-0422>
- Williams, T., Borchelt, D. R., & Chakrabarty, P. (2020, Jan 31). Therapeutic approaches targeting Apolipoprotein E function in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 15(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-0358-9>
- Zhang, X., Zhao, H., Sheng, Q., Liu, X., You, W., Lin, H., & Liu, G. (2021). Regulation of microRNA-33, SREBP and ABCA1 genes in a mouse model of high cholesterol. *Arch Anim Breed*, 64(1), 103-108. <https://doi.org/10.5194/aab-64-103-2021>
- Zigman, W. B., Schupf, N., Jenkins, E. C., Urv, T. K., Tycko, B., & Silverman, W. (2007, Apr 18). Cholesterol level, statin use and Alzheimer's disease in adults with Down syndrome. *Neurosci Lett*, 416(3), 279-284. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.02.023>

## XIV. ANEXOS

### 11.1. Documentos complementarios

#### 11.1.1. Consentimiento informado

#### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA: Uso de información personal y clínica, medición antropométrica y toma de muestra de sangre.**

Estimado(a) Señor/Señora: \_\_\_\_\_

No registro: \_\_\_\_\_

#### **Introducción/Objetivo:**

El “Laboratorio” de la “Maestría en ciencia biomédicas” perteneciente a la Universidad Autónoma de Sinaloa, realiza el proyecto: “**EXPRESIÓN DE MIR-33, ISOFORMAS DE APOE Y COLESTEROL HDL COMO FACTORES DE RIESGO EN SÍNDROME DE DOWN**”. El objetivo del estudio es examinar las características genéticas de síndrome de Down (polimorfismos, niveles séricos de lípidos y glucosa, metabolitos de la microbiota intestinal) y su relación con indicadores de riesgo de enfermedades crónico metabólicas y capacidad cognitiva en individuos con **síndrome de Down**.

#### **Procedimientos:**

Si usted acepta participar en el estudio, ocurrirá lo siguiente:

- Proporcionará información personal y clínica, a través de una encuesta. La encuesta consistirá de las siguientes secciones: datos generales, antropometría (resultados de evaluación), hábitos alimenticios, química sanguínea (resultados del análisis de una muestra de sangre), actividad física, consumo de tabaco, consumo de alcohol, nivel socioeconómico, antecedentes patológicos y antecedentes heredo-familiares. Además, se le realizará la valoración del estado mental: Escala cognitiva de Wechsler que mide, comprensión verbal, razonamiento perceptual, memoria de trabajo y velocidad de procesamiento. Así mismo, se aplicará la encuesta de costumbres alimentarias: Escala de Acción de los Padres a la hora de Comer (PMAS, por sus siglas en inglés) sobre su comportamiento a la hora de comida, es decir, si utiliza algunas de las siguientes actitudes: insistencia en comer, límite de refrigerios, persuasión positiva, uso de recompensas, etc. También, se aplicará el cuestionario histórico dietético (DHQIII, por sus siglas en inglés) a los padres de familia para recabar información sobre su alimentación.

- Se le realizarán mediciones antropométricas con un estadímetro (talla), cinta métrica (circunferencias de cintura y cadera) y equipo de impedancia eléctrica (para medir peso, %grasa, %agua corporal, masa muscular, complejión física, masa ósea, edad metabólica, Índice de Masa Corporal, %grasa y masa muscular de brazos, piernas y tronco); procedimientos que no comprometen su estado de salud y que ayudarán a entender mejor su estado antropométrico con fines de investigación.
- Proporcionarán una muestra de sangre periférica (15 mL), distribuida en dos tubos (uno para obtener suero y otro tubo para obtener un paquete celular para obtención de DNA genómico y plasma) y una muestra de heces mediante en un frasco estéril para la obtención de DNA bacteriano. Dichas muestras serán utilizadas solo con fines de investigación para formar un banco de sueros/plasma y DNA genómico y bacteriano de pacientes; el cual será utilizado para determinar niveles séricos de glucosa, lípidos y la identificación de bacterias. Así mismo, el banco antes mencionado será utilizado en este proyecto de investigación, realizado en el **“Laboratorio de Neurociencias del Centro de investigación Aplicada a la Salud Pública (CIASaP) de la Facultad de Medicina y el Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Sinaloa”**. El banco será almacenado en el laboratorio **“Laboratorio de Neurociencias”**. Esto no representa un riesgo adicional para su salud. En el futuro, este estudio podría ayudar a identificar posibles terapias de intervención para prevenir o mejorar la calidad de vida de pacientes con **“síndrome de Down”**.

**Beneficios:** Con su participación en esta investigación se le proporcionarán resultados del análisis antropométrico y de química sanguínea. Así mismo, contribuirá con los investigadores responsables en la generación de conocimiento en la búsqueda de biomarcadores para el pronóstico, diagnóstico y posible tratamiento de las patologías antes mencionadas.

**Confidencialidad:** Toda la información que proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

**Riesgos Potenciales/Compensación:** Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. Si alguna de las preguntas le hiciera sentir un poco incómodo(a), tiene el derecho de no responderla. En la toma de muestra de sangre, puede haber un riesgo mínimo como un pequeño moretón y/o pequeño dolor en el momento de la toma. Se le hace notificar que el material que se utilizará es nuevo y desechable. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para usted.

**Participación Voluntaria/Retiro:** La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su

participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera la forma en cómo le tratan al acudir a su atención médica.

**Números a Contactar:** Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con el/la investigador/a responsable del proyecto: “Dra. Carla E. Angulo Rojo”, al siguiente número de teléfono “6677 188 8145”. Si usted acepta participar en el estudio, le pedimos sea tan amable de firmar el consentimiento informado.

### **CONSENTIMIENTO PARA SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO**

Su firma indica su aceptación para participar voluntariamente en el presente estudio.

<p><b><u>Nombre del participante:</u></b></p> <p>_____</p> <p>No. Registro: _____ Fecha: ____/____/____</p> <p>Firma*: _____</p> <p><b>*En caso de incapacidad para firmar, firma del tutor o familiar.</b></p>
<p><b><u>Nombre Completo del Testigo:</u></b></p> <p>_____</p> <p>Dirección _____</p> <p>Fecha: ____/____/____ Relación con el participante _____</p> <p>Firma: _____</p>
<p><b><u>Nombre de la persona que obtiene el consentimiento:</u></b></p> <p>_____</p> <p>Fecha: ____/____/____ Relación con el participante _____</p> <p>Firma: _____</p>

## XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

AB:  $\beta$ - amiloide

ABCA1: Isoforma A1 del transportador dependiente de ATP

APOE: Apolipoproteína E

BBB: Barrera hematoencefálica

C.Cadera: Circunferencia de cadera

C.Cintura: Circunferencia de cintura

C.Total: Colesterol total

CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

c-HDL: Colesterol HDL

c-LDL: Colesterol LDL

CT: Controles

c-VLDL: Colesterol VLDL

E2/ $\epsilon$ 2: Épsilon 2

E3/ $\epsilon$ 3: Épsilon 3

E4/ $\epsilon$ 4: Épsilon 4

HbA1c: Hemoglobina glicada

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HSA21: Cromosoma 21

ICC: Índice Cintura Cadera

IMC: índice de Masa Corporal

INP: Instituto Nacional de Pediatría

ISAK: Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad

MI: Meiosis I

MII: Meiosis II

miR-33: microRNA 33

miRNA: microRNA

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SD: Síndrome de Down

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

TG: Triglicéridos

TREM2: receptor desencadenante expresado en células mieloides

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad