



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
SINALOA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA
MOLECULAR**

**“MODELO PREDICTIVO DEL ESTADO DE METILACIÓN EN EL
PROMOTOR DE MIR-21 ASOCIADO A VÍAS PROINFLAMATORIAS
EN ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES EN
SÍNDROME DE DOWN”**

TESIS

QUE PRESENTA

**L.N. JESÚS FRANCISCO GERMAN VALENZUELA
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

DIRECTORES

**DR. JAVIER ABEDNEGO MAGAÑA GÓMEZ
DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO**

ASESORES

**DRA. VERÓNICA JUDITH PICOS CÁRDENAS
DRA. MARÍA ELENA BÁEZ FLORES
DR. LEONEL ARMAS LÓPEZ**

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A ENERO DE 2025.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



U N I V E R S I D A D A U T Ó N O M A D E S I N A L O A

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



Este trabajo fue realizado en los laboratorios del Centro de Investigación Aplicada a la Salud Pública de la Facultad de Medicina y el Laboratorio de Investigación I de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa, así como también en el Laboratorio del Departamento de Biomedicina Molecular e Investigación Traslacional del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y el Laboratorio de Enfermedades Pulmonares y Epigenómica del Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Javier Abednego Magaña Gómez y la Dra. Blanca Ortiz Quintero. Contó con la asesoría de la Dra. Verónica Judith Picos Cárdenas, la Dra. María Elena Báez Flores y el Dr. Leonel Armas López.

Agradecimientos

Este trabajo se lo dedico a mi mamá y hermanas que siempre me han apoyado, son lo más importante para mí y sé que estarán ahí en cada paso que tome en mi vida.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio en la Universidad Autónoma de Sinaloa por su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos, son el corazón de este equipo, demuestran lo valioso que es trabajar en equipo.

Al Dr. Javier Magaña gracias por ser mi ejemplo a seguir, ha sido un completo honor y privilegio ser su estudiante. A la Dra. Blanca Ortiz, gracias por confiar en mí y por su apoyo desde el inicio. A la Dra. Carla Angulo y Dra. Alma Guadrón, muchas gracias por la oportunidad y permitirme pertenecer al mejor equipo de la universidad, siempre promulgaré cada una de sus enseñanzas en cualquier lugar en el que me encuentre.

A M.C. Israel Martínez y al Dr. Antonio Serrato gracias por recibirme con los brazos abiertos y permitirme ser uno más del equipo al trabajar con ustedes.

Le agradezco a CONAHCYT el apoyo otorgado durante la maestría, gracias a la Universidad Autónoma de Sinaloa, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM y al laboratorio de secuenciación genómica del Instituto de biología UNAM, por todo el apoyo otorgado a lo largo de este proyecto.

ÍNDICE

I. RESUMEN	11
ABSTRACT	13
II. ANTECEDENTES	15
A. SÍNDROME DE DOWN	15
2.1. Epidemiología	15
2.2. Factores de riesgo	16
2.3. Diagnóstico	17
2.4. Fenotipo del síndrome de Down	18
B. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS	19
2.6. Metilación.....	19
1) Enzimas participantes en la metilación del DNA	21
2.7 Mecanismos de desmetilación	23
1) Desmetilación activa	23
2) Desmetilación pasiva	24
2.8 Modificaciones de histonas.....	25
1) Metilación de histonas.....	25
2) Acetilación de histonas.....	25
2.9 Mecanismos epigenéticos en síndrome de Down.....	26
C. MIRNAS	26
D. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	28
2.11 Tipos de Enfermedad Inflamatoria Intestinal.....	28
2.12 Diagnóstico	28
2.13 Patogénesis	29

E. ENFERMEDAD CELIACA	30
2.16 Características clínicas	31
2.17 Diagnóstico	31
2.18 Patogénesis	32
1) Factores genéticos	32
F. SÍNDROME DE DOWN Y ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES.....	32
G. MiRNAs Y ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES	33
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
IV. JUSTIFICACIÓN.....	36
V. HIPÓTESIS.....	37
VI. OBJETIVOS.....	38
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
A. DISEÑO DEL ESTUDIO	39
B. POBLACIÓN DE ESTUDIO	39
7.1. Selección de la población	39
1) Criterios de inclusión	39
2) Criterios de Eliminación.....	39
C. SELECCIÓN DE MIRNA	40
7.2 Creación del código en R.....	40
D. ANÁLISIS DEL PERFIL DE METILACIÓN.....	41
7.3. Extracción de DNA.....	41
7.4 Conversión de DNA con bisulfito	42
7.5 PCR en tiempo real.....	43
7.6. Purificación de amplificadores de PCR	44

7.7 Secuenciación Sanger	44
7.8 Análisis de cuantificación de metilación en sitios CpG	45
7.9. Modelo de regresión logística	45
VIII. RESULTADOS	47
A. SELECCIÓN DE MIRNA	49
8.1. Selección de repositorios de epigenoma	50
8.2. Análisis de sitios CpG en miRNAs	52
B. DISEÑO DE PRIMER	52
C. RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN	53
8.3 Análisis de metilación a las secuencias de DNA.....	55
D. MODELO DE REGRESIÓN LOGISTICA BINARIA	56
8.4 Coeficientes del modelo	59
8.5 Test de razón de verosimilitud	60
8.6 Predicciones y rendimiento del modelo.....	61
IX DISCUSIÓN	66
X CONCLUSIONES	69
XI BIBLIOGRAFÍA	70
Abreviaturas	77

Índice figuras

Figura 1. Metilación de DNA.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Estructuras de los dominios conservados de la familia de enzimas DNA metiltransferasas.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Mecanismos de desmetilación de DNA.....	24
Figura 5. Flujo del trabajo experimental con las muestras del estudio	47
Figura 6. Análisis en red de miRNAs relacionados a enfermedad de Crohn, Colitis ulcerativa y enfermedad Celiaca	50
Figura 7. Sitios CpG en miRNAs	52
Figura 8. Diseño de los oligonucleótidos de miR-21.....	53
Figura 9. Electroferograma de secuencia del grupo control	54
Figura 10. Electroferograma de secuencia del grupo síndrome de Down	55
Figura 11. Porcentaje de metilación de cada sitio CpG en el promotor de miR-21	56
Figura 12. Determinación de número optimo de clústeres .	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Clústeres de síntomas gastrointestinales	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Curva ROC del modelo 1	64
Figura 14. Probabilidades de presentar los síntomas del clúster 1 según los sitios CpG no metilados.....	65

Índice tablas

Tabla 1. Especificaciones de los oligonucleótidos de miR-21	43
Tabla 2. Características antropométricas	48
Tabla 3. Características bioquímicas	49
Tabla 4- Repositorios de epigenoma seleccionados para el análisis de sitios CpG	51
Tabla 5. Clúster según signos y síntomas gastrointestinales en personas con síndrome de Down	59
Tabla 7. Test de razón de verosimilitud.....	61
Tabla 8. Métricas del rendimiento del modelo de regresión logística binaria ..	62
Tabla 9. Matriz de confusión	63

I. RESUMEN

Introducción: El síndrome de Down (SD) es un trastorno cromosómico ocasionado por tener una copia extra total o parcial del cromosoma 21 (HSA21) y caracteriza por manifestaciones clínicas como hipotonía, baja estatura, braquicefalia, lengua protuberante, orejas pequeñas, manos cortas y discapacidad intelectual. También puede cursar con susceptibilidad a comorbilidades como trastornos neurodegenerativos y del sistema inmunitario, defectos cardíacos congénitos y trastornos gastrointestinales. La compensación de dosis génica otorga esta susceptibilidad a través de los genes del HSA21 que lleva a alteraciones en el genoma y en el epigenoma como el mecanismo de metilación del DNA. La metilación comienza con una citosina en el extremo 5', por DNA metiltransferasas (DNMT) para formar 5-metilcitosina (5-mC), este mecanismo está ligado a la regulación de expresión génica mediante la metilación de zonas reguladoras como la región promotora del gen, lo que inhibe la transcripción de genes y moléculas como el RNA no codificante. Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes de alrededor de 20-30 nucleótidos, que silencian genes uniéndose al mRNA y provocando su hidrólisis. **Objetivo general:** Establecer un modelo predictivo de datos epigenómicos de la metilación de miR-21 que influyen sobre los síntomas asociados a procesos inflamatorios en enfermedades gastrointestinales en síndrome de Down. **Materiales y métodos:** Se estudiaron a 30 personas con SD y 30 personas euploides, se le tomaron muestras sanguíneas para realizar análisis clínicos como perfil bioquímico. Además, se analizó el perfil de metilación del promotor de VMP1 (miR-21) mediante secuenciación Sanger a partir de amplificadores de PCR. Con el conjunto de variables se realizó un modelo de regresión logística para predecir la presencia o ausencia de síntomas o padecimientos gastrointestinales asociado a enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y enfermedad celíaca (CeD). **Resultados:** Se secuenciaron 192 pb del promotor de VMP1 cuyo gen codifica a miR-21 y se cuantificó su metilación, observando diferencia estadística en la metilación del sitio CpG cg23838308.

El modelo de regresión logística tuvo una precisión del 0.72 (IC 95% 0.49-0.89) mediante la variable de sitios CpG no metilados del grupo SD para predecir la presencia o ausencia de los síntomas y padecimientos del clúster 1. **Conclusiones:** A partir del modelo se observó que a más sitios CpG no metilados en la región del promotor de VMP1 (miR-21), más probabilidades se tienen de presentar alguno de los síntomas o padecimientos del clúster 1. Es necesario realizar otros estudios con mayor número de muestras para realizar modelos con mayor robustez que expliquen mejor los síntomas relacionados a EII y CeD que afectan a las personas con SD.

Palabras clave: síndrome de Down, metilación, miR-21, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad celiaca

ABSTRACT

Introduction: Down syndrome (DS) is a chromosomal disorder caused by having an extra whole or partial copy of chromosome 21 (HSA21) and is characterised by clinical manifestations such as hypotonia, short stature, brachycephaly, protruding tongue, small ears, short hands and intellectual disability. It can also present with susceptibility to comorbidities such as neurodegenerative and immune system disorders, congenital heart defects and gastrointestinal disorders. Gene dosage compensation confers this susceptibility through the HSA21 genes, leading to alterations in the genome and epigenome, such as the DNA methylation mechanism. Methylation starts with a cytosine at the 5' end, by DNA methyltransferases (DNMT) to form 5-methylcytosine (5-mC), this mechanism is linked to the regulation of gene expression by methylation of regulatory areas such as the promoter region of the gene, which inhibits the transcription of genes and molecules such as non-coding RNA. miRNAs are small non-coding RNAs of around 20-30 nucleotides; their main action is to act downstream of transcription by silencing genes by recognizing target sequences in the mRNA. It is important to establish a statistical model predictive of clinical and biochemical factors that influence gene methylation of miRNAs associated with gastrointestinal diseases in DS. **General objective:** To establish a predictive model of epigenomic data of miR-21 methylation that influences symptoms associated with inflammatory processes in gastrointestinal diseases in Down syndrome. **Materials and methods:** We studied individuals with DS and euploids, taking blood samples for clinical analysis and biochemical profile. In addition, the methylation profile of the VMP1 promoter (miR-21) was analysed by Sanger sequencing from PCR amplifications, with which a logistic regression model was performed to predict the presence or absence of gastrointestinal symptoms or conditions associated with inflammatory bowel disease (IBD) and celiac disease (CeD).

Results: 192 bp of the VMP1 promoter was sequenced, the gene encoding miR-21, methylation quantification analysis showed a statistical difference in the methylation of the CpG site cg23838308308, and a logistic regression model was performed with an accuracy of 0.72 (95% CI 0.49-0.89) using the variable of unmethylated CpG sites in the SD group to predict the presence or absence of symptoms and conditions in cluster 1. **Conclusions:** From the model it can be observed that the more unmethylated CpG sites present in the VMP1 promoter region (miR-21), the more likely one is to present any of the symptoms or conditions of cluster 1. Further studies with larger numbers of samples are needed to perform models with greater robustness to better explain the IBD and CeD-related symptoms affecting people with DS.

Keywords: *Down syndrome, methylation, miR-21, inflammatory bowel disease, celiac disease.*

II. ANTECEDENTES

A. SÍNDROME DE DOWN

El síndrome de Down (SD) es un trastorno genético ocasionado por una trisomía del HSA21. Debe su nombre al médico británico John Langdon Haydon Down quien, en 1866, mientras trabajaba en el Asilo Real de Earlswood con pacientes que atendía con discapacidad mental, estableció una clasificación con características fenotípicas en la cual incluía a las personas con SD. En los años 60's se describieron cuatro posibles alternativas de nombre para este trastorno, siendo síndrome de Down el término avalado por la Organización Mundial de la Salud (Díaz-Hernández y col., 2020).

El SD es un trastorno cromosómico en el que se tiene una copia total o parcial del HSA21, y cursa con hipotonía, baja estatura, braquicefalia, lengua protuberante, orejas pequeñas, manos cortas y discapacidad intelectual, entre otras. La trisomía 21 completa es la etiología más común ya que se presenta en el 95% de los pacientes con SD, el 3% tiene presencia parcial del HSA21 y solamente el 2% de los casos es por mosaicismo, mecanismos en el que solo algunas células presentan trisomía 21 (Díaz-Hernández y col., 2020).

2.1. Epidemiología

La incidencia mundial de SD se sitúa en 1 de cada 1,000 recién nacidos (Chen y col., 2022). En Europa se estima 4.9 de cada 10,000 recién nacidos, mientras que en Estados Unidos en 2013 se reportó 6.7 de cada 10,000 recién nacidos (Antonarakis y col., 2020). En México, de acuerdo a la Secretaría de Salud (2020) las cifras son aproximadamente 1 de cada 691 recién nacidos, en el año 2018 nacieron 689 personas con SD (351 niñas y 338 niños).

La esperanza de vida en los pacientes con SD no superaba los 10 años a principios del siglo XX, a mediados del siglo esta cifra aumentó hasta 26 años llegando hasta el día de hoy a los 50 años aproximadamente. Esto se debe a los avances científicos y tecnológicos de los últimos 50 años que permiten un trabajo médico y de especialistas a edades tempranas que favorece la calidad de vida en las personas con SD mediante una vigilancia del desarrollo físico y mental (Coppedè, 2016).

2.2. Factores de riesgo

En el SD el principal factor de riesgo para que ocurra es la edad de la madre, tal como sucede en todas las trisomías autosómicas; después de los 35 años aumenta el riesgo de que el neonato tenga trisomía 21 y a medida que el embarazo sea a mayor edad, el riesgo será proporcionalmente mayor. Esto se da debido a errores en la ovogénesis en la primera división meiótica materna por la no disyunción del par homólogo (Coppedè, 2016).

Existen otras hipótesis que intentan describir los mecanismos moleculares de los errores en la meiosis relacionados a la edad materna, una de éstas apunta a errores en la recombinación durante la profase meiótica. Mientras que otra menciona que el evento podría estar relacionado a las divisiones meióticas debido a una disminución de hormonas en los puntos de control del ciclo celular relacionadas con la edad materna (Coppedè, 2016).

Algunos factores ambientales que pueden influir en el desarrollo de la trisomía 21 son el consumo de tabaco, uso de anticonceptivos orales, sobrepeso u obesidad de la madre durante el embarazo, así como la suplementación ineficiente de ácido fólico, dependiendo del tiempo de exposición a cada uno de ellos (Antonarakis y col., 2020). Los folatos provenientes de la dieta pertenecen a las vitaminas del complejo B, el cual es necesario suplementar durante el embarazo (Coppedè, 2016). Estos actúan como donadores y receptores de átomos de carbono para la síntesis de ácidos nucleicos y S-adenosilmetionina (SAM) que actúa como agente donador de grupos metilo intracelular (Coppedè, 2016).

Los que provienen de la dieta son absorbidos a nivel intestinal para posteriormente ser reducidos y metilados a metiltetrahidrofolato (5-MTHF); en el interior de la célula el 5-MTHF actúa como donador de grupos metilo para la metilación de homocisteína, catalizada por el complejo metionina sintasa y metionina reductasa; esa reacción produce metionina y tetrahidrofolato (THF) (Coppedè, 2016).

A diferencia de los factores de riesgo que se relacionan a la madre, los que se relacionan con el padre no están descritos, aunque se menciona que la edad de éste puede incrementar el riesgo de trisomía 21 o alguna otra aneuploidía. Sin embargo, los mecanismos moleculares aún están bajo discusión. La mayoría de estos errores en el ciclo celular podrían estar en la meiosis II a diferencia del lado materno que se encuentran en la meiosis I de los ovocitos (Coppedè, 2016).

Los errores de disyunción durante la formación de las células germinales son más comunes del lado de los ovocitos que de los espermatozoides. En la meiosis I representa un 65 % del lado materno en contra de un 3% del lado paterno mientras que en la meiosis II es el 23% del lado materno frente a un 5%. Los errores en la mitosis solo representan el 3% de los casos (Karmiloff-Smith y col., 2016).

2.3. Diagnóstico

Los exámenes prenatales de laboratorio forman parte del cuidado gestacional, para identificar aquellos embarazos de alto riesgo (Antonarakis y col., 2020). Los avances de la biología molecular, así como del área de la citogenética, han permitido desarrollar técnicas que han facilitado el diagnóstico de SD (Díaz-Hernández y col., 2020). Hasta el día de hoy el estándar de oro para el diagnóstico es el cariotipo. También existen otros análisis como hibridación fluorescente *in situ*, ensayo de hibridación múltiple con sondas, amplificación y cuantificación de secuencia paróloga y secuenciación de nueva generación (Díaz-Hernández y col., 2020).

El cariotipo o también llamado análisis citogenético corresponde al estudio de los cromosomas presentes en el núcleo de las células. Adicionalmente, existen cuatro técnicas de bandeo que permiten visualizar los cromosomas y a sus regiones, bandeo Q, R, C y G. Para obtener las bandas G que son las más utilizadas, se emplea tripsina que desnaturaliza proteínas asociadas a los cromosomas para posteriormente teñirse con Giemsa, lo que produce un patrón característico para cada cromosoma. Esta tinción permite la identificación de cada cromosoma y el análisis de su estructura (Ortega Torres y col ., 2019).

2.4. Fenotipo del síndrome de Down

Las manifestaciones clínicas del SD incluyen deficiencias en el desarrollo psicomotor y otras características físicas. Los signos en los recién nacidos incluyen orejas pequeñas, braquicefalia, puente nasal plano, cuello corto, manos grandes, hipotonía e hiperflexibilidad (Coppedè, 2016). Los defectos congénitos cardíacos, problemas oftalmológicos y pérdida de la audición, se recomienda que sean detectados después del nacimiento (Coppedè, 2016).

Existe una sobreexpresión de los genes en el HSA21 derivado de su triplicación, lo que produce múltiples complicaciones a nivel estructural y funcional en distintos sistemas. Entre éstos se encuentran los desórdenes estructurales y funcionales en el sistema nervioso central (SNC) que engloba al deterioro cognitivo y discapacidad intelectual, disfunción del sistema músculo esquelético, comorbilidades en el sistema digestivo, así como desórdenes metabólicos y disrupción endocrina del eje hipotálamo-hipófisis y glándula tiroides (Mazurek & Wyka, 2015).

La discapacidad intelectual en el SD exhibe un patrón específico donde las habilidades no verbales parecen desarrollarse normalmente mientras que las lingüísticas no (Santoro y col., 2021). La enfermedad de Alzheimer (EA) es una comorbilidad presente en SD con un rango de incidencia 94 veces más con respecto a personas euploides y una aparición de síntomas alrededor de los 55 años, siendo los más notables las deficiencias en las funciones cognitivas, cambios de personalidad y una pérdida de funciones previamente existentes (Santoro y col., 2021).

En las personas con SD es común encontrar comorbilidades relacionadas a la glándula tiroides como el hipotiroidismo, con una incidencia alrededor de 1:113 y 1:141 recién nacidos. Gran parte de los casos reportados se deben a hipoplasia tiroidea, mientras que otras causas como ectopia tiroidea son poco frecuentes; sin embargo, en la mayoría de casos no existe anormalidad ecográfica (Amr, 2018).

De acuerdo a un estudio del año 2011, se realizaron 361 encuestas entre padres con un hijo con SD de hasta 25 años de edad, para conocer los costos anuales de atención médica para personas con SD. Los resultados mostraron un gasto promedio de \$4,287 dólares americanos (USD) anuales, con un adicional de \$1,428 USD para atención medica hospitalaria. En infantes de 0-4 años con SD, el gasto médico fue de 4.2 veces mayor al de la media australiana de infantes con ese rango de edad, mientras que en el grupo de edad de 5-14 el gasto médico anual fue 3.8 veces mayor al de la media del mismo rango de edad (Geelhoed y col., 2011).

B. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS

La epigenética es un campo de estudio que envuelve a todos los cambios hereditarios o de expresión de genes pero que no involucran alteraciones en la secuencia del DNA (Tammen y col., 2013). Dichos cambios son responsables de los patrones de expresión génica presentes en tejidos y células estrechamente regulados (Tammen y col., 2013). Las modificaciones de histonas y los patrones de metilación son los mecanismos epigenéticos predominantes, encargados de activar o inactivar genes que regulan el crecimiento celular, proliferación y apoptosis, ligándolas a diversas enfermedades como cáncer, asma y defectos congénitos (Xu & Du, 2010).

2.6. Metilación

La metilación del DNA es la marca epigenética más estudiada. Comienza con la metilación de la posición 5' de una citosina en el genoma, llevada a cabo por las enzimas pertenecientes a la familia de las DNA metiltransferasas (DNMT) para formar 5-metilcitosina (5-mC) (Figura 1). La 5-mC está presente aproximadamente en un 4-5% de las bases de citosina dentro del genoma humano, de acuerdo al tipo de célula (Tammen y col., 2013).

La metilación del DNA se encarga de regular la expresión génica, reclutando las proteínas necesarias para el silenciamiento de genes u obstruyendo la interacción entre el DNA y los factores de transcripción en la región promotora de los genes. También está implicada en la impronta genómica, en la inactivación del cromosoma X, splicing alternativo y la regulación de la expresión génica de tejidos específicos (la Torre y col., 2023).

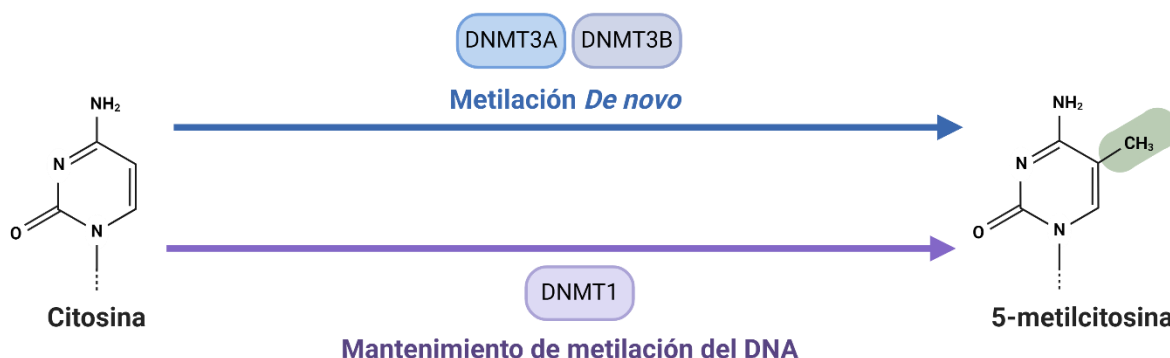


Figura 1. Mecanismos de metilación del DNA. Las enzimas DNMT3A y DNMT3B corresponden al mecanismo de metilación *De novo* (línea azul), mientras que la enzima DNMT1 se encarga del mantenimiento de la metilación del DNA (línea morada). El área verde señala en 5-metilcitosina el grupo metilo en el carbono 5.

En el genoma humano existen 30 millones de dinucleótidos C+G, cuyas repeticiones se denominan islas CpG, estando presentes en estado metilado y no metilado. Su metilación en las regiones promotoras de los genes está asociada a la inhibición de la transcripción; además, el estado de metilación de regiones intragénicas también es importante en la regulación de la transcripción (Tammen y col., 2013).

1) Enzimas participantes en la metilación del DNA

Todas las DNMT usan mecanismos catalíticos similares para metilar las bases de citosina del DNA. El genoma humano codifica cinco isoformas de DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L; las enzimas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B se encargan de catalizar la adición del grupo metilo en el DNA (Figura 2), en contraste con las otras isoformas de la enzima que no poseen actividad catalítica de DNMT (Lyko, 2018).

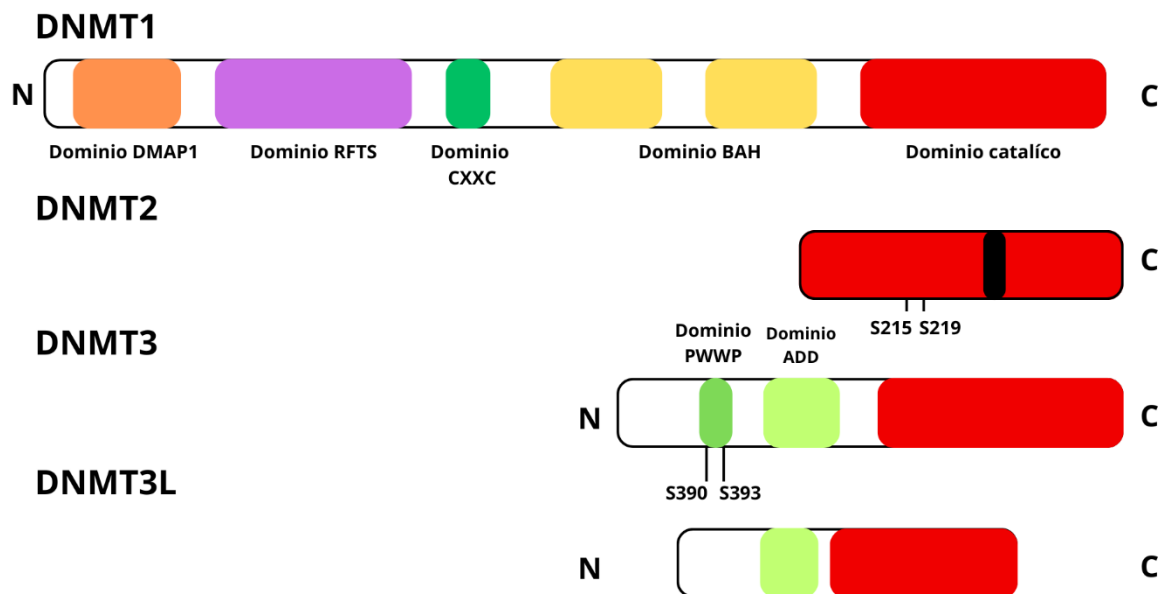


Figura 2. Estructuras de los dominios conservados de la familia de enzimas DNA metiltransferasas. Los dominios conservados de la familia de DNMT comparten el dominio catalítico (rojo), el pequeño subdominio de DNMT2 (negro) el cual es un residuo de cisteína (C292) altamente conservado. Las posiciones de residuos de aminoácidos en cada enzima representa los sitios de modificaciones postraduccionales identificados, la enzima DNMT3L es la variante de DNMT3 que es catalíticamente inactiva debido a la ausencia de región N-terminal incluyendo el dominio PWWP y el dominio C-catalítico (prolina y triptófano) (Lyko, 2018).

Las enzimas DNMT tienen un dominio N-terminal regulador y un dominio C-terminal catalítico, a excepción de la DNMT2 que solo consta de un dominio catalítico. El dominio N-terminal de DNMT1 contiene subdominios pequeños conservados que son mediados por interacciones como DNMT1- asociado a proteína 1 (DNMT1-AP1) el cual es importante para la interacción con el represor transcripcional DNMT1 (Lyko, 2018).

La secuencia objetivo de sitios de replicación (RFTS, por sus siglas en inglés) es necesaria para dirigir a DNMT1 al sitio de replicación y para la replicación dependiente del mantenimiento de la metilación del DNA, el dominio CXXC es un dominio conservado de dedo de zinc el cual une DNA no metilado (Lyko, 2018).

La isoforma de DNMT3L localizada en el HSA21 puede unirse y estimular la actividad de DNMT3A/3B, el cual ha sido implicado en la regulación de la expresión de genes relacionados con gliogénesis, neurogénesis y la plasticidad sináptica. La expresión de DNMT3L en el cerebro tiene un patrón opuesto a DNMT3A/3B, con una baja expresión en los neonatos incrementando con la edad, por lo que la copia extra de este gen causa cambios epigenéticos que lleva a las modificaciones de genes relevantes en fenotipo neural del SD a través de vías dependientes y no dependientes de metilación.(Qin y col., 2021; Lu y col., 2016)

Para formar 5-mC en el RNA es necesario un grupo de enzimas llamadas RNA metiltransferasas, similar a las DNMTs que metilan las citosinas en las moléculas de DNA (Kuznetsova y col., 2019). La función biológica de la metilación en 5-mC en el RNA ha sido relacionada con distintos procesos celulares como la regulación de la transcripción de genes y la regulación de exportación nuclear. Tanto DNA como RNA metiltransferasas emplean un mecanismo dependiente de SAM para transferir un grupo metilo, aunque para la catálisis usan diferentes sitios activos para los residuos de cisteína (Yang y col., 2020).

El mecanismo de catálisis de las RNA metiltransferasas comienza cuando la enzima forma un enlace covalente con el átomo C6 citosina, lo cual aumenta la especificidad con el átomo C5 de la citosina, lo que contribuye a la interacción con el grupo metilo de SAM que funciona como cofactor donando el grupo metilo formando un intermediario transitorio; en el siguiente paso la reacción de beta eliminación resulta en la deprotonación de C5 en el intermediario recuperando el doble enlace de C5-C6 formando 5-mC (Kuznetsova y col., 2019).

2.7 Mecanismos de desmetilación

La desmetilación del DNA es caracterizada por ser activa y pasiva, la pasiva ocurre cuando el mantenimiento de la metilación falla ya sea por la inhibición o depleción de DNMT1, la desmetilación activa requiere de procesos enzimáticos en el que 5mC se revierte a una citosina libre (Yano & Fedulov, 2023; Moore y col., 2013).

1) Desmetilación activa

La desmetilación activa está implicada en una amplia variedad de procesos biológicos, este mecanismo involucra el removimiento enzimático de grupos metilo de 5mC, mediado por conversiones intermediarias con un paso final que involucra la participación de la enzima de reparación por escisión de bases (BER). En el primer paso de la desmetilación activa del DNA la 5mC es convertida a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), seguido por dos pasos de oxidación para formar 5-formylcitosina (5fC) y finalmente 5-carboxylcitosina (5caC) (Figura 4) (Yano & Fedulov, 2023).

Los intermediarios 5fC y 5caC pueden generar citosina desmetilada convirtiéndose en sitio objetivo del mecanismo BER, las primeras reacciones de oxidación son catalizadas por la familia de enzimas proteína de translocación diez-once (TET), mientras las últimas dos reacciones son catalizadas por timina DNA glicosilasa (TDG). (Yano & Fedulov, 2023)

2) Desmetilación pasiva

Este mecanismo ocurre en la división celular, la DNMT1 se encarga del mantenimiento de la metilación del DNA durante la replicación del mismo, por lo que la inhibición o disfunción de esta enzima permite que las citosinas que se agreguen en la nueva hebra de DNA permanezcan sin grupos metilos en los sitios donde previamente estaban citosinas metiladas (Figura 4) (Moore y col., 2013).

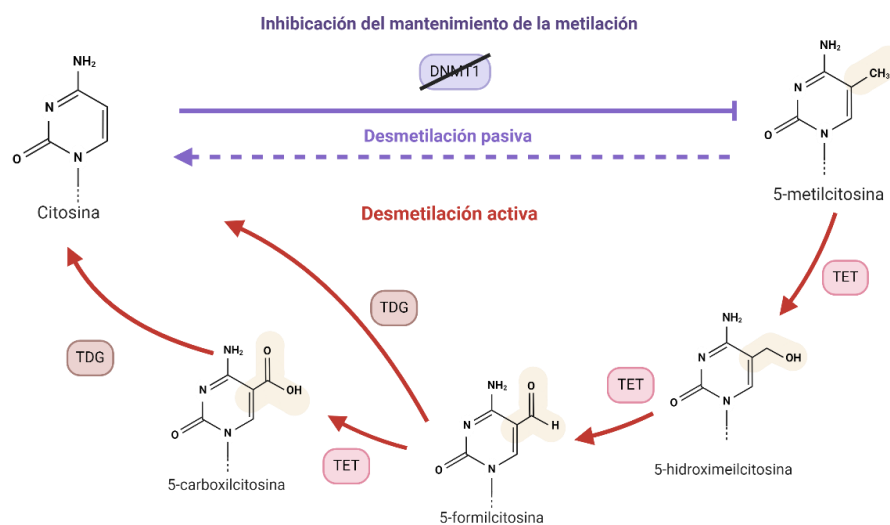


Figura 4. Mecanismos de desmetilación de DNA.

El mantenimiento de metilación o desmetilación pasiva consiste de la inhibición de DNMT1 para dejar las nuevas cadenas de DNA sin citosinas metiladas (línea morada). La desmetilación activa (líneas rojas) consta de pasos de oxidación mediados por enzimas TET y finalmente la eliminación de la 5-caC mediante TDG.

2.8 Modificaciones de histonas

Otro mecanismo epigenético de regulación de la expresión génica es el código de histonas el cual involucra modificaciones postraduccionales que incluyen metilación, acetilación, fosforilación, ribosilación, ubiquitinación y sumoilación. Debido a que son reversibles y a la presencia de diversas isoformas, permiten el ajuste espacial de la cromatina que influyen en la interacción del DNA con RNA polimerasa II y factores de transcripción. (la Torre y col., 2023; Bure y col., 2022)

1) Metilación de histonas

La metilación de histonas tiene una doble función en la regulación de la expresión génica, ya sea activando o silenciando la transcripción dependiendo del número de grupos metilo que se unan y el residuo de aminoácido específico que este involucrando. Las enzimas de histonas metiltransferasas (HMTs) son las encargadas de metilar los residuos de lisina y arginina, los residuos de lisina pueden ser mono-, di- y trimetilado, por otro lado, los residuos de arginina pueden ser monometilados o dimetilados de forma simétrica o asimétrica (la Torre y col., 2023).

La metilación de histonas es un proceso reversible debido al descubrimiento de dos familias de histonas desmetilasas específicas a lisina, (LSD) y Jumonji C desmetilasas (JMJC), para llevar a cabo este mecanismo LSD requiere del uso de flavin adenina dinucleótido (FAD) dependiente de una reacción de oxidación del grupo amino, mientras que la familia de JMJC usan una reacción de oxido-reducción dependiente de un Fe (II) y α -cetoglutarato. (la Torre y col., 2023)

2) Acetilación de histonas

Paralelo a la metilación de histonas, la acetilación de histonas es llevado a cabo por dos clases de enzimas histona aciltransferasa (HAT) e histona deacetilasa (HDAC), las cuales se encargan de transferir un grupo acetilo de la molécula Acetil-CoA a los residuos de lisina en histonas, mientras que la deacetilación de histonas es una reacción encargada de dos clases de deacetilasas, la primera es dependiente de zinc y la segunda corresponde a una familia de enzimas dependientes de NAD^+ denominadas sirtuinas (Johnson y col., 2015).

2.9 Mecanismos epigenéticos en síndrome de Down

En promedio el número de transcripciones de genes ubicados en cromosomas con trisomía aumenta 1.5 veces, lo que ha llevado al planteamiento de hipótesis para describir la manera en las que las comorbilidades asociadas al SD se relacionan con la sobreexpresión de genes presentes en una región del brazo largo del HSA21 denominada región crítica del síndrome de Down (DSCR, por sus siglas en inglés). Una de ellas aborda el efecto de compensación de dosis de genes del HSA21 que afecta tanto a los genes en HSA21 como a los del resto del genoma. (Krivega y col., 2022; Antonarakis y col., 2020).

Uno de los mecanismos que lleva a los cambios epigenéticos observados en SD podría estar centrado en DNMT3L cuyo loci se localiza en HSA21 y su función está ligada a la metilación del DNA mediante el reclutamiento de DNMT1/3, por lo que la variabilidad de fenotipos y la gravedad de las comorbilidades en las personas con SD puede deberse a los cambios en el epigenoma, así mismo la metilación del DNA podría estar relacionada con los desequilibrios en la dosis génica (Sailani y col., 2015).

A través la secuenciación con bisulfito de todo el genoma o mediante la representación reducida de algunos loci, múltiples estudios muestran cambios en la metilación del DNA en SD comparado con personas euploides, ya sea hipermetilación o hipometilación. Estos hallazgos han sido en leucocitos, células epiteliales bucales y muestras de vellosidades placentarias. Los cambios de metilación varían según sea el tipo de células analizadas, la etapa de la vida en la que sea tomada la muestra o el grupo de genes a los que se mide el perfil de metilación (Lu y col., 2016).

C. MIRNAS

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes de alrededor de 20-30 nucleótidos, que actúan después de la transcripción silenciando genes mediante el reconocimiento de secuencias objetivo en el mRNA. Pueden inhibir la transcripción uniéndose al extremo 3' UTR formando una doble cadena que es degradada mediante la formación del complejo de silenciamiento inducido (RISC, por sus siglas en inglés) (Tammen y col., 2013).

La biogénesis de miRNAs ocurre a través de dos vías principales, una canónica y otra no canónica (Shang y col., 2023). La vía canónica es llevada a cabo por dos enzimas RNasas III, DROSHA y DICER, las cuales actúan de manera subsecuente en el núcleo y en el citoplasma (Michlewski & Cáceres, 2019). El procesamiento de miRNAs en el núcleo es tanto en los miRNAs transcritos independientes como en los provenientes de intrones, por el complejo de microprocesador integrado por RNasa tipo III DROSHA, la proteína de unión a la doble cadena de RNA (RBP), la región crítica 8 del gen de síndrome de Di George (DGCR8) y proteínas asociadas. Esto produce los precursores en forma de lazo de 70 nucleótidos llamados pre-miRNAs, los cuales son exportados al citoplasma utilizando exportina-5 (Michlewski & Cáceres, 2019). Una vez en el citoplasma, en la última fase los pre-miRNAs son catalizados por el complejo de RNasa tipo III DICER con la proteína chaperona Hsp90 para dar como resultado un miRNA de doble cadena. El miRNA de doble cadena es incorporado al complejo RISC en conjunto con la proteína Argonauta (AGO) en el que una de las dos cadenas se convierte en un miRNA maduro (Michlewski & Cáceres, 2019).

Las vías no canónicas de la biogénesis de miRNAs usan distintas combinaciones de proteínas que se encuentran involucradas en la biogénesis mediante la vía canónica, estas vías descubiertas se pueden agrupar en vía independiente de DROSHA/DGCR8 e independiente de DICER. Los pre-miRNAs producidos de intrones del mRNA mediante el splicing son un ejemplo de la biogénesis mediante vías no canónicas, así como también la vía independiente de DICER en la cual los miRNAs son procesados por DROSHA a partir de transcritos endógenos de RNA de horquilla corta (shRNA). Dicha vía requiere AGO2 para completar su maduración en el citoplasma, debido a que tienen un tamaño insuficiente para ser sustrato de DICER (O'Brien y col., 2018).

Dadas las funciones de los miRNAs, la desregulación de su biogénesis lleva a cambios en la expresión de genes, afectando la homeostasis celular y vías de señalización que tienen implicación en el desarrollo de enfermedades (Michlewski & Cáceres, 2019).

D. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La EII es una enfermedad crónica inflamatoria que afecta al tracto gastrointestinal, se manifiesta como enfermedad de Crohn (EC) y colitis ulcerativa (CU), entre otras. La EII produce inflamación en la mucosa intestinal, lo cual ocasiona episodios sintomáticos de dolor abdominal, diarrea, heces con sangre y pérdida de peso. La EII se presenta en las etapas tempranas de la vida en hombres y mujeres (Guan, 2019).

2.11 Tipos de Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La EII se clasifica en CU y EC. La CU se caracteriza por una inflamación neutrofílica que se manifiesta de manera continua y difusa que se extiende a través del colon hasta el recto proximal, mientras que la EC presenta inflamación transmural pleomórfica, puede afectar al todo el tracto gastrointestinal incluyendo enfermedad perianal. Ambas formas de EII pueden estar asociadas con características extraintestinales y tienen complicaciones significativas.

El término EII indeterminada se utiliza para clasificar pacientes con clara evidencia de EII, pero en los que no se cuenta con diferencia clara para diagnosticar EC o CU, esta forma está particularmente presente en los infantes con manifestación temprana de EII, usualmente antes de los 6 años. (Kelsen y col., 2019; Rosen y col., 2015)

2.12 Diagnóstico

La manifestación de EII en infantes y adolescentes puede ser con una gran diversidad fenotípica. A menudo los síntomas clínicos se pueden parecer a los observados en el síndrome de intestino irritable, gastroenteritis alérgica e infecciosa. Tanto diarrea y dolor abdominal se presenta en ambas formas de EII mientras que el sangrado rectal se presenta de manera más frecuente en CU comparado con EC. Los infantes con EC presentan pérdida de peso y enfermedad perianal, por lo que la examinación física es necesaria para el diagnóstico de EII (Yu & Rodriguez, 2017).

El diagnóstico estándar incluye estudios de imagen como la tomografía computarizada y de tiempo más reciente la enterografía por resonancia magnética (MRE), también se incluyen estudios de endoscopia como colonoscopia y esofagogastroduodenoscopia con múltiples biopsias tomadas a lo largo del tracto gastrointestinal. Debido a la naturaleza invasiva y los costos asociados con endoscopia para evaluar la actividad de la enfermedad, los exámenes de laboratorio incluyen el rango de sedimentación de eritrocito, proteína C reactiva sérica y calprotectina fecal. Esos biomarcadores de inflamación son usados frecuentemente como sustitutos de endoscopia para el diagnóstico de EII (Yu & Rodriguez, 2017).

2.13 Patogénesis

Entre los estudios de asociación de genoma completo que se han desarrollado exitosamente en EII, se han identificado 99 loci de riesgo, incluidos 28 presentes en EC y CU. Los genes implicados en la aparición de EII tanto en la infancia como en la edad adulta se solapan, lo cual sugiere predisposiciones genéticas y vías patológicas similares (Khor y col., 2011).

Los loci identificados indican distintas vías de señalización que participan en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, como la función de la barrera epitelial, defensa innata de la mucosa, regulación inmunitaria, migración celular, autofagia, respuesta inmunitaria adaptativa y vías de señalización metabólicas asociadas con homeostasis celular. Los daños en la permeabilidad de la barrera epitelial permiten incursión microbiana, lo cual es reconocido por el sistema inmune innato y provoca la secreción de citocinas proinflamatorias (Guan, 2019).

La homeostasis intestinal es mantenida mediante las acciones de los macrófagos residentes que tienen una actividad fagocitaria y bactericida mejorada además de la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias. También están involucrados grupos de macrófagos especializados, los monocitos Ly6C high que secretan factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 β y son reclutados en la fase inicial de la lesión tisular mientras que los monocitos Ly6C low que secretan interleucina-10 (IL-10), TGF- β y el factor de crecimiento vascular endotelial se movilizan durante la fase de la resolución de la inflamación (Khor y col., 2011).

El dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 2 (NOD2) fue el primer gen asociado a EII, a partir de eso se empezaron a estudiar los genes que interactúan epistáticamente con la señalización de NOD2. Como por ejemplo los receptores citosólico tipo NOD (NLR), esto basado en sus ligandos y en las vías de señalización que controlan (Guan, 2019; Khor y col., 2011).

NOD2 reconoce producto de peptidoglicano muramil dipéptido (MDP) que modula tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa, MDP induce la autofagia, la cual controla la replicación bacteriana y la presentación de antígeno y actúa en las células dendríticas en conjunto con los ligandos de TLRs para promover la diferenciación de las células TH17, así como también contribuyen a la tolerancia inmune cuyo efecto se ve deteriorado en células de individuos con EC asociada a mutaciones en NOD2. Además, NOD2 puede participar en distintas vías de señalización independientes de MDP como la regulación de la respuestas de células T y la respuesta del tipo interferón I (IFN I) para la estimulación de RNA monocatenario (Khor y col., 2011).

E. ENFERMEDAD CELIACA

La enfermedad celiaca es un trastorno autoinmunitario desencadenado por el consumo de gluten en los cereales como el trigo, avena cebada y centeno, lo cual sucede en las personas con predisposición genética. Afecta 1-2% de los individuos en la mayoría de las poblaciones con ascendencia caucásica, convirtiéndola en la enfermedad autoinmune del intestino delgado más común. Es de etiología multifactorial, incluyendo factores tanto genéticos como ambientales, necesarios para el desarrollo de la enfermedad (Ben Houmich & Admou, 2021; Lundin & Wijmenga, 2015).

2.16 Características clínicas

El concepto de enfermedad celiaca ha cambiado con el paso del tiempo de ser considerada una enteropatía inusual a una enfermedad sistémica. Tiene potencial de manifestarse de manera sintomática o asintomática en una amplia variedad de edades, usualmente se manifiesta a los 6 meses de edad, poco tiempo después de introducir alimentos con gluten en la dieta, se presenta con diarrea, dolor y distensión abdominal (Ben Houmich & Admou, 2021).

Las mujeres son diagnosticadas a una edad más temprana y presentan más frecuentemente constipación, distensión abdominal y anemia por deficiencia de hierro. En la adolescencia se manifiesta baja estatura y retraso de la pubertad. El principal síntoma que presentan los adultos es diarrea aunque también pueden ser asintomáticos antes del diagnóstico o tener baja estatura lo cual indicaría que presentan enfermedad celiaca desde mucho tiempo atrás (Hujoel et al., 2019; Barker & Liu, 2008).

2.17 Diagnóstico

Las pruebas inmunoserológicas son herramientas que permiten identificar a los individuos con riesgo de desarrollar enfermedad celiaca y hacer una selección más minuciosa de quienes requieran biopsia intestinal. Se centran en cuantificar dos anticuerpos, anti transglutaminasa 2 (anti-TG2) y anti gliadina que reconocen a los antígenos transglutaminasa 2 y gliadina, respectivamente. Cuando se tiene sospecha de enfermedad celiaca, el primer paso para el diagnóstico es la detección de inmunoglobulina A (IgA) anti-TG2 e inmunoglobulina G anti-TG2 (Ben Houmich & Admou, 2021) .

La biopsia muestra atrofia en las vellosidades de los enterocitos e hiperplasia de las criptas. El sistema de puntaje Marsh permite clasificar los hallazgos histológicos, una histología intestinal normal recibe un puntaje de Marsh 0, Marsh 1 hace referencia a la presencia de linfocitos intraepiteliales, hiperplasia de las criptas; Marsh 2 indica un número aumentado de linfocitos intraepiteliales y Marsh 3 refiere el hallazgo de cualquier grado de atrofia en las vellosidades de los enterocitos (Barker & Liu, 2008).

2.18 Patogénesis

El proceso inmunopatológico de enfermedad celiaca está desencadenado por un factor ambiental como lo es el gluten. Los residuos de glutamina contenidos en la gliadina son convertidos por la transglutaminasa en glutamato el cual es reconocido por las células presentadoras de antígeno que acarrean el antígeno HLA-DQ2 o DQ8 activando células T CD4⁺ específicas a gliadina. Mediante este reconocimiento de antígeno, los péptidos de gliadina desencadenan la producción de citocinas proinflamatorias como IL-15, IL-21 e IFN γ , lo que permite la respuesta de los anticuerpos específicos anti-TG2 y anti-gliadina, la producción de citocinas proinflamatorias permite que IL-15 eleve la proliferación de linfocitos intraepiteliales que dañan a las células epiteliales provocando los cambios histológicos característicos de la enfermedad celiaca (Ben Houmich & Admou, 2021; Barker & Liu, 2008).

1) Factores genéticos

La enfermedad celiaca está vinculada a una predisposición genética relacionada con la presencia del haplotipo HLA-DQ2, presente en el 90-95% de individuos con enfermedad celiaca. Las moléculas HLA-DQ se encargan de presentar los péptidos de gluten a las células T y a su vez producen citocinas proinflamatorias que tienen la capacidad de dañar las células epiteliales lo que da como resultado la respuesta inflamatoria (Ben Houmich & Admou, 2021; Lundin & Wijmenga, 2015).

F. SÍNDROME DE DOWN Y ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

Respecto a enfermedades gastrointestinales, el SD se asocia con enfermedad celiaca (CeD), la cual tiene un riesgo seis veces mayor en niños. Mientras que EII en SD tiene un rango de incidencia 1.6 mayor al de las personas euploides. Instituciones como la Academia Americana de Pediatría (AAP, por sus siglas en inglés) recomiendan en sus guías, la detección de CeD para niños con diagnóstico o síntomas de SD, mientras que otras instituciones internacionales recomiendan la detección incluso en niños y adolescentes con riesgo genético de desarrollarlo (Baksh y col., 2023; Velasco-Benítez y col., 2019).

Para comprender el riesgo de las comorbilidades gastrointestinales en SD, es necesario abordar los genes que se encargan de regular la respuesta inmune localizados en el HSA21, tales como el gen regulador autoinmune (AIRE) y 4 subunidades del receptor de interferón que actúan como receptor del interferón (IFN) tipo III, ligandos y para las citocinas IL-10, IL-22 e IL-26. Los individuos con SD tienen hipersensibilidad ante la estimulación de IFN α e IFN γ (Hom y col., 2024; Malle y col., 2023).

Debido a los síntomas propios de la enfermedad celiaca, es complicado el diagnóstico en individuos con SD, dado a que retraso en el crecimiento y neurodesarrollo, diarrea intermitente y constipación, están frecuentemente presentes en individuos con SD sin enfermedad celiaca. Diagnosticar enfermedad celiaca en esta condición involucra evaluar HLA para los haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8, detección de anticuerpos anti-gliadina, anti-TGA y anti-endomisio, se puede optar por una confirmación histológica mediante análisis de biopsia duodenal, si es requerido. Las guías de Academia Americana de Pediatría recomiendan el diagnóstico para enfermedad celiaca mediante pruebas serológicas a partir del primer año de manera periódica de manera preventiva, solo en los individuos con SD que presenten síntomas y sigan una dieta con gluten (Hom y col., 2024).

G. MiRNAs Y ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

El SD se asocia con distintas enfermedades gastrointestinales. Tanto la EII como CeD se clasifican dentro enfermedades gastrointestinales que son resultado de un proceso patológico en el cual se obtiene una respuesta inflamatoria y la destrucción de la mucosa intestinal (Souto-Rodríguez y col., 2014).

Los mir-125b, 21-3p y 155-5p se encontraron sobreexpresados en biopsias de tejido inflamado con CU de 15 individuos infantiles (6-7 años) en contraste con un grupo control de infantiles, mientras que mir-192 se encontró menos expresado en CU con la enfermedad activa y sobreexpresado en infantiles con la enfermedad inactiva (Krishnachaitanya y col., 2022).

En la EC están sobreexpresados mir-21-3p y mir-155-5p en muestras de tejido inflamado de íleon y colon de adultos y en muestras fecales se encontró menos expresado el mir-192 en contraste con un grupo control (Krishnachaitanya y col., 2022).

En CeD, se encontró una expresión significativamente disminuida de mir-192-5p al igual que en EC y CU y una sobreexpresión de mir-21-5p, relacionada con la regulación de la respuesta inmune en el duodeno (Chamani y col., 2019).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia del SD es de 1 caso por cada 1000 nacimientos, con una frecuencia aún mayor en algunas regiones específicas. El SD da lugar a diversas manifestaciones clínicas, como hipotonía, baja estatura, braquicefalia, lengua protuberante, orejas pequeñas, manos cortas y discapacidad intelectual, entre otras. Además de estas características, los individuos con SD presentan una mayor susceptibilidad a varias comorbilidades, como trastornos neurodegenerativos, alteraciones gastrointestinales, problemas inmunológicos y defectos congénitos cardíacos. Las modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA se encargan de la regulación génica y los cambios en estos mecanismos de metilación se han relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades. Los miRNAs, moléculas que regulan la expresión génica después de la transcripción, inhiben la traducción del mRNA mediante el reconocimiento de secuencias específicas en el mRNA objetivo. Cambios en la expresión de ciertos miRNAs han sido asociados con enfermedades gastrointestinales, como las enfermedades inflamatorias intestinales, y estos cambios podrían deberse a alteraciones en los patrones de metilación de los genes que codifican dichos miRNAs. Ante esta situación, es necesario desarrollar un modelo estadístico predictivo que permita dilucidar las características del metiloma que influyen en miRNAs asociados con enfermedades gastrointestinales en individuos con SD. Dicho modelo contribuiría a comprender mejor los mecanismos epigenéticos involucrados en el desarrollo de estas comorbilidades y permitiría la implementación de intervenciones clínicas personalizadas basada en el perfil epigenético de cada individuo, contribuyendo al manejo y prevención de complicaciones en el sistema gastrointestinal en personas con SD.

IV. JUSTIFICACIÓN

El síndrome de Down es la aneuploidía más frecuente, se estima que alrededor de 1 caso por cada 1000 recién nacidos. Esta condición trae consigo mayor susceptibilidad a distintas comorbilidades como los trastornos gastrointestinales, la enfermedad inflamatoria intestinal tiene una tasa de incidencia de 1.6 veces mayor en personas con síndrome de Down, mientras que la enfermedad celiaca se presenta en el 5% de los individuos con síndrome de Down. De este modo, se han encontrado cambios de expresión en miRNAs asociados al desarrollo y progresión enfermedades gastrointestinales, posiblemente relacionado a la condición genética. Por otro lado, la metilación del DNA está relacionada a cambios epigenéticos en genes como los que codifican miRNAs que, expresados diferencialmente, se relacionan con el desarrollo de enfermedades gastrointestinales. Debido a lo anterior es relevante establecer un modelo estadístico predictivo, que a partir de variables obtenidas mediante el análisis del perfil de metilación de la región promotora del gen VMP1 el cual codifica a miR-21. Lo anterior nos permitirá predecir los cambios de metilación en VMP1 lo cual se traduciría en cambios de expresión de miR-21 lo nos que permitirá tener incidencia sobre las comorbilidades en síndrome de Down.

V. HIPÓTESIS

Existen condiciones epigenómicas asociadas a miR-21 que modifican las condiciones clínicas asociados a procesos inflamatorios en enfermedades gastrointestinales en individuos con síndrome de Down, susceptibles a integrarse en un modelo estadístico predictivo de las condiciones clínicas en síndrome de Down

VI.OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Establecer un modelo predictivo de datos epigenómicos de la metilación de miR-21 que influyen sobre los síntomas asociados a procesos inflamatorios en enfermedades gastrointestinales en síndrome de Down.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a los participantes del estudio, de acuerdo a los síntomas gastrointestinales e indicadores bioquímicos.
2. Establecer los genes que codifican miRNAs relacionados con enfermedades gastrointestinales y que sean susceptibles a metilación.
3. Describir la metilación de los sitios CpG del promotor del gen VMP1 (miR-21).
4. Realizar un modelo estadístico predictivo de datos epigenómicos de la metilación de miR-21 que influyen sobre los síntomas asociados a procesos inflamatorios en enfermedades gastrointestinales en síndrome de Down.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un estudio descriptivo transversal en el cual se estableció un modelo predictivo del patrón de metilación del promotor de miR-21, de acuerdo a sus características clínicas y bioquímicas.

B. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para el presente trabajo se incluyeron personas de ambos sexos con diagnóstico clínico o citogenético de SD, con trisomía parcial o total del chr21. Para los sujetos del grupo control se seleccionarán a paciente sin diagnóstico para SD o alguna otra aneuploidía.

7.1. Selección de la población

Los sujetos de estudio fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes criterios:

1) Criterios de inclusión

Para el grupo de personas con SD se incluyeron a personas de ambos sexos con diagnóstico previo de trisomía 21, carta de consentimiento y carta de asentimiento firmadas por padre o tutor. Para el grupo control, se seleccionaron personas euploides, de ambos sexos con carta de consentimiento informado firmada, ambos grupos abarcaron edades de 4-28 años

2) Criterios de Eliminación

Se eliminaron a aquellos sujetos en los que no fue posible obtener muestra sanguínea suficiente para realizar los experimentos moleculares o a los que tuvieron datos faltantes en la historia clínica.

C. SELECCIÓN DE MIRNA

La selección de miRNA se llevó a cabo mediante la plataforma miRNet versión 2.0, el cual es un sitio web para análisis visuales de miRNAs empleando un algoritmo para creación de redes a partir de bibliotecas de anotaciones de miRNAs como miRBase, miRTarBase, TarBase, HMDD (Human microRNA Disease Database) entre otros (Chang y col., 2020).

Para el análisis en red en miRNet, primero se seleccionaron los datos de entrada, en este caso las enfermedades gastrointestinales de interés (enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa) para crear una red de interacción entre las enfermedades y los miRNAs disponibles en las bases de datos. La visualización e interpretación del análisis en red se llevó a cabo a partir bases de datos disponibles como Gene Ontology, KEGG, Reactome, lo que permitió dilucidar cuáles miRNAs convergían entre las enfermedades y se eligieron aquellos que estuvieran relacionados con más de una de las enfermedades de interés.

7.2 Creación del código en R

Se utilizó RStudio en la versión 4.3 para realizar el análisis de metilación diferencial. Se creó un código para cada repositorio con los paquetes minfi, limma, y GEOquery para la descarga y manipulación de los datos de cada uno. Los repositorios de epigenoma fueron obtenidos desde Gene Expression Omnibus (GEO) de NCBI, buscándolos con los términos MeSH "*DNA methylation*", "*Down syndrome*". posterior a eso se leyeron los datos IDAT o .txt según correspondía para extraer los valores beta de metilación de cada sitio CpG contenido en la plataforma Illumina Infinium HumanMethylation 450 (Ritchie y col., 2015; Aryee y col., 2014; Kumaki y col., 2008).

D. ANÁLISIS DEL PERFIL DE METILACIÓN

7.3. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó con el kit *DNeasy Blood & Tissue*TM Kit Cat. No. 69504 de QiagenTM. Se realizó a partir de 50 µL de sangre no nucleada y 20 µL de proteinasa K (600 mAU/mL) a un microtubo de 1.5 mL, y se ajustó el volumen hasta llegar a 220 µL con PBS. Se añadieron 200 µL de buffer AL y se mezcló mediante el vórtex, posterior a ello se incubaron las muestras a 56 °C por 10 minutos. Posteriormente se agregaron 200 µL de etanol al 100%, se mezclaron mediante el vortex, y se pasaron por las columnas DNeasy Mini spin, colocadas en un tubo colector de 2 mL.

Se centrifugaron a 6000 x *g* por 90 segundos y se descartó el tubo colector. Las columnas se colocaron en tubos colectores nuevos y se lavaron con 500 µL de buffer AW1 bajo las mismas condiciones de centrifugación. Una vez más se pasaron las columnas a tubos colectores nuevos y se lavaron con 500 µL de buffer AW2, a 20,000 x *g* por 3 minutos y 30 segundos (hasta que la columna quedó seca sin restos de etanol que pudieran interferir con la suspensión de DNA). Las columnas se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se eluyeron con 100 µL de agua grado biología molecular. Para ello se les agregaron 50 µL del agua, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 6,000 x *g* por 90 segundos; posteriormente se agregaron los otros 50 µL y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se descartaron las columnas y se almacenaron los tubos eppendorf con la elución con el DNA en ultracongelador a -80 °C hasta su uso.

7.4 Conversión de DNA con bisulfito

Para distinguir el DNA metilado del no metilado, el DNA extraído fue convertido con bisulfito sódico mediante el kit de Thermo Scientific™ EpiJET Bisulfite Conversion Kit™ #K1461. Se agregaron 220 ng totales de cada muestra y agua de grado de biología molecular para alcanzar el volumen de 20 µL en un tubo de PCR (tubo de 0.2 mL). Se añadieron 120 µL del agente de modificación, se mezcló con vórtex y se centrifugó con un spin para bajar el líquido al fondo. Se colocó la mezcla en un termociclador para su desnaturalización y conversión de DNA con bisulfito, con las especificaciones del protocolo A del kit (98 C° por 10 minutos y 60 C° por 150 minutos).

Los productos de la conversión fueron purificados siguiendo las recomendaciones del fabricante, descritas brevemente. Se agregaron 400 µL de buffer de unión en la micro columna de purificación de DNA colocadas en tubos colectores de 2 mL y se les agregó el producto de la PCR mezclando por pipeteo, para luego centrifugarlas a 12,000 rpm por un minuto. Se descartó el líquido del tubo colector y se añadieron 200 µL de buffer de desulfuración a las microcolumnas, incubando a temperatura ambiente por 20 minutos, para posteriormente centrifugarse a 12,000 rpm por un minuto. Nuevamente se descartó el líquido del tubo colector y se agregaron 200 µL de buffer de lavado a las microcolumnas, centrifugando bajo las mismas condiciones. Este paso se repitió hasta asegurarse que las columnas quedaran sin restos de buffer. Se descartaron los tubos colectores, se colocaron las microcolumnas en tubos eppendorf de 1.5 mL, se les añadieron 12.5 µL de agua grado biología molecular y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por un minuto, descartando las micro columnas y se almacenaron los tubos eppendorf con el DNA convertido, a -80 C° hasta su uso.

7.5 PCR en tiempo real

Se realizó PCR en tiempo real con las muestras de DNA convertido, usando SYBR Green FAST Mastermix CT:330603 de Qiagen™ y el termociclador Step One Plus™ de Applied Biosystems™, cada reacción consistía de 15 µL, 7.5 de SYBR Green (2x), 0.75 µL de los oligonucleótidos de mir-21 (Tabla1) (forward y reverse, a una concentración de 0.5 nM), 4 µL de DNA convertido (a una concentración de 5 ng/ µL) y 2.75 µL de agua grado biología molecular, se agregaron controles negativos sin DNA, cada reacción se realizó por triplicado. Las condiciones de reacción fueron desnaturalización a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineación a 60 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C° por 30 segundos. En caso de un resultado indeterminado, se repitió la reacción.

Tabla 1. Especificaciones de los oligonucleótidos de miR-21

Primer	Inicio	Tamaño	Tm	GC%	C's	Secuencia
Forward primer	519	21	58.83	66.67	4	TGTTTTAGGGGGTAGAGGGAT
Reverse primer	713	26	58.54	57.69	7	CAAACCTCTAAAAACAACCTCAAA CTT
Tamaño del producto: 195 pb Tm: 70.5 C Sitios CpG en el producto: 13						

7.6. Purificación de amplificadores de PCR

Para purificar los amplificadores por PCR se utilizó el kit MinElute PCR Purification kit cat. 28004 de Qiagen™. Se mezclaron los triplicados de cada muestra dando un volumen total de ~45 µL en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 5 volúmenes de buffer PB por cada volumen de PCR (225 µL de buffer PB y 45 µL de amplificado de PCR), se mezcló con micropipeta y se aplicó un vórtex de 5 segundos para mezclar el buffer y la muestra. Se aplicó la muestra con el buffer a las columnas colocadas en tubos colectores de 2 mL, se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por un minuto y se descartó el líquido en el tubo colector. Se añadieron 750 µL de buffer PE a las columnas y se centrifugaron bajo las mismas condiciones, hasta que las columnas quedaran libres de restos de etanol, se descartó el líquido en el tubo colector. Se colocaron las columnas en tubos de eppendorf y primero se agregaron 5 µL de agua grado biología molecular a las columnas y se dejaron incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 13,000 rpm por un minuto. Se agregaron otros 5 µL de agua a las columnas y se centrifugó bajo las mismas condiciones, se descartaron las columnas y se almacenaron los tubos eppendorf a -80 °C.

7.7 Secuenciación Sanger

Para la secuenciación de los amplificadores de PCR se utilizó el método Sanger a partir de 30 ng/µL de DNA en 6 µL y 10 pM de los oligonucleótidos en 120 µL cada uno. La secuenciación se realizó en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (DNA Analyzer 3730xl de 96 capilares, Applied Biosystems™). Se utilizó el software Chromas (versión 2.6.6) para visualizar los electroferogramas y la calidad de lectura de cada nucleótido. Se excluyeron los primeros 40 nucleótidos de cada secuencia al considerarse como ruido de cada lectura, por lo que los nucleótidos identificados en esa zona son indeterminados (Treves, 2010).

7.8 Análisis de cuantificación de metilación en sitios CpG

A partir de los archivos FASTA del software Chromas, se obtuvo la secuencia inversa complementaria del DNA. Se utilizó la plataforma en línea quantification tool for methylation analysis (QUMA), la cual alinea la secuencia de los amplificadores de PCR con la secuencia original no convertida. A partir de la alineación con la secuencia de cada muestra, identifica si cada sitio CpG está metilado, no metilado o si es indeterminado debido a un mal alineamiento o mala conversión con bisulfito (Kumaki y col, 2008). A partir de cada sitio CpG identificado se realizó el análisis del test de Fisher para identificar diferencias entre la metilación de cada sitio CpG de ambos grupos. También se realizó una prueba U de Mann-Whitney para las diferencias de los sitios CpG metilados de todas las secuencias de ambos grupos. Estos análisis se hicieron en el software QUMA, considerando como estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$.

7.9. Modelo de regresión logística

Se creó un modelo de regresión logística binaria a partir de los datos del grupo SD, en RStudio versión 4.3.3, con los paquetes, cluster, nnet, lmtest, caret, ggplot2, dplyr y readxl (Kuhn, 2015). Antes de realizar el modelo se optó por realizar distintos clústeres (k) para los síntomas o padecimientos gastrointestinales que serían utilizados como variable respuesta (diarrea, dolor abdominal, estreñimiento, colitis, gastritis, pirosis, úlceras y enfermedad celiaca) para identificar los patrones subyacentes en los síntomas debido a la colinealidad que pueda existir entre ellos. Se utilizó el método del codo para visualizar la disminución en la suma de cuadrados dentro de los clústeres (WSS) y determinar el número óptimo de k (Kuhn, 2015; Maechler y col, 1999).

Como variables predictoras se utilizaron los datos obtenidos del software QUMA como resultado del análisis de la metilación en los sitios CpG de las secuencias. Se usó el paquete nnet para realizar el modelo de regresión logística binaria, para ello se usó como variable respuesta a los síntomas del clúster 1 (dolor abdominal, gastritis y colitis) y como variable predictora el número de sitios CpG no metilados en cada secuencia de DNA (Elkahwagy y col., 2024).

Para evaluar la bondad de ajuste del modelo se realizó el test de razón de verosimilitud, usando un modelo nulo (sin variable predictora) con el modelo alternativo, se tomó en cuenta el chi-cuadrado de razón de verosimilitud con valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo para rechazar el modelo nulo. Se calculó la R^2 de McFadden para evaluar la calidad de ajuste del modelo de regresión logística, considerando valores > 0.2 como buen ajuste, así como también se realizó una matriz de confusión, curva ROC y se calculó el área bajo la curva (AUC) para evaluar la capacidad de predicción del modelo comparado con los valores observados en el grupo SD (Elkahwagy y col., 2024).

VIII. RESULTADOS

En el biobanco, se contaron con 91 muestras de individuos con SD y 108 muestras control. A partir de ese universo se acotó nuestra población de estudio a 30 individuos con SD y 30 individuos control de acuerdo con los criterios de inclusión y eliminación antes descritos. Después de la amplificación mediante PCR en tiempo real se descartaron las muestras que no fueron posibles obtener los amplificadores de PCR antes de realizar la secuenciación Sanger. Se descartaron las secuencias de baja calidad al igual que aquellas a las que no se pudieron analizar los sitios CpG debido a la baja alineación con la secuencia original (Figura 5).

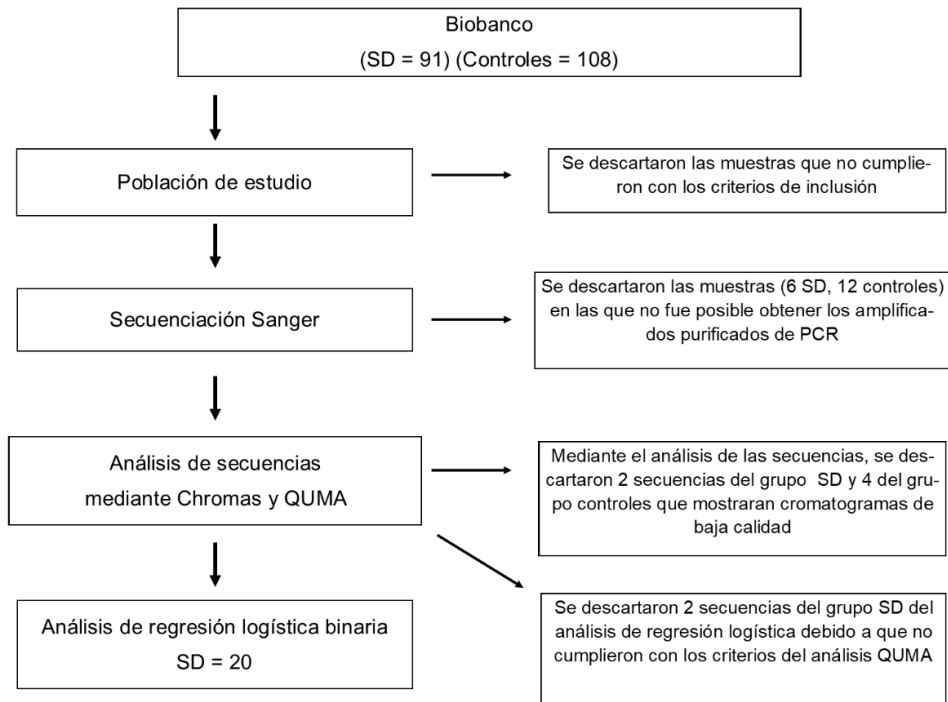


Figura 5. Flujo del trabajo experimental con las muestras del estudio

Algunas muestras fueron excluidas después de cada método experimental ya que no fue posible usarlas en el siguiente método

Tabla 2. Características antropométricas

	Síndrome de Down	Controles	P valor
Edad (Años)	12.6 ± 5.3	11.5 ±6.1	0.476
Estatura (Metros)	1.32 ± 17.6	1.41 ±21.4	0.088
Peso (Kilogramos)	41.2 ± 16.2	40.9 ± 19.5	0.903
IMC (Kg/m ²)	22.5 ±5.6	19.3 ±5.5	0.029*
Cintura (Centímetros)	72 ±12.4	66.0 ±14.2	0.075

IMC: índice de massa corporal, *Estadísticamente significativo, valor de p <0.05.

Tabla 3. Características bioquímicas

	Síndrome de Down	Controles	P valor
Glucosa (mg/dL)	92.4 ± 6.8	97.1 ± 12.1	0.071
HbA1c (%)	5.3 ± 0.46	5.0 ± 0.33	0.015*
Colesterol total (mg/dL)	150.8 ± 29.75	174.0 ± 31.5	0.005*
Triglicéridos (mg/dL)	102.1 ± 34.0	75.9 ± 28.3	0.002*
HDL (mg/dL)	48.0 ± 11.4	58.8 ± 14.9	0.003*
LDL (mg/dL)	82.0 ± 25.5	100 ± 21.3	0.004*
c-VLDL (mg/dL)	21.0 ± 8.4	15.1 ± 5.6	0.002*

HbA1c: hemoglobina glicosilada, HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad, VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, *Estadísticamente significativo, valor de $p < 0.05$.

A. SELECCIÓN DE MIRNA

Los miRNAs seleccionados a partir del análisis en red en miRNet fueron (los puntos dentro de la elipse roja) miR-192, miR-31, miR-203A, miR-21, miR-23A, miR-126, miR-200C, miR-LET7E, miR-196A2, miR-146A, miR-124-1, miR-155 y miR-143 de los cuales miR-192 y miR-31 fueron los únicos asociados a las tres enfermedades (Figura 6).

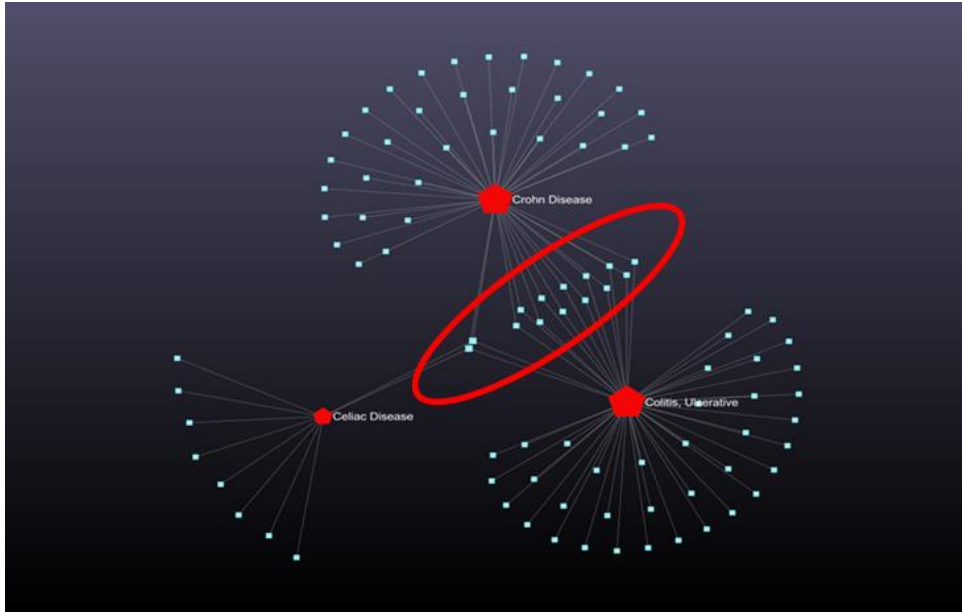


Figura 6. Análisis en red de miRNAs relacionados a enfermedad de Crohn, Colitis ulcerativa y enfermedad Celiaca. Cada pentágono de color rojo representa una de las tres condiciones (EC, CU y CeD), mientras que cada punto azul es un miRNA asociado a cada condición, la elipse roja señala a los miRNAs asociadas entre las enfermedades.

8.1. Selección de repositorios de epigenoma

Se obtuvieron 38 repositorios, 33 de muestras de *Homo sapiens*, 3 *Mus musculus* y 2 con ambos tipos de organismos, seleccionando para este estudio aquellos en humanos con síndrome de Down (SD), que utilizaron muestras de células sanguíneas para la secuenciación del epigenoma completo con la plataforma Illumina Infinium HumanMethylation 450. Realizamos la selección de tres repositorios que tenían disponibles los archivos IDAT de cada muestra y un archivo .txt o .csv con la información general de la metodología del estudio (Tabla 4).

Tabla 4- Repositorios de epigenoma seleccionados para el análisis de sitios CpG

Clave GEO	Autores	Tamaño de población	Edad (media)	Población
GSE52588	Bacalini MG. y col.	SD: 29 Controles: 58	26.3 ± 9.5	• Personas con síndrome de Down. • Hermano de una persona con síndrome de Down. • Madre de una persona con síndrome de Down.
GSE174555	Naumova OY. y col.	SD: 17 Controles: 17	2.8 ± 1.4	• Infantes con síndrome de Down. • Infantes con neurodesarrollo típico.
GSE107211	Hennema n P. y col.	SD: 10 Controles: 5	No especificado por el autor*	• Neonatos con síndrome de Down. • Neonatos sin trisomía

8.2. Análisis de sitios CpG en miRNAs

Para el análisis de metilación se seleccionaron sitios CpG asociados a las secuencias de los 14 miRNAs identificados, identificando 21 sitios CpG (Figura 7) asociados a 5 miRNAs (miR-192, miR-21, miR-200C, miR-146A y miR-196A2). El análisis de metilación diferencial consideró un valor de rango de descubrimiento de falsos positivos (FDR) <0.05 , de acuerdo al valor beta obtenido de la secuenciación. A partir del análisis se obtuvieron valores logFC, valor de p y valor de p ajustado.

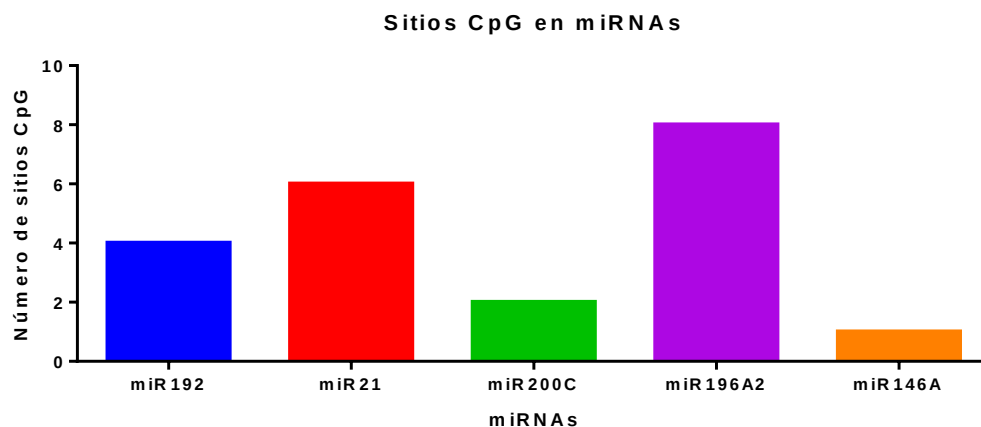


Figura 7. Sitios CpG en miRNAs

En el eje Y se indican el número de sitios CpG analizados en cada miRNA de acuerdo con la base de datos de Illumina Human Methylation 450.

B. DISEÑO DE PRIMER

Se utilizó la plataforma en línea Methprimer para el diseño de los oligonucleótidos para secuenciación por PCR del gen VMP1 el cual es el gen hospedero de miR-21, se realizó el diseño a partir de la siguiente localización: >Hg19 chr17:59706894-59708547 (se introdujeron 300 pb upstream y 300 pb downstream), región que se encuentra en la isla CpG 28 dentro del promotor del gen VMP1 (Figura 8).

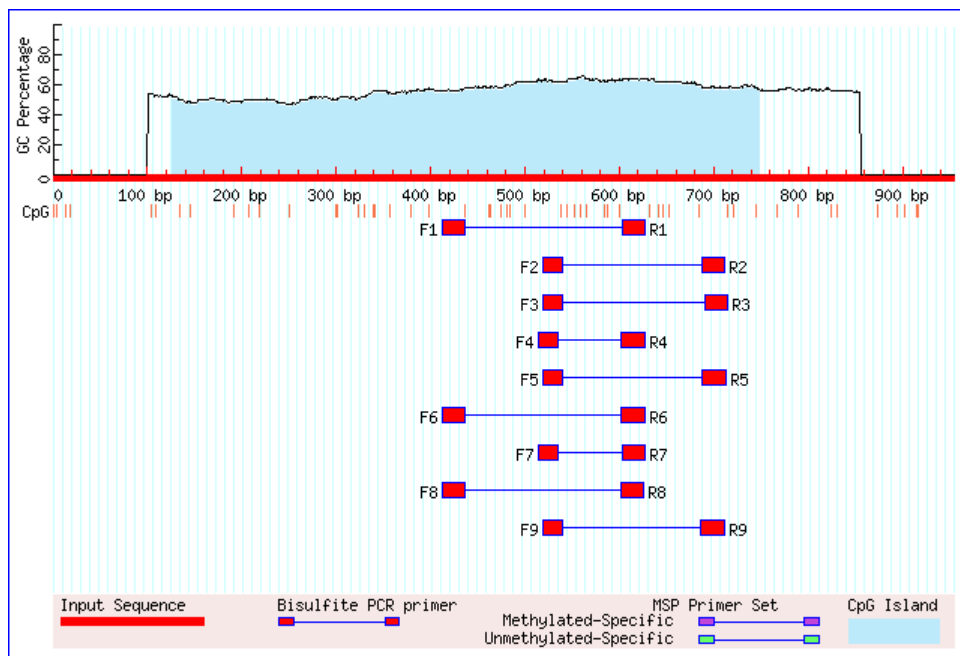


Figura 8. Diseño de los oligonucleótidos de miR-21

El área azul indica una isla CpG predicha en el área de la secuencia de entrada, cada línea roja representa un sitio CpG en la secuencia, se obtuvieron 9 posibles oligonucleótidos, se eligió el número 5.

C. RESULTADOS DE SECUENCIACIÓN

Tras realizar la secuenciación Sanger con los amplificados de PCR, se obtuvieron 42 secuencias, siendo 24 del grupo SD y 18 del grupo control, de las cuales después de revisar los electroferogramas y la calidad de lectura en el software Chromas (versión 2.6.6), se decidió excluir 6 secuencias de los análisis posteriores debido a la baja calidad de las lecturas (4 del grupo SD y 2 del grupo control) (Figura 9,10).



54

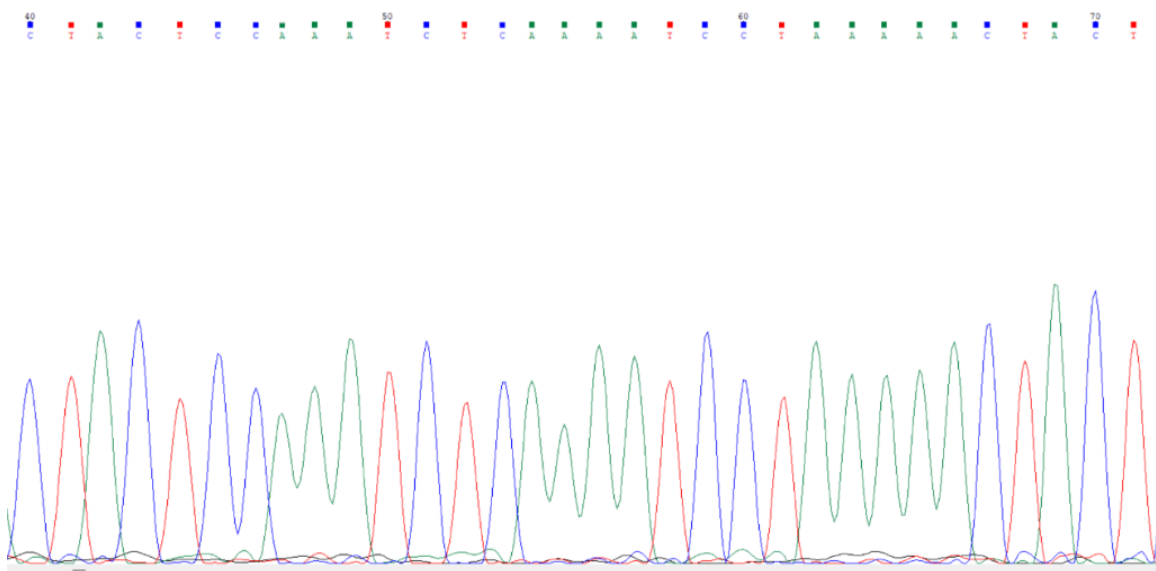


Figura 10. Electroferograma de secuencia del grupo síndrome de Down

Secuencia reverse de una muestra del grupo control, visualizada en el software Chromas el cual indica el nucleótido según la fluorescencia detectada en cada sitio.

8.3 Análisis de metilación a las secuencias de DNA

A partir del análisis de las secuencias en QUMA, se detectaron 9 sitios CpG (Figura 11) en las secuencias de 120 nucleótidos en ambos grupos, cuyo número de metilaciones fueron comparadas entre ambos grupos. Para medir el porcentaje de sitios metilados en cada grupo se tomaron en cuenta solo los sitios CpG identificados como metilados (M) o no metilados (U). En el sitio CpG 44 se observó que 5% del grupo SD tuvo metilación, frente al 45.5 % de los individuos del grupo control (Figura 11). En el resto de sitios CpG no se observaron diferencias estadísticas (valor de $P > 0.05$).

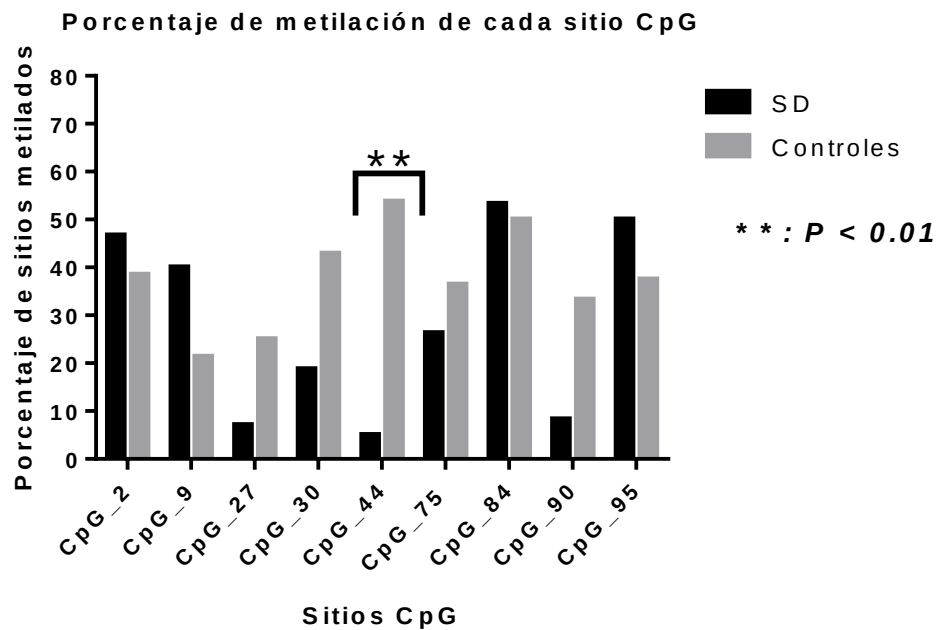


Figura 11. Porcentaje de metilación de cada sitio CpG en el promotor de miR-21

Se utilizó la prueba de la exacta de Fisher para evaluar las diferencias de los sitios CpG metilados en ambos grupos. **: Valor de $P < 0.01$.

D. MODELO DE REGRESIÓN LOGISTICA BINARIA

Los síntomas fueron agrupados en tres clústeres (1, 2, 3) tomando como referencia la disminución de WSS (Figura 12). El Clúster 1 agrupó a 11 individuos con tres síntomas o padecimientos (colitis, dolor abdominal y gastritis), el clúster 2 agrupó 9 síntomas y el clúster 3 incluyó 7 síntomas o padecimientos (Figura 13 y tabla 5).

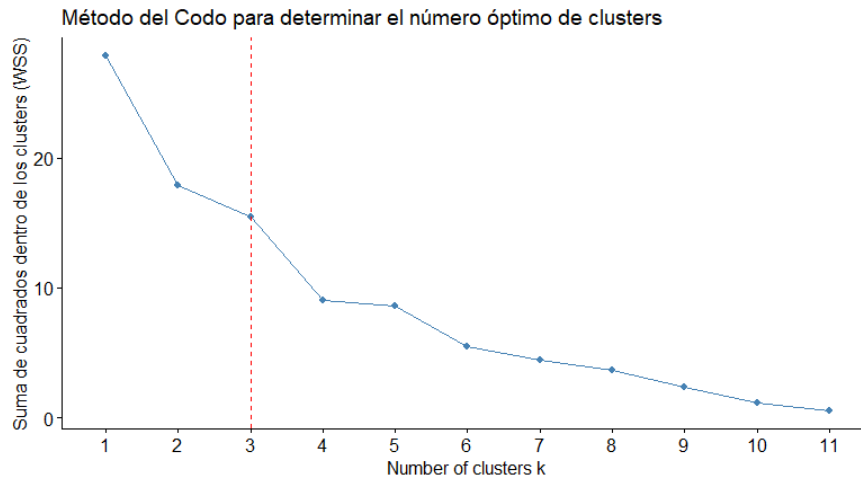


Figura 12. Determinación de número óptimo de clústeres

La línea punteada roja señala el número optimo de clústeres de acuerdo a la disminución de WSS.

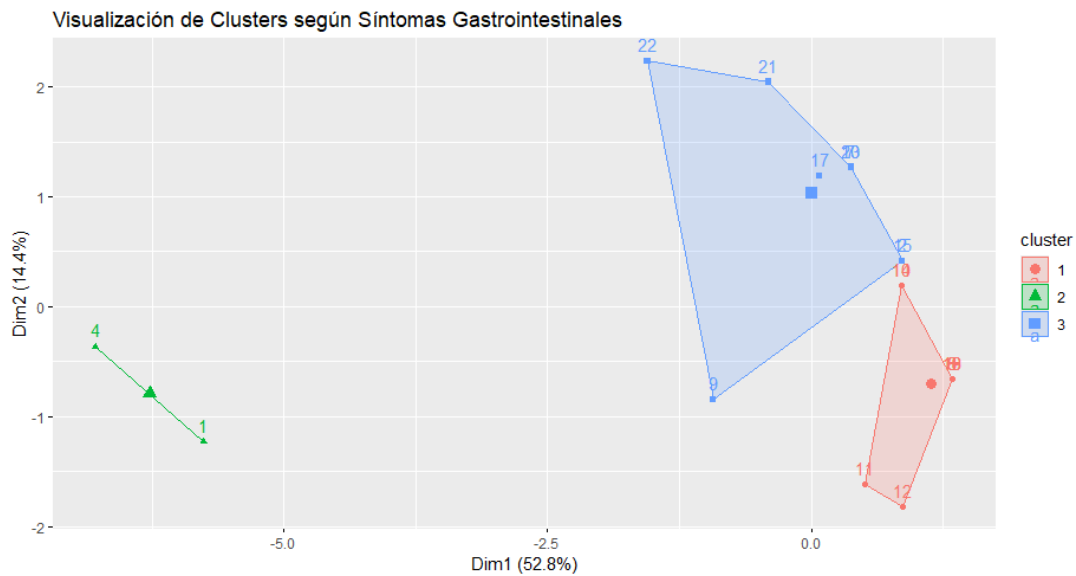


Figura 13. Clústeres de síntomas gastrointestinales

Cada polígono representa un clúster de síntomas y padecimientos en los que engloba a varios sujetos de acuerdo a los vértices, el eje X muestra el componente principal 1 que explica el 52.8 % de los datos mientras que el eje Y muestra el siguiente componente que explica el 14.4% de los datos.

Tabla 5. Clúster según signos y síntomas gastrointestinales en personas con síndrome de Down

Síntoma/padecimiento gastrointestinal	Clúster 1	Clúster 2	Clúster 3
Diarrea		X	X
Estreñimiento		X	X
Dolor abdominal	X	X	X
Gastritis	X	X	X
Pirosis		X	
Úlceras		X	
Nauseas		X	X
Colitis	X	X	X
Enfermedad celiaca		X	

8.4 Coeficientes del modelo

Se utilizó el clúster 1 como variable respuesta y la variable sitios CpG no metilados como variable predictora, codificando como “0” la ausencia de algún síntoma y “1” a los que presentaban uno o más síntomas. La variable sitios CpG no metilados se codificó de acuerdo a los sitios que se identificaron en la secuencia que no estaban metilados, estos fueron desde 0 hasta 9 sitios. El modelo de regresión logística binaria mostró que la variable CpG no metilados obtuvo un valor de coeficiente 0.77 lo cual comparado con el intercepto es estadísticamente significativo (valor de $p=0.04$), el OR fue 2.17, lo cual indica que los sitios CpG no metilados en la secuencia analizada aumenta las probabilidades de tener alguno de los síntomas o padecimientos del clúster 1 (Tabla 6).

Tabla 6. Coeficientes del modelo 1.

Parámetro	Estimación	Error estándar	Z-valor	P valor	OR (IC 95%)
Intercepto	-3.55	1.83	-1.93	0.052	
CpG no metilados	0.77	0.37	2.05	0.040*	2.174 (1.17, 5.46)

8.5 Test de razón de verosimilitud

Para evaluar el ajuste del modelo a los datos observados, se realizó el test de razón de verosimilitud en comparación con un modelo nulo (sin variable predictora), el valor de p del chi-cuadrado fue 0.01, lo cual indica que el modelo 1 se ajusta mejor a los datos observados comparado con el modelo nulo (Tabla 7).

Tabla 7. Test de razón de verosimilitud

Modelo	Loglik	Df	Chi-cuadrado	p-valor
Modelo nulo: Cluster 1~ 1	-11.98	2		
Modelo 1: Cluster 1 ~ CpG no metilados	-15.24	1	6.53	0.01*

Df: grados de libertad, Loglik: logaritmo de verosimilitud, *Significativamente estadístico: valor de $p < 0.05$.

8.6 Predicciones y rendimiento del modelo

La matriz de confusión reveló que el modelo 1, predice con una precisión del 72% sobre el total de los datos observados (Tabla 9), lo cual es mayor a la tasa de información nula (NIR) (0.5) indicando que el modelo es mejor que una predicción aleatoria con un valor de $p < 0.05$, el R^2 de McFeddán fue de 0.21 lo que indica un ajuste aceptable del modelo a la variabilidad de los datos (Tabla 8).

El AUC fue de 0.74 lo que nos indica que tiene un valor diagnóstico aceptable para clasificar la presencia o ausencia de algún síntoma del clúster 1 acorde a los sitios CpG no metilados en las secuencias (Figura 13), el valor de P del test de McNemar no fue significativo lo que muestra que el modelo es equilibrado para clasificar los verdaderos y falsos positivos (Elkahwagy y col., 2024). De acuerdo al modelo 1, las probabilidades de presentar alguno de los síntomas del clúster 1 aumenta con la presencia de mayor número de sitios CpG no metilados en la secuencia analizada lo que aumentaría la expresión de miR-21 en las secuencias con mayor número sitios CpG no metilados (Figura 14).

Tabla 8. Métricas del rendimiento del modelo de regresión logística binaria

Métrica	Valor
Precisión	0.72
IC 95%	(0.49, 0.89)
R ² de McFeddán	0.21
Tasa de información nula (NIR)	0.5
Valor de P (NIR/precisión)	0.02*
Valor de P del test de McNemar	0.68
Sensibilidad	0.81
Especificidad	0.63

*Significativamente estadístico, valor de $p < 0.05$.

Tabla 9. Matriz de confusión

		Modelo 1	
		0	1
Datos observados	0	7	2
	1	4	9

La codificación 0 indica “No tiene alguno de los síntomas del clúster 1” y el 1 indica que “presenta al menos uno de los síntomas”, los datos observados fueron los obtenidos de los sujetos de estudio mientras que los del modelo fueron los realizados mediante la predicción.

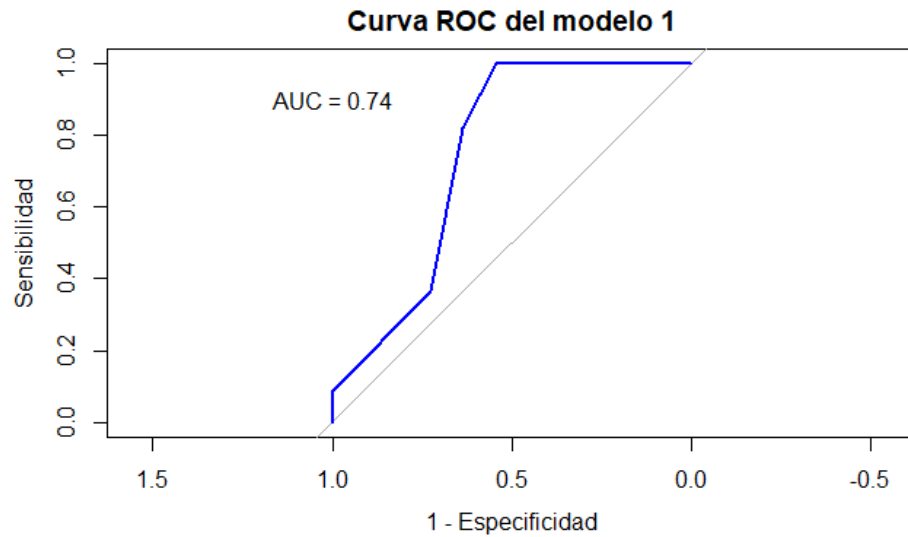


Figura 13. Curva ROC del modelo 1

La línea azul representa el rendimiento del modelo en su clasificación de los síntomas del clúster 1, la línea gris representa un modelo nulo o con clasificación aleatoria. El AUC fue de 0.74.

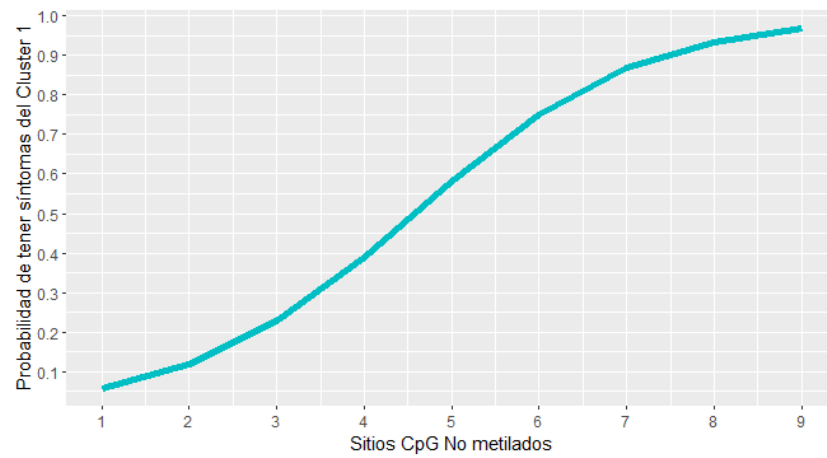


Figura 14. Probabilidades de presentar los síntomas del clúster 1 según los sitios CpG no metilados

El vector azul representa la probabilidad de tener los síntomas del clúster 1 con respecto al número de sitios CpG no metilados en la secuencia amplificada del promotor de VMP1 (miR-21).

IX DISCUSIÓN

Nuestro estudio fue realizado en individuos con SD e individuos euploides de los cuales se secuenció una región de 195 pb del promotor del gen VMP1 el cuál codifica a miR-21. A partir del análisis de metilación de los sitios CpG en las secuencias se realizó un modelo de regresión logística binaria que predijera el comportamiento de la presencia clústeres de los síntomas y padecimientos gastrointestinales identificados en el grupo SD.

La metilación en la región promotora del gen se asocia directamente con la expresión génica, en este caso con la de miR-21 (Alfahed, 2024; Levic y col., 2024). miR-21 es un miRNA intragénico producto del intrón 10 hasta la región 3' UTR del gen VMP1 y no comparte promotor con su gen hospedero. Se atribuye la inducción de transcripción de miR-21 y VMP1 a las marcas de histonas H3K4Me1 y H3K4Me3, además de la metilación de sitios CpG en sitios de inicio de transcripción (Ji y col., 2024).

miR-21 se ha encontrado hipometilado y sobreexpresado en muestras sanguíneas y biopsias de tejido intestinal en adultos con EC y CU comparado con controles (Adams, 2014). Además, la expresión de VMP1 en biopsias de tejido inflamados de individuos con CU, fue directamente proporcional a la de miR-21. En CeD también se ha identificado a miR-21 sobreexpresado en muestras sanguíneas en infantes con y sin tratamiento de dieta libre de gluten comparado con un grupo control (Amr y col., 2019).

El miR-21 es considerado relevante tanto en EII como en enfermedad celiaca debido a su implicación en la regulación de vías de señalización relacionadas en la patogénesis, como el deterioro de la permeabilidad intestinal. También está asociado con la regulación de la activación y proliferación de linfocitos y en la regulación de la expresión de citocinas, lo que le confiere relevancia en los procesos inflamatorios (Anada y col., 2024).

Las personas con SD son más susceptibles a alteraciones epigenéticas, una de las razones podría estar por la presencia del loci de DNMT3L en HSA21 el cual permite reclutar a las otras isoformas de DNMTs mediante su unión a enzimas modificadoras de histonas y por el efecto de dosis génica que produce la trisomía 21, desencadenar cambios en la metilación del genoma (Laufer y col., 2021).

El modelo realizado mediante regresión logística binaria obtuvo una precisión del 72% de los datos observados acorde a los sitios CpG no metilados en las secuencias del promotor de VMP1 (miR-21), lo cual es estadísticamente significativo comparándolo con el NIR de 50% (valor de $p=0.02$) e indica mejor predicción que la aleatoriedad de una variable predictora aleatoria. El test de razón de verosimilitud demostró que el modelo tiene una mejor bondad de ajuste comparándolo con un modelo nulo.

El R^2 de McFadden nos permite describir mejor la manera en la que el predictor del modelo se ajusta a los datos, el R^2 de 0.21 indica un ajuste aceptable, dado el tipo de análisis de regresión se necesitarían más sujetos y agregar más variables predictoras para aumentar el R^2 que permita explicar la variabilidad de los datos con respecto a la presencia o ausencia de alguno de los síntomas del clúster 1.

El AUC (0.74) explica que el modelo tiene una capacidad aceptable de predicción de los datos observados, mediante el test de McNemar nos aseguramos que exista equilibrio entre la tasa de errores en ambas categorías de la predicción, al ser no significativo indica que no hay sesgo de clasificación entre ambas categorías, lo que hace un modelo estable. Un desequilibrio en la clasificación podría sobreestimar la predicción de sujetos que afirmen o nieguen la presencia de síntomas o padecimientos del clúster 1.

El modelo 1 muestra una precisión del 72% mejor estadísticamente sobre el azar explicado por el NIR, además de ser mejor a un modelo nulo. Presenta estabilidad en la tasa de error al predecir ambas categorías. Sin embargo, aunque tenga un R^2 de McFadden aceptable, se encuentra en el límite de inferior para ser un modelo con buena bondad de ajuste, esto puede ser explicado debido al número de secuencias analizadas lo que les da baja variabilidad a los datos observados. Se consideraría necesario incluir más muestras al modelo para aumentar las variables predictoras y que eso mejore el ajuste del modelo.

Sun (2021) realizó un modelo de regresión para clasificar a los sujetos con pancreatitis aguda y pancreatitis aguda severa a partir de 127 muestras de 61 sujetos con la condición, usando como predictores marcadores de metilación en distintos loci del genoma a través de la secuenciación representativa reducida de bisulfito de células libres en muestras sanguíneas. Validaron 59 bloques de haplotipos de metilación con los cuales realizaron el modelo el cual obtuvo AUC de 0.92 para los sujetos con pancreatitis aguda y 0.81 para pancreatitis aguda severa. Como se observa en este estudio, aumentar la cantidad de muestras para validar el modelo y usar técnicas para medir la metilación con mayor sensibilidad contribuyen a crear modelos más robustos.

Otros estudios usan machine learning para realizar los modelos mediante aprendizajes automatizados o semiautomatizados lo que permite obtener modelos más complejos que analicen distintas relaciones de los datos, de esa manera evitan el sobreajuste o modelos con baja bondad de ajuste, esto se puede lograr implementar con los ajustes a la metodología mencionado en el punto anterior (Rauschert y col., 2020).

X CONCLUSIONES

En este estudio desarrollamos un modelo para clasificar la presencia o ausencia de los síntomas o padecimientos gastrointestinales del clúster 1 en individuos con SD de acuerdo al número de sitios CpG no metilados en la secuencia analizada, la cual corresponde al promotor del gen VMP1 el cual contiene en su secuencia a miR-21 en el intrón 10. A mayor presencia de sitios CpG no metilados en esa zona aumenta las posibilidades de presentar alguno de los síntomas o padecimientos del clúster 1 dado el OR de 2.14 de la variable predictora, el modelo predice el clúster 1 con una precisión del 72%.

Con esto y los estudios de otros autores en miR-21 en los que se observa sobreexpresión en sujetos con EII y/o enfermedad celiaca, también podemos añadir que este miRNA es regulado mediante la metilación del DNA en zonas reguladoras como la zona del promotor, por la que la hipometilación o el aumento de sitios CpG no metilados en esa zona podría inducir la sobreexpresión de miR-21, es necesario medir la expresión de miR-21 en estos individuos para relacionar ambos fenómenos.

Otros estudios que han abordado la metilación en el DNA y en las colas de histonas en zonas *down stream* cercanas a miR-21 en las que observan como se relacionan cada mecanismo epigenético con la expresión del miRNA, sin embargo, es necesario valorar la implicación de ambos mecanismos sobre la expresión de este miRNA. Para ello es relevante en SD ya que DNMT3I puede ser el vínculo que relacione ambos mecanismos sobre un solo locus. Es necesario considerar la codeterminación de los mecanismos epigenéticos como un mecanismo regulador en este locus, así como también la implicación de los cambios de expresión del gen VMP1 en estas condiciones.

Para futuros trabajos se podrían implementar herramientas con inteligencia artificial para crear un modelo de aprendizaje con mayor número de variables predictoras que nos otorgue un modelo más robusto y con mayor precisión de diagnóstico.

XI BIBLIOGRAFÍA

1. Adams AT, Kennedy NA, Hansen R, Ventham NT, O'Leary KR, Drummond HE, Noble CL, El-Omar E, Russell RK, Wilson DC, Nimmo ER, Hold GL, Satsangi J. Two-stage genome-wide methylation profiling in childhood-onset Crohn's Disease implicates epigenetic alterations at the VMP1/MIR21 and HLA loci. *Inflamm Bowel Dis*. 2014; 20(10): 1784-1793.
2. Alfahed A. Deregulation of TWIST1 expression by promoter methylation in gastrointestinal cancers. *Saudi J Biol Sci*. 2024; 31(8): 103842.
3. Amr KS, Bayoumi FS, Eissa E, Abu-Zekry M. Circulating microRNAs as potential non-invasive biomarkers in pediatric patients with celiac disease. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2019; 51(4): 159-164.
4. Amr NH. Thyroid disorders in subjects with Down syndrome: An update. *Acta Bio Med Atenei Parmensis*. 2018 ;89(1): 132-139.
5. Anada N, Nakayama Y, Takeshita J, Kageyama K, Sakamoto H, Kamibayashi T, Nakajima Y. Role of MicroRNA-21 in Regulating Intracellular Pathways Associated With Phagocytosis in Human Macrophages: An In Vitro Study. *Cureus*. 2024; 16(7).
6. Antonarakis SE, Skotko BG, Rafii MS, Strydom A, Pape SE, Bianchi DW, Sherman SL, Reeves RH. Down syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2020; 6(1): 9.

7. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, Irizarry RA. Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014; 30(10): 1363-1369.
8. Baksh RA, Pape SE, Chan LF, Aslam AA, Gulliford MC, Strydom A. Multiple morbidity across the lifespan in people with Down syndrome or intellectual disabilities: A population-based cohort study using electronic health records. *Lancet Public Health*. 2023; 8(6).
9. Barker JM, Liu E. Celiac disease: Pathophysiology, clinical manifestations, and associated autoimmune conditions. *Adv Pediatr*. 2008; 55: 349-365.
10. Ben Houmich T, Admou B. Celiac disease: Understandings in diagnostic, nutritional, and medicinal aspects. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2021; 35: 20587384211008709.
11. Bure IV, Nemtsova MV, Kuznetsova EB. Histone Modifications and Non-Coding RNAs: Mutual Epigenetic Regulation and Role in Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(10): 5801.
12. Chamani E, Sargolzaei J, Tavakoli T, Rezaei Z. microRNAs: Novel Markers in Diagnostics and Therapeutics of Celiac Disease. *DNA and Cell Biology*. 2019; 38(7): 708-717.

13. Chang L, Zhou G, Soufan O, Xia J. miRNet 2.0: Network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Research*. 2020; 48(W1): W244-W251.
14. Chen L, Wang L, Wang Y, Hu H, Zhan Y, Zeng Z, Liu L. Global, Regional, and National Burden and Trends of Down Syndrome From 1990 to 2019. *Front Genet*. 2022; 13: 908482.
15. Coppedè, F. Risk factors for Down syndrome. *Archives of Toxicology*. 2016; 90(12): 2917-2929.
16. Díaz-Hernández DJ, Torres-Gómez IP, Arango-Martínez AM, Manrique-Hernández, RD, Gallo-Bonilla JE. Aspectos genómicos, transcriptómicos y del diagnóstico en el síndrome de Down. *Medicina & Laboratorio*. 2020; 24(1): 37-56.
17. Elkahwagy, DMAS, Kiriacos CJ, Mansour M. Logistic regression and other statistical tools in diagnostic biomarker studies. *Clin Transl Oncol*. 2024; 26(9): 2172-2180.
18. Geelhoed EA, Bebbington A, Bower C, Deshpande A, Leonard H. Direct health care costs of children and adolescents with Down syndrome. *The Journal of pediatrics*. 2011; 159(4): 541–545.
19. Guan QA. Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*. 2019; 2019: e7247238.
20. Hom B, Boyd NK, Vogel BN, Nishimori N, Khoshnood MM, Jafarpour S, Nagesh D, Santoro JD. Down Syndrome and Autoimmune Disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2024; 66(3): 261-273.
21. Hujoel IA, Reilly NR, Rubio-Tapia A. Celiac Disease: Clinical Features and Diagnosis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2019; 48(1): 19-37.
22. Ji H, Bi Z, Pawar AS, Seno A, Almutairy BS, Fu Y, Qiu Y, Zhang W, Wang Z, Thakur C, Cui H, Yang L, Chen F. Genomic and epigenetic characterization of the arsenic-induced oncogenic microRNA-21. *Environ Pollut*. 2024; 345: 123396.
23. Johnson C, Warmoes, MO, Shen X, Locasale JW. Epigenetics and cancer metabolism. *Cancer Letters*. 2015; 356(2): 309-314.

24. Karmiloff-Smith A, Al-Janabi T, D'Souza H, Groet J, Massand E, Mok K, Startin C, Fisher E, Hardy J, Nizetic D, Tybulewicz V, Strydom A. The importance of understanding individual differences in Down syndrome. *F1000Research*. 2016; 5: F1000 Faculty Rev-389.
25. Kelsen JR, Russo P, Sullivan KE. Early-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2019; 39(1): 63-79.
26. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011; 474(7351): 307-317.
27. Krishnachaitanya SS, Liu M, Fujise K, Li Q. MicroRNAs in Inflammatory Bowel Disease and Its Complications. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(15): 8751.
28. Krivega M, Stiefel CM, Storchova Z. Consequences of chromosome gain: A new view on trisomy syndromes. *Am J Hum Genet*. 2022; 109(12): 2126-2140.
29. Kuhn M. Caret: Classification and Regression Training. R Package Version 6.0-88. [Internet]. [Consultado 15 Oct 2024]. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=caret>
30. Kumaki Y, Oda M, Okano M. QUMA: Quantification tool for methylation analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008;36: W170–W175.
31. la Torre A, Lo Vecchio F, Greco A. Epigenetic Mechanisms of Aging and Aging-Associated Diseases. *Cells*. 2023; 12(8): 1163
32. Laufer BI, Gomez JA, Jianu JM, LaSalle JM. Stable DNMT3L overexpression in SH-SY5Y neurons recreates a facet of the genome-wide Down syndrome DNA methylation signature. *Epigenetics & Chromatin*. 2021; 14(1): 13.
33. Levic DS. Niedzwiecki D. Kandakatla A. Karlovich NS. Juneja A. Park J. Stolarчук C. Adams S. Willer JR. Schaner MR. Lian G. Beasley C. Marjoram L. Flynn AD. Valentine JF. Onken JE. Sheikh SZ. Davis EE. Evason KJ. Garman KS. Bagnat M. TNF Promoter Hypomethylation Is Associated With Mucosal Inflammation in IBD and Anti-TNF Response. *Gastro Hep Advances*. 2024; 3(7): 888-898.
34. Lu J, McCarter M, Lian G, Esposito G, Capoccia E, Delli-Bovi LC, Hecht J, Sheen V. Global hypermethylation in fetal cortex of Down syndrome due to DNMT3L overexpression. *Hum Mol Genet*. 2016; 25(9): 1714-1727.

35. Lundin KEA, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015; 12(9): 507-515.
36. Lyko F. The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*. 2018; 19(2): 81-92.
37. Maechler M, Rousseeuw P, Struyf A, Hubert M. cluster: «Finding Groups in Data»: Cluster Analysis Extended Rousseeuw et al. [Internet]. 1999 [consultado 8 Nov 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.cluster>
38. Malle L, Patel RS, Martin-Fernandez M, Stewart OJ, Philippot Q, Buta S, Richardson A, Barcessat V, Taft J, Bastard P, Samuels J, Mircher C, Rebillat AS, Maillebouis L, Vilaire-Meunier M, Tuballes K, Rosenberg BR, Trachtman R, Casanova JL, Notarangelo LD, Gnjatich S, Bush D, Bogunovic D.. Autoimmunity in Down's syndrome via cytokines, CD4 T cells and CD11c+ B cells. *Nature*. 2023; 615(7951): 305-314.
39. Mazurek D, Wyka J. Down syndrome—Genetic and nutritional aspects of accompanying disorders. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2015; 66(3): 189-194.
40. Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*. 2019; 25(1): 1-16.
41. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38(1): 23-38.
42. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol*. 2018; 9: 402.
43. Ortega-Torres MJ, Torres-Romero JC, Ángel-Osorio J. Capítulo 3: Cariotipo Humano. En: *Fundamentos de citogenética humana y animal*. Libros Universidad Nacional Abierta y a Distancia; 2019. p. 34-64.
44. Qin L, Qiao C, Sheen V, Wang Y, Lu J. DNMT3L promotes neural differentiation by enhancing STAT1 and STAT3 phosphorylation independent of DNA methylation. *Prog Neurobiol*. 2021; 201: 102028.
45. Rauschert S, Raubenheimer K, Melton PE, Huang RC. Machine learning and clinical epigenetics: A review of challenges for diagnosis and classification. *Clinical Epigenetics*. 2020; 12(1): 51.

46. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(7): e47.
47. Rosen MJ, Dhawan A, Saeed SA. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *JAMA Pediatrics.* 2015; 169(11): 1053-1060.
48. Sailani MR, Santoni FA, Letourneau A, Borel C, Makrythanasis P, Hibaoui Y, Popadin K, Bonilla X, Guipponi M, Gehrig C, Vannier A, Carre-Pigeon F, Feki A, Nizetic D, Antonarakis SE. DNA-Methylation Patterns in Trisomy 21 Using Cells from Monozygotic Twins. *PloS One*, 2015; 10(8): e0135555.
49. Santoro JD, Pagarkar D, Chu DT, Rosso M, Paulsen KC, Levitt P, Rafii MS. Neurologic complications of Down syndrome: A systematic review. *J Neurol.* 2021; 268(12): 4495-4509.
50. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet.* 2023; 24(12): 816-833.
51. Souto-Rodríguez R, Barreiro-de-Acosta M, Domínguez-Muñoz JE. . Down's syndrome and inflammatory bowel disease: Is there a real link? *Rev. esp. enferm. dig.* 2014; 106(3): 220-222.
52. Sun HW, Dai SJ, Kong HR, Fan JX, Yang FY, Dai JQ, Jin YP, Yu GZ. Chen BC, Shi KQ. Accurate prediction of acute pancreatitis severity based on genome-wide cell free DNA methylation profiles. *Clin Epigenet.* 2021; 13(1):223.
53. Tammen S A, Friso S, Choi SW. Epigenetics: The link between nature and nurture. *Mol Aspects Med.* 2013; 34(4), 753-764.
54. Treves DS. Review of Three DNA Analysis Applications for Use in the Microbiology or Genetics Classroom. *J Microbiol Biol Educ.* 2010;11(2): 186-8.
55. Velasco-Benítez CA, Moreno-Giraldo LJ. Celiac disease in children with Down syndrome. *Rev Chil Pediatr.* 2019; 90(6): 589-597.
56. Xu XF, Du LZ. Epigenetics in neonatal diseases. *Chin Med J.* 2010; 123(20): 2948-54.

57. Yang T, Low JJA, Woon ECY. A general strategy exploiting m5C duplex-remodelling effect for selective detection of RNA and DNA m5C methyltransferase activity in cells. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 10; 48(1): e5.
58. Yano N, Fedulov AV. Targeted DNA Demethylation: Vectors, Effectors and Perspectives. *Biomedicines.* 2023; 11(5): 1334.
59. Yu YR, Rodriguez JR. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Semin Pediatr Surg.* 2017; 26(6): 349-355.

Abreviaturas

5-caC: 5-carboxicitocina
5-fC: 5-formilcitosina
5-hmC: 5-hidroximetilcitosina
5-mC: 5-metilcitosina
5-MTHF: Metiltetrahidrofolato
AGO: Proteína Argonauta
anti-TG2: Anti-transglutaminasa 2
AUC: Área bajo la curva
BER: Enzima de reparación por escisión de bases
CeD: Enfermedad celíaca
DGCR8: Región crítica 8 del gen de síndrome de Di George
DMAP1: DNMT1-asociado a proteína 1
DNMT: DNA metiltransferasas
EA: Enfermedad de Alzheimer
EC: Enfermedad celíaca (abreviatura alternativa a CeD)
EII: Enfermedad inflamatoria intestinal
FAD: Flavin adenina dinucleótido
GEO: Gene Expression Omnibus
HAT: Histona acetiltransferasa
HDAC: Histona deacetilasa
HMTs: Histonas metiltransferasas
HSA21: Cromosoma 21
IFN: Interferón
JMJC: Jumonji C
k: Clúster
LSD: Desmetilasa específica a lisina
MDP: Peptidoglicano muramil dipéptido
miRNA: microRNA
NIR: Tasa de información nula

NLR: Receptores citosólicos tipo NOD
NOD2: Oligomerización de unión a nucleótidos 2
OR: Odd ratio
QUMA: Quantification Tool for Methylation Analysis
RISC: Complejo de silenciamiento inducido
SAM: S-adenosilmetionina
SD: Síndrome de Down
shRNA: RNA de horquilla corta
TDG: Timina DNA glicosilasa
TET: Proteína de translocación diez-once
THF: Tetrahidrofolato
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
WSS: Suma de cuadrados dentro de los clústeres