

# METILACIÓN CpG EN LA REGIÓN CRÍTICA DEL SÍNDROME DE DOWN (DSCR)

**Karla Alexandra Vinasco Pacheco**

*Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.*

*correo electrónico: karla.vinasco@gmail.com*

**Felipe García Vallejo**

*Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.*

*correo electrónico: labiomol@gmail.com*

## RESUMEN

La metilación CpG en el ADN es un mecanismo epigenético implicado en la regulación de la expresión génica, cuyos patrones son específicos para cada tipo de tejido, y su conocimiento resulta importante para el entendimiento de enfermedades como el Síndrome de Down (SD). Se tomaron como referencia los valores de metilación CpG consignados en las bases de datos del NCBI, UCSC y el proyecto NAME21, para genes de la Región Crítica del Síndrome de Down (DSCR), en la corteza prefrontal, en promotores de tipos celulares (Leucocitos normales, Fibroblastos normales, HEK293, Fibroblastos trisómicos 21 y HepG2) y la metilación génica (HeLa-S3, HepG2, IMR90 y Hepatocitos normales). En la corteza prefrontal, los genes DSCR6 y RCAN1, presentaron un elevado nivel metilación CpG. En los de promotores de DYRK1A, KCNJ6, BACE2 y RUNX1 se registraron los más altos porcentajes de metilación CpG. *In toto*, no se encontraron diferencias significativas entre la metilación de promotores en Fibroblastos normales y trisómicos, aunque se observaron diferencias entre los genes DSCR6, CLIC6, DSCAM y SH3BGR. Finalmente en los tipos celulares HEK293 y HeLa-S3 se determinó el mayor grado de metilación. Se puede concluir que la metilación en la corteza prefrontal para la DSCR es diferencial al igual que en los tipos celulares analizados. Los niveles de metilación obtenidos en los genes DSCR permiten inferir que algunos rasgos fenotípicos característicos del SD, como cardiopatías y déficit cognitivo, estarían bajo un control por metilación CpG de genes localizados en la DSCR.

*Palabras clave: cerebro humano, corteza prefrontal, epigenética, islas CpG, tipos celulares, metilación de ADN.*

## ABSTRACT

The methylation of CpG sites in the DNA is an epigenetic mechanism implicated in the regulation of genetic expression, whose patterns are tissue-specific, and its comprehension has become important to the understanding of diseases such as Down Syndrome (DS). CpG methylation values were taken as reference from NCBI, UCSC and Name21 Project databases, for Down Syndrome Critical Region (DSCR) genes in human prefrontal cortex, promoters in cell lines (healthy leukocytes, healthy fibroblasts, HEK293, trisomic 21 fibroblasts and HepG2) and genetic methylation (HeLa-S3, HepG2, IMR90 and healthy hepatocytes). DSCR6 and RCAN1 genes showed high levels of CpG methylation in the prefrontal cortex. DYRK1A, KCNJ6, BACE2 and RUNX1 promoters exhibited

the highest percentages of CpG methylation. *In toto*, there were not significant differences between the promoters methylation in healthy and trisomics fibroblasts; although in DSCR6, CLIC6, DSCAM and SH3BGR genes, differences were found. Finally, in the cell lines HEK293 and HeLa-S3, the highest level of methylation was determined. In conclusion, the methylation of the prefrontal cortex for the DSCR is differential, like the cell lines analyzed. The methylation levels obtained from the DSCR genes allow infer that some phenotypic features from DS such as cardiac pathologies and cognitive deficits could be under regulation by CpG methylation of genes located in the DSCR.

*Key words: cell lines, CpG islands, DNA methylation, epigenetics, human brain, prefrontal cortex.*

## INTRODUCCIÓN

Según Wolffe & Matzke (1999), la epigenética se refiere a "los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN", un mecanismo que permite utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales (Costello & Plass 2001) por medio de cambios en la estructura de la cromatina que incluyen la metilación CpG y la acetilación del ADN y modificaciones de histonas (Dorantes *et al.* 2004). En general, las Islas CpG (ICG) se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción (Antequera & Bird 1993, Ng *et al.* 1999) y no todas están metiladas en todos los estados del desarrollo ni en todos los tipos de tejidos (Bird 2002). Cuando la metilación de la IGC se efectúa apropiadamente, la expresión del gen corriente abajo tiende casi siempre a ser reprimido (Ushijima 2005).

Por otra parte, el síndrome de Down (SD) es una alteración cromosómica numérica, que consiste en un cromosoma 21 extra (o una parte) y es la causa genética más común de retardo mental en humanos con una incidencia de 1/600 -1/1000 nacidos vivos (Bittles *et al.* 2007, Hobbs *et al.* 2000). La hipótesis más aceptada para explicar la patología del SD, es el desbalance de la dosis en genes específicamente localizados en el cromosoma 21 denominados genes HSA21 (Mao *et al.* 2003).

Se ha identificado una región que contiene algunos de los genes candidatos que podrían explicar

las patologías asociadas con el SD, denominada “Región Crítica del Síndrome de Down” (DSCR), localizada en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 21 (21q22) (Montoya *et al.* 2008). Así, los efectos de la presencia de todo o de una parte del cromosoma 21 extra en las personas con SD incluyen múltiples alteraciones neurológicas y alta incidencia de la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Epstein 1990, Korenberg *et al.* 1990). Además, las trisomías alteran las marcas epigenéticas normales en todo el genoma, tal vez en respuesta a cambios en la dosificación del gen (Jones *et al.* 2013).

La característica más notoria en el fenotipo SD, es el déficit cognitivo (Colantuoni *et al.* 2000), por lo que aquí se resalta la corteza prefrontal (o córtex prefrontal) humana, perteneciente a la parte anterior de los lóbulos frontales. Esta estructura participa en la planificación de comportamientos cognitivamente complejos, en la expresión de la personalidad, en los procesos de toma de decisiones y en el ajuste del comportamiento social adecuado (Yang & Raine 2009). Es importante comprender el papel de la metilación en esta área del cerebro ya que se ha reportado que esta área es defectuosa en las personas con SD, presentándose los llamados “síntomas de la corteza prefrontal”: indiferencia, falta cooperación, apatía, depresión, deficiente comunicación social y más adelante puede manifestarse la EA (Flórez 2010).

Una de las bases que ha aportado resultados de metilación es la de la Universidad de California en Santa Cruz (“*University of California, Santa Cruz*”, UCSC, *Genome browser*) (Karolchik *et al.* 2008), generando un mapa de la metilación a partir de tejido cerebral humano (MeDIP CpG). Adicionalmente, dada la importancia de la metilación ICG en promotores, el proyecto NAME21 (Zhang *et al.* 2009) proporciona información sobre la metilación del ADN de 190 promotores de genes mediante el uso de conversión de bisulfito, subclonación y secuenciación, en cinco tipos de células humanas que incluyen: sangre periférica (principalmente Leucocitos), Fibroblastos normales, la línea celular de riñón de embrión HEK293, el tipo celular de carcinoma hepatocelular HepG2 y

células de fibroblastos derivados de un paciente con SD (Fibroblastos trisómicos). Los resultados están integrados en la plataforma del UCSC Genome Browser. Asimismo, la plataforma de Metilación CpG 450K *Bead Arrays* de *ENCODE / HAIB* (The ENCODE Project Consortium 2012), proporciona una sección en la que es posible visualizar el estado de metilación CpG específica en distintos tipos celulares, integrados en la plataforma humana de micro matrices 450K *Illumina Infinium*. La plataforma utiliza el ADN genómico tratado con bisulfito para analizar el estado de metilación de más de 450000 sitios CpG.

En el proyecto NAME21 (Zhang *et al.* 2009) las ICG fueron evaluadas según los siguientes criterios: proporción de GC de 0,5 o más, longitud superior a 200 pb, relación mayor que 0,6 en el número observado de dinucleótidos CG. El Porcentaje de CpG es la relación de bases de nucleótidos CpG (dos veces el recuento de CpG) a la longitud. La relación de CpG observado al esperado se calcula de acuerdo con la fórmula citada en Gardiner-Garden & Frommer (1987).

Por otro lado, algunos genes de la DSCR no se sobre-expresan en el cerebro fetal trisómico, indicando que el fenotipo SD no se puede explicar sólo por el efecto en el desbalance de la dosis génica. Los factores epigenéticos, ambientales y eventos estocásticos podrían desregular el transcriptoma trisómico (Montoya *et al.* 2011, Montoya *et al.* 2012). Realmente existe muy poco conocimiento sobre el estado de metilación del ADN en genes asociados con el SD, por lo cual es primordial investigar acerca del rol funcional de la metilación que existe entre los genes ubicados en la DSCR, para poder determinar sus posibles implicaciones con el SD, ampliando así el conocimiento a nivel epigenómico y su relación con lo trascríptómico. Esto sirve además, como base para posteriores estudios y avances en terapia génica (y/o genómica) comparándose la metilación de miles de genes en tejidos o células enfermas y normales, permitiendo así la identificación de múltiples dianas terapéuticas potenciales.

Ante este panorama surgen interrogantes como: ¿varían los patrones de metilación de estos genes

en la corteza prefrontal? ¿Existen diferencias entre los niveles de metilación de genes de la DSCR en diferentes tejidos? ¿La metilación de promotores en los genes DSCR depende del tipo celular estudiado? Para comprobar esto, el presente estudio buscó una aproximación a los perfiles de metilación CpG en genes DSCR, en la corteza prefrontal humana normal y en distintos tipos celulares (genes y promotores de genes), corroborándose posibles diferencias entre Fibroblastos normales y trisómicos. También, se buscaron posibles asociaciones entre la expresión y la metilación de algunos genes DSCR entre la corteza prefrontal y otras áreas del cerebro humano normal.

## **MÉTODOS**

### **Metilación en cerebro**

Se obtuvieron los datos de metilación en la corteza prefrontal del visor gráfico de la UCSC (Karolchik *et al.* 2008). Se generaron las imágenes con las escalas del visor, obteniéndose ventanas de 1500 pares de bases (pb) como recortes de imagen con el programa de uso libre Lightshot screenshot tool (2014). Estos recortes se analizaron con el programa ImageJ 1,48 (Abràmoff *et al.* 2004), usando una distancia invariable de 500 (pb), la cual corresponde a la escala horizontal o la cantidad de pb ocupadas por una ICG metilada. Para hacer las mediciones verticales, se usó la escala izquierda, pero en este caso el valor de la distancia conocida varió por ventana y por gen; correspondiendo al *Score* de metilación de cada ICG metilada (señal de metilación con valores entre 0-100). El número de ventanas analizadas fue dependiente del tamaño del gen, calculado como la razón entre el tamaño total del gen (pb) y 1500 pb. Se analizaron un total de 1217 ventanas. De aquí se obtuvieron un Promedio *Score* y un porcentaje de bases metiladas (%bmet). Este último se obtuvo con la siguiente

fórmula (1):

$$\%bmet = \left( \left( \sum \left( \frac{\text{pb ocupadas por ICG metiladas}}{1500} \right) \right) 100 \right) \quad (1)$$

El gen DSCAM se analizó con una resolución de 4500 pb debido a que su tamaño excedía por mucho los demás tamaños de los genes.

Se graficaron los datos con el fin de comparar los %bmet y los Promedios *Score*, obteniéndose cuáles de los genes se encuentran más metilados en esta región del cerebro y cuales tienen menor valor. Con estos se obtienen los valores de control o valores normales de los 19 genes DSCR para contrastar posteriormente con individuos con SD.

### **Metilación en tipos celulares plataforma NAME21**

Se obtuvo información de la metilación de promotores para 16 de los 19 genes DSCR por medio del proyecto NAME21 (Zhang *et al.* 2009) en cinco tipos de células humanas (Leucocitos, Fibroblastos, HEK293, HepG2 y Fibroblastos trisómicos). No se incluyeron los genes DSCR4, DSCR8 y DSCR10 debido a que no se encontró información sobre estos en la plataforma. Se obtuvieron el contenido en porcentaje de CG y la relación entre CpG observados y esperados. Se realizó una prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con 15 grados de libertad (N=16), empleando el programa Statistica 7 (StatSoft 2003) para establecer si el conjunto de los 16 genes cumplían con la probabilidad supuesta de encontrar en igual proporción los dinucleótidos AT y CG.

Por otro lado, con el fin de verificar la multicolinealidad en los porcentajes de metilación, se realizó el test de Bartlett con una significancia del 5 %, usando el software estadístico R (R Development Core Team 2008). Se comprobó la existencia de diferencias entre la varianza de tipos celulares y los promotores de los 16 genes DSCR. Por lo tanto, se realizó un análisis de correlación múltiple (índice de Pearson) para identificar los niveles más altos de correlación. Del análisis se eliminaron los Leucocitos debido a la alta colinealidad con los Fibroblastos y p-pareado < 0,05.

Se realizó una transformación con  $y' = \log_{10}(y + 1)$ . Se efectuó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para establecer qué componentes recogían la mayor variabilidad de la metilación de promotores en los tipos celulares, y de esta forma establecer patrones de mayor y menor metilación de promotores DSCR. “*Broken-Stick*” fue el método de selección. Dicho análisis se realizó con el software PAST 2.17C (Hammer *et al.* 2001).

Con el mismo programa, se evaluó si había diferencias significativas en la metilación de promotores de genes DSCR entre los Fibroblastos normales y los Fibroblastos trisómicos. Se probó la normalidad en ambos tipos celulares, con una prueba de Shapiro-Wilk, empleando una significancia del 5 %. Se rechazó la hipótesis de normalidad para los datos transformados y se efectuó una prueba de *t* pareada (no paramétrica) con el mismo valor de significancia, aceptándose la hipótesis nula.

### **Metilación en tipos celulares plataforma 450K Bead Arrays de ENCODE/HAIB**

Se analizó el estado de metilación CpG en cinco tipos celulares escogidos para comparar entre los 19 genes DSCR. Estos corresponden a: HeLa-S3, HepG2, IMR90 y Hepatocitos. Las puntuaciones (o *score*) asociadas a cada sitio metilado está codificado en colores como:

Naranja = ( $Score \geq 600$ ), metilación alta

Púrpura = ( $200 < Score < 600$ ), parcialmente metilado

Azul = ( $0 < Score \leq 200$ ), baja o ninguna metilación

Negro = (puntuación = 0), sin datos.

Dichos datos fueron generados en formato de imagen y procesados con el programa ImageJ 1.48 (Abràmoff *et al.* 2004). Se anotó cada valor de metilación CpG como la frecuencia correspondiente a cada nivel o estado de metilación, en cada uno de los genes. Se elaboraron dos tablas de frecuencias, una para establecer el estado de metilación en los genes sin discriminar el tipo celular y otra para indicar el estado de metilación en los tipos celulares sin discriminar el gen específico.

## RESULTADOS

### Metilación en cerebro

Se generaron los porcentajes de bases metiladas (%bmet) y el Promedio *Score* (Fig. 1) en genes DSCR de la corteza prefrontal. Los %bmet más altos correspondieron a los genes DSCR6 (6,875 %), DSCR5 (4,997 %), PRMT2 (4,869 %) y SH3BGR (4,690 %). Los %bmet más bajos corresponden a los genes DYRK1A (1,783 %), DSCR8 (1,985 %), DSCR4 (2,177 %), BRWD1 (2,322 %) y KCNJ6 (2,461 %). Con respecto al Promedio *Score*, a pesar de que se observa mayor heterogeneidad con respecto al %bmet, se mantienen en valores bajos. Un gen que presentó un Promedio *Score* mucho más alto que los demás, fue el gen RCAN1 (13,306 %), seguido por los genes DSCR6 (6,095 %), BACE2 (5,420 %), PSMG1 (4,982 %) y CLIC6 (4,776 %). Los genes que presentaron menor Promedio *Score* fueron: DYRK1A (1,725 %), BRWD1 (2,223 %), DSCR5 (2,545 %) y KCNJ6 (3,225 %).

Cabe destacar que los genes DYRK1A, BRWD1, DSCR8 y KCNJ6, tuvieron en conjunto los valores más bajos de %bmet y Promedio *Score*, por lo que podría inferirse que tienen niveles de metilación menores con respecto a los otros genes DSCR estudiados, en esta región del cerebro. Asimismo, el gen DSCR6 tiene valores altos de %bmet y Promedio *Score* por lo que en conjunto, podría decirse que tiene un perfil de metilación alto con respecto a los otros genes DSCR estudiados.

### Metilación en tipos celulares plataforma NAME21

Se observó que la mayoría de promotores de los 16 genes DSCR en estos, presentaron un porcentaje de GC superior al 60 % (a excepción de los genes PSMG1, DSCAM, SH3BGR), así como una relación de CpG obs/esp mayor a 0,6 en todas las regiones promotoras exceptuando el gen SH3BGR. En la Fig. 2 se puede observar que el mayor contenido de GC corresponde a la región promotora del gen DYRK1A (78,0 %), seguido de KCNJ6 (75,3 %), RUNX1 (73,2 %) y BACE2 (73,0 %).



Se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de dinucleótidos GC frente los AT, y probablemente se traten dichos sitios de islas CpG, según los resultados dados por la prueba de  $\chi^2$  ( $\chi^2 = 108,9838$ ,  $p < 0,05$ ,  $gl = 15$ , Tabla 1) rechazándose la hipótesis de igual proporción de dinucleótidos AT/GC.

Con respecto a la metilación de las regiones promotoras de los 16 genes DSCR mencionados (Tabla 2), se observó que el gen SH3BGR tiene los porcentajes más altos en todos los tipos celulares, encontrándose metilado en 98 % en los Leucocitos, seguido del gen DSCAM (43,9 %) y DSCR6 (13,2 %); pero se mantienen bajos en la mayoría de los genes (menor al 10 %). Los genes DSCR6, CLIC6, ETS2 tienen porcentajes de metilación muy altos en HEK293 mientras que los más bajos corresponden a los genes RCAN1 (0,0 %), DSCR3 (0,3 %), y RUNX1 (0,4 %). En HepG2, los valores más altos corresponden a los genes ETS2 (93,9 %), DSCR6 (89,2 %) y SH3BGR (79,1 %). Los tipos celulares Fibroblastos y Fibroblastos trisómicos difieren potencialmente en los genes DSCR6, CLIC6, SH3BGR, DSCAM y PRMT2. Se observaron diferencias entre la metilación de los promotores entre estos tipos celulares, en los genes SH3BGR (16,7 %), en DSCR6 (15,8 %) y DSCAM (15,5 %), a simple vista.

Por otro lado, al realizar el test de Bartlett se comprobó que la varianza no era la misma entre los tipos celulares y entre los promotores de los 16 genes DSCR (tipos celulares:  $gl = 4$ ,  $p = 0,008149$ ; promotores: Bartlett's  $gl = 14$ ,  $p < 2,2e^{-16}$ ). Al realizar análisis de correlación de Pearson se eliminó del análisis el tipo celular Leucocitos debido a la alta colinealidad con los Fibroblastos ( $r = 0,8839$ ) y un  $p$ -pareado  $< 0,0001$ . El test de Bartlett subsiguiente reveló que la varianza entre los tipos celulares y los promotores era la misma ( $p = 0,7234$ ), dado que fue eliminada la multicolinealidad. Al realizar el ACP se seleccionaron los dos primeros componentes, ya que estos recogían el 98,219 % de la varianza en la matriz de metilación por tipos celulares (Fig. 3 y 4).

El CP1 (86,590 %) se encuentra dominado en su eje positivo por ETS2, CLIC6, DSCR6 y SIM2; en

el eje negativo levemente dominado DSCR3 y RCAN1 (Fig. 3). En el CP2 (11,629 %) los genes con mayores eigenvalores positivos fueron ETS2, KCNJ6, DSCR6 y DSCAM. En el eje negativo fueron SIM2 y CLIC6 (Fig. 4).

Se presenta un mayor grado de metilación en promotores de los genes ETS2, DSCR6 y KCNJ6 en los tipos celulares HepG2 y HEK293 (Fig. 5). El gen SIM2, presentó una tendencia intrínseca a estar metilado en HEK293. Por otro lado, los Fibroblastos y Fibroblastos trisómicos presentaron niveles de metilación muy bajos en estos genes con respecto a los otras dos tipos celulares. El CP2 corroboró la baja metilación existente en los genes SIM2 y CLIC6 para los Fibroblastos y Fibroblastos trisómicos. Para el mismo componente, HepG2 y HEK293 presentaron alta metilación y los distinguieron de los demás tipos celulares. HEK293 se distinguió en cuanto al grado de metilación del gen KCNJ6 (mayor en HepG2) y SIM2 (mayor en HEK293).

Aunque los Leucocitos no se incluyeron en el ACP, presentaron un porcentaje de metilación muy alto en el promotor del gen SH3BGR a simple vista.

Además, no se encontraron diferencias significativas en la metilación de promotores de genes DSCR entre los Fibroblastos normales y trisómicos. Para probarlo, fue rechazada la normalidad (Fibroblasto  $p < 0,01$  y Fibroblasto trisómico  $p < 0,01$ ); y posteriormente en el test de Wicolxon (en la prueba de  $t$  pareada), no se encontraron diferencias significativas en el nivel de metilación de promotores de los 16 genes DSCR entre estos tipos celulares (Wicolxon  $p_{same} = 0,42158$ ;  $t_{test} = 0,6348$ ); a pesar de las marcadas diferencias mencionadas entre los valores de algunos genes DSCR.

### **Metilación en tipos celulares plataforma 450K Bead Arrays de ENCODE/HAIB**

En la Fig. 6 se puede observar que HEK293 posee una frecuencia mayor para el nivel de metilación más alto (130), la más baja de metilación intermedia (27) y la segunda más baja para el nivel de metilación menor (48); comportamiento similar en HeLa-S3, que posee una frecuencia mayor para el nivel de metilación más alto (121), la más baja de metilación intermedia (38) y la frecuencia más

baja para el nivel de metilación menor (45); pudiendo decirse de estos dos tipos celulares, que en ellos predomina una alta metilación.

Al observar la Fig. 7 se encontró que el gen SIM2 tiene una frecuencia muy alta de sitios CpG metilados con el nivel mayor o  $Score \geq 600$  (110), seguido del gen DSCAM (41), pudiendo indicar que estos genes poseen un nivel de metilación mayor con respecto a los otros genes para estos tipos celulares. Para este nivel ( $Score \geq 600$ ), las frecuencias más bajas corresponden a los genes PSMG1 (4), DSCR6 (5), DSCR10 (5), DSCR5 (6) y SH3BGR (8); de igual forma, en los genes PSMG1, DSCR6 y DSCR5 predominan las frecuencias del nivel de metilación menor ( $0 < Score \leq 200$ ); por lo que podría decirse que para estos genes, el nivel de metilación es bajo con respecto a los demás, en estos tipos celulares.

## **DISCUSIÓN**

Se obtuvieron los perfiles de metilación en 19 genes DSCR en la corteza prefrontal humana normal, cinco tipos celulares y 16 promotores de genes en otros cinco tipos celulares, donde se demostró que la metilación es diferencial y específica. Estos resultados son importantes ya que los patrones de metilación del ADN mantienen una regulación adecuada de la expresión génica y median un desarrollo normal del ser humano, por lo que su alteración se relaciona con enfermedad (Dorantes *et al.* 2004).

En primer lugar, el gen DYRK1A presentó niveles de metilación muy bajos con respecto a los demás. En este aspecto se ha sugerido que la fosforilación de la Presenilina 1 mediada por él, fosforila varios factores de transcripción, como CREB y NFAT, proteínas complejas endocíticas y productos génicos vinculados a la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Ryu *et al.* 2010). En modelos de ratón, se ha observado que Dyrk1a altera diferentes procesos celulares durante el desarrollo cerebral, cumpliendo roles como dar forma al cerebro y controlar la estructura de los componentes neuronales

(Guedj *et al.* 2012).

Asimismo, KCNJ6 y BRWD1 presentaron valores de metilación bajos. BRWD1 interactúa con el complejo SWI/SNF, alterando así las modificaciones de histonas y probablemente la expresión génica (Huang *et al.* 2003); así como también está involucrado en una variedad de procesos celulares (Maglott *et al.* 2011). Comparativamente, Fajardo (2012) reportó que KCNJ6 presenta una gran expresión en diferentes subestructuras del Lóbulo Límbico relacionadas con procesos cognitivos, el cual se ha mostrado que es un mediador de diferentes funciones motoras, teniendo un papel clave en el aprendizaje y memoria (Cramer *et al.* 2010); cuyos trastornos cognitivos, de memoria y motores en ratones con SD, pueden estar relacionados a la sobre-expresión o mal funcionamiento de este gen (Best *et al.* 2012, Harashima *et al.* 2006, Kobayashi *et al.* 2003, citados en Fajardo 2012).

Es posible relacionar entonces la baja metilación de KCNJ6, DYRK1A, y BRWD1 con una posible expresión notablemente alta en la corteza prefrontal, regulando así las funciones asociadas tales como el razonamiento y control de impulsos. De esta forma, alteraciones en estos tres genes producirían cambios morfológicos y cognitivos (Dekker *et al.* 2014, Guedj *et al.* 2012) dando lugar al retraso mental en el SD.

En este estudio se encontró que los genes RCAN1 y DSCR6 presentaron niveles altos de metilación en la corteza prefrontal. Ambos genes parecen influenciar el desarrollo del sistema nervioso central, y en particular, RCAN1 induce apoptosis neuronal complementando el mecanismo de depósito de placas amiloides relacionadas con el desarrollo de la EA (Ferrando-Miguel *et al.* 2004, Sun *et al.* 2011). Ambos genes se sobre-expresan en cerebro fetal por lo que es posible que contribuyan al déficit de aprendizaje y la memoria, tanto en la EA como en el SD, estableciéndose un puente entre ambas patologías (Ferrando-Miguel *et al.* 2004, Maglott *et al.* 2011, Park *et al.* 2009). Se ha reportado una elevada expresión del gen RCAN1 en corteza, cerebro medio y cerebelo de ratones SD (Amano *et al.* 2004), lo cual está anticorrelacionado con lo que ocurre en la corteza prefrontal

humana normal, en la que este gen presenta un nivel de metilación relativamente alto y podría tener baja expresión en esta zona.

El gen DSCR6 parece ser necesario para el desarrollo normal de las grandes arterias que llevan la sangre fuera del corazón, los músculos y los huesos de la cara y el cuello, y las glándulas, como el timo y paratiroides (Tan *et al.* 2013). Además, se registraron diferencias en el gen DSCR6 entre los promotores de fibroblastos trisómicos y normales lo cual es de resaltar ya que se esperaría que con el efecto de la triplicación aumente la expresión del gen el individuo SD, tal como lo explica Heard (2004) quien dice que se espera que las células trisómicas aumenten 1,5 veces los niveles de expresión de genes con respecto a las normales. También se observaron diferencias en la metilación del promotor del gen DSCAM, lo cual es contrario a lo esperado, pero se puede decir que hay un claro efecto de desregulación epigenética en los promotores de ambos genes, donde al disminuir la metilación probablemente aumente la expresión de este gen DSCR6 y al aumentar la metilación probablemente disminuya la expresión del gen DSCAM.

En la corteza prefrontal, el gen DSCAM presentó valores relativamente altos de metilación. Aunque no es posible comparar con otros genes del presente estudio, sí se puede decir que este gen tiene una metilación notable en esta área del cerebro. Es importante conocer su estado de metilación normal, ya que se ha propuesto que este gen puede contribuir a la característica de la enfermedad cardíaca congénita del SD (Jones *et al.* 2013). Las diferencias en los genes DSCAM y DSCR6 entre los fibroblastos indican una desregulación epigenética y es posible que influyeran la insuficiencia mitral (incapacidad de la válvula para cerrarse completamente), una patología valvular degenerativa que puede aparecer precozmente en personas con SD (Barlow *et al.* 2001, Freeman *et al.* 1998), además de la influencia potencial de DSCR6 en el desarrollo de la microcefalia con braquicefalia en individuos con SD (Weirgmann 2003).

Fajardo (2012) reportó que RCAN1 tiene una notable expresión en las Áreas Centrales, el Putamen

y Globo Pálido, mientras que PSMG1 mostró una expresión opuesta entre los Núcleos Cerebrales y el Lóbulo Límbico (alta actividad). Ambos genes en el presente estudio mostraron una elevada metilación, lo que indicaría que ambos genes tienden a estar regulados diferencialmente según el área cerebral.

En contraste, se reportó en este estudio una baja metilación registrada del gen PSMG1 en los tipos celulares, lo cual podría estar relacionado con que este gen está altamente expresado en todos los tejidos, incluyendo tejidos fetales, testículos adultos, y tipos celulares de cáncer (Song *et al.* 2008, Vidal-Taboada *et al.* 2000), siendo un factor importante asociado al SD cuya expresión se regula positivamente durante el desarrollo del cerebro Down (Mao *et al.* 2003, Possik *et al.* 2004). Asimismo, se observó que el gen DSCR5 tuvo una baja metilación para todas los tipos celulares en contraste con la alta metilación en la corteza prefrontal. Según Choi *et al.* 2001 y Shao *et al.* 2009, este gen está altamente expresado en tejidos como el hígado y el cerebro en desarrollo, pudiendo entonces estar reprimido en el cerebro adulto.

Adicionalmente, cabe destacar que los niveles de metilación de promotores son más similares entre los tipos de células relacionadas, como en HEK293 y HepG2 (Clark *et al.* 1994, Ehrich *et al.* 2008; Smiraglia *et al.* 2001), lo cual se comprobó en este estudio, y además tienen los valores más altos de metilación. Esto podría explicarse debido a que HepG2 es tipo celular de carcinoma de hígado humano (Ihrke *et al.* 1993), y los patrones de metilación podrían haberse alterado debido al desarrollo carcinogénico, ya que según Rodríguez *et al.* (2004), este proceso comprende una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que son acumuladas en la célula, incluyendo hipometilación y hipermetilación. Además, HEK293 es un tipo celular de riñón embrionario humano, que presentó también una alta metilación génica DSCR, la cual según Voet & Voet (2006), varía en el desarrollo embrionario primario temprano, aumentándose los niveles de metilación del embrión hasta casi llegar a ser gástrula. La alta metilación de HEK293 puede deberse a que, dado que la

metilación es un mecanismo pre-transcripcional de regulación de la expresión génica, pueda regular de manera estricta la expresión de los genes en estadios tempranos del desarrollo. Adicionalmente, la línea celular HeLa-S3 son células procedentes de cáncer de útero humano, la cual presentó un alto nivel de metilación génica DSCR con respecto a los demás tipos celulares, lo que puede ser comparable con lo dicho para el tipo celular HepG2.

Se observó un nivel de metilación bajo de los promotores de los genes ETS2, DSCR6, SIM2 y CLIC6 en Fibroblastos normales y trisómicos. Por su parte, el gen ETS2 codifica un factor de transcripción que regula genes implicados en el desarrollo y la apoptosis; y su proteína ha demostrado estar involucrados en la regulación de la telomerasa (Maglott *et al.* 2011). El patrón de expresión de SIM2 sugiere que podría estar implicado en la patogénesis de algunas de las características morfológicas y anomalías cerebrales observadas en el SD, dado su papel en la neurogénesis de las células de la línea media en el sistema nervioso central (Dahmane *et al.* 1995, Maglott *et al.* 2011).

Del mismo modo, CLIC6 contribuye en la modificación del ciclo celular, la apoptosis, la adhesión celular y la motilidad celular (Suh & Yuspa 2005). Los promotores en Fibroblastos trisómicos presentaron una mayor metilación para este gen que en los Fibroblastos normales, lo cual es de destacar debido a que se ha demostrado que su expresión anormal de células trisómicas, podría alterar los mecanismos normales del desarrollo del corazón (Egeo *et al.* 2000).

Como se mencionó anteriormente, se espera que las células trisómicas exhiban un aumento de 1,5 veces en los niveles de expresión de genes, aunque las modificaciones epigenéticas pueden alterar tales efectos (Heard 2004). En este estudio se encontró que no hay diferencias significativas en la metilación de promotores de genes DSCR entre los Fibroblastos normales y Fibroblastos trisómicos, por lo que es posible que muchos de la mayoría de estos promotores no presenten una super-expresión dada la triplicación en la dosis génica y, por el contrario, sean reprimidos por este mecanismo epigenético.

Por otra parte, los Leucocitos presentaron una metilación de promotor muy alta en el gen SH3BGR, el cual parece estar implicado en la morfogénesis cardíaca y se expresa en el músculo esquelético (Hildmann *et al.* 1999, Hubert *et al.* 1997, Korenberg *et al.* 1992); por lo que puede esperarse que este gen esté bastante reprimido debido a la especificidad funcional de los leucocitos, que son células del sistema inmune que participan en la defensa del cuerpo (LaFleur-Brooks 2008), y es posible que su alteración contribuya al defecto congénito cardíaco en el SD (Kerkel *et al.* 2010, Korenberg *et al.* 1992), así como desviaciones y alteraciones en genes DSCR podrían causar inmunodeficiencia reportada en el SD (Ram & Chinen 2011).

Por último, se encontró una desviación en las secuencias de promotores de los 16 genes evaluados, entre los porcentajes de dinucleótidos GC y AT, por lo que es probable que se traten dichos sitios de ICG (Bird 2002, Jaenisch & Bird 2003). De esta forma, los promotores con mayor porcentaje de GC fueron los de los genes DYRK1A, BACE2, KCNJ6 y RUNX1, que están implicados en varios procesos celulares en el sistema nervioso central y en determinadas modificaciones de histonas (Dekker *et al.* 2014, Dierssen 2006, Flórez 2010, Maglott *et al.* 2011).

Se puede concluir que la metilación en la corteza prefrontal en genes DSCR es diferencial y que los genes destacados con mayor o menor metilación, tienen una alta correlación con funciones asociadas al desarrollo del sistema nervioso y comunicación celular. Además, que los tipos celulares embrionarias y cancerosas tienen mayor metilación que los normales. También, que pese a no haber diferencias estadísticamente significativas entre la metilación de Fibroblastos normales y trisómicos, hay genes en los que se observan diferencias y son muy importantes en el desarrollo morfológico y funcional cardíaco. Dadas las funciones de los genes que revelaron diferencias o tienen una metilación notoria, es posible relacionar las alteraciones a los valores normales como consecuencias en el deterioro cognitivo y de la memoria, así como los déficits congénitos cardíacos encontrados en el SD.



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco al Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis (LABIOMOL) por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo de grado en sus instalaciones. Debo dar gracias a Cristian Román por su extensa colaboración. Agradezco a mi familia quien me brindó todo el apoyo moral y emocional para sacar adelante este trabajo, en especial a Juan Manuel Alvear. Por último, agradezco especialmente al profesor Felipe García por ser guía durante la realización de este trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Amano, K., Sago, H., Uchikawa, C., Suzuki, T., Kotliarova, S. E., Nukina, N., Epstein, C. J. and Yamakawa, K. (2004). “Dosage-dependent over-expression of genes in the trisomic region of Ts1Cje mouse model for Down syndrome”, *Human Molecular Genetics.*, Vol. 13, pp. 1333-40.
- Antequera, F. and Bird, A. (1993). “Number of CpG islands and genes in human and mouse”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 90, pp. 11995-9.
- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J. and Ram, S. J. (2004). “Image Processing with ImageJ”, *Biophotonics International*, Vol. 11 No. 7, pp. 36-42.
- Barlow, G. M., Chen, X. N., Shi, Z.Y., Lyons, G. E., Kurnit, D. M., Celle, L., Spinner, N. B., Zackai, E., Pettenati, M. J., Van Riper, A. J., Vekemans, M. J., Mjaatvedt, C. H. and Korenberg, J. R. (2001). “Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene”, *Genetics in Medicine*, Vol. 3, pp. 91-101.
- Best, T., Cramer, N., Chakrabarti, L., Haydar, T. and Galdzicki, Z. (2012). “Dysfunctional hippocampal inhibition in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome”, *Experimental Neurology*, Vol. 233, pp. 749-757.
- Bird, A. (2002). “DNA methylation patterns and epigenetic memory”, *Genes & Development*, Vol. 16, pp. 6-21.
- Bittles, A. H., Bower, C., Hussain, R. and Glasson, E. J. (2007). “The four ages of Down syndrome”, *European Journal of Public Health*, Vol. 17, pp. 221-5.
- Choi, D.-K., Suzuki, Y., Yoshimura, S., Togashi, T., Hida, M., Taylor, T. D., Wang, Y., Sugano, S., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001). “Molecular cloning and characterization of a gene expressed in mouse developing tongue, mDscr5 gene, a homolog of human DSCR5 (Down syndrome critical region gene 5)”, *Mammalian Genome*, Vol. 12, pp. 347-351.
- Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. and Frommer, M. (1994). “High sensitivity mapping of methylated cytosines”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, pp. 2990-7.
- Colantuoni, C., Purcell, A. E., Bouton, C. M. L. and Pevsner, J. (2000). “High throughput analysis of gene expression in the human brain”, *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 59, pp. 1-10.
- Costello, J. F. and Plass, C. (2001). “Methylation matters”, *Journal of Medical Genetics*, Vol. 38, pp. 285-303.
- Cramer, N., Best, T., Stoffel, M., Siarey, R. and Galdzicki, Z. (2010). “GABAB–GIRK2-Mediated signaling in Down Syndrome”, *Advances in Pharmacology*, Vol. 58, pp. 397-426.
- Dahmane, N., Charron, G., Lopes, C., Yaspo, M. L., Maunoury, C., Decorte, L. and Delabar, J. M. (1995). “Down syndrome-critical region contains a gene homologous to *Drosophila* sim expressed during rat and human central nervous system development”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 92 No. 20, pp. 9191-5.
- Dekker, A. D., De Deyn, P. P. and Rots, M. G. (2014). “Epigenetics: The neglected key to minimize learning and memory deficits in Down syndrome”, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Vol.45C, pp. 72-84.
- Dierssen, M. (2006), available at: “El gen DYRK1A”, [www.down21.org/](http://www.down21.org/) (accessed 31th July 2014).

- Dorantes, M., Téllez, N., Cerbón, M., López, M. and Cervantes, A. (2004). “Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica”, *Revista de Investigación Clínica*, Vol. 56 No. 1, pp. 56-71.
- Egeo, A., Di Lisi, R., Sandri, C., Mazzocco, M., Lapide, M., Schiaffino, S. and Scartezzini, P. (2000). “Developmental expression of the SH3BGR gene, mapping to the Down syndrome heart critical region”, *Mechanisms of Development*, Vol. 90, pp. 313-316.
- Ehrich, M., Turner, J., Gibbs, P., Lipton, L., Giovanneti, M., Cantor, C. and van den Boom, D. (2008) “Cytosine methylation profiling of cancer cell lines”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.105, pp. 4844-9.
- Epstein, C.J. (1990). “The consequences of chromosome imbalance”, *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 7 (Suppl.), pp. 31-7.
- Fajardo, M. D. (2012). “Análisis sistémico de la expresión diferencial de 38 genes localizados en la Región Crítica Del Síndrome De Down (DSCR) en el cerebro humano”. Trabajo de grado, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Ferrando-Miguel, R., Cheon, M. S. and Lubec, G. (2004). “Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain (Part V): overexpression of phosphatidylinositol-glycan class P protein (DSCR5)”, *Amino Acids*, Vol. 26, pp. 255-61.
- Flórez, J. (2010). “Enfermedad de Alzheimer y Síndrome de Down”, *Revista Síndrome de Down*, Vol. 27, pp. 63-76.
- Freeman, S. B., Taft, L. F., Dooley, K., Allran, K., Sherman, S. L., Hassold, T. J., Khoury, M. J. and Saker, D. M. (1998). “Population-Based Study of Congenital Heart Defects in Down Syndrome”, *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 80, pp. 213-7.
- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987). “CpG islands in vertebrate genomes”, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 196 No. 2, pp. 261-282.
- Guedj, F., Pereira, P. L., Najas, S. Barallobre, M. J., Chabert, C., Souchet, B., Sebric, C., Verney, C., Herault, Y., Arbones, M. and Delabar, J. M. (2012). “DYRK1A: a master regulatory protein controlling brain growth”, *Neurobiology of Disease*, Vol. 46 No. 1, pp.190-203.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Ryan, P. D. (2001). “PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis”, *Paleontología electrónica*, Vol. 4 No. 1, p. 9.
- Harashima, C., Jacobowitz, M., Jassir, W., Borke, C., Best, T., Siarey, J. and Galdzicki, Z. (2006). “Abnormal expression of the GIRK2 potassium channel in hippocampus, frontal cortex and substantianigra of Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome”, *The Journal of Comparative Neurology*, Vol. 494, pp. 815-833.
- Heard, E. (2004). “Recent advances in X-chromosome inactivation”, *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 16, pp. 247-255.
- Hildmann, T., Kong, X., O’Brien, J., Riesselman, L., Christensen, H.M., Dagand, E., Lehrach, H. and Yaspo, M.L. (1999). “A contiguous 3-Mb sequence-ready map in the S3-MX1 region on 21q22.2 based on high-throughput nonisotopic library screenings”, *Genome Research*, Vol. 9, pp. 360-372.
- Hobbs, C., Sherman, S.L., Yi, P., Hopkins, S.E., Hine, R.J., Progibna, M., Rozen, R. and James, S.J. (2000). “Polymorphisms in genes involved in Folate Metabolism as Maternal Risk Factors for Down Syndrome”, *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 67., pp. 623-630.

- Huang, H., Rambaldi, I., Daniels, E. and Featherstone, M. (2003). "Expression of the Wdr9 gene and protein products during mouse development", *Developmental Dynamics*, Vol. 227, pp. 608-614.
- Hubert, R.S., Mitchell, S., Chen, X.-A., Ekmekji, K., Gadowski, C., Sun, Z., Noya, D., Kim, U.J., Chen, C., Shizuya, H., Simon, M., de Jong, P.J. and Korenberg, J.R. (1997). "BAC and PAC contigs covering 3.5 Mb of the Down syndrome congenital heart disease region between D21S55 and MX1 on chromosome 21", *Genomics*, Vol. 41, pp. 218-226.
- Ihrke, G., Neufeld, E. B., Meads, T., Shanks, M. R. , Cassio, D., Laurent, M., Schroer, T. A., Pagano, R. E. and Hubbard, A. L. (1993). "WIF-B cells: an in vitro model for studies of hepatocyte polarity", *Journal of Cell Biology*, Vol. 123 No. 6, pp. 1761-1775.
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals", *Nature Genetics*, Vol. 33(Suppl.), pp. 245-254.
- Jones, M., Farré, P., McEwan, L., Macisaac, J., Watt, K., Neumann, S., Emberly, E., Cynadera, M., Virij-Babul, N. and Kobor, M. (2013). "Distinct DNA methylation patterns of cognitive impairment and trisomy 21 in down syndrome", *BMC Medical Genomics*, Vol. 6 No. 58, pp. 1-11.
- Karolchik, D., Kuhn, R. M., Baertsch, R., Barber, G. P., Clawson, H., Cline, M. S., Diekhans, M., Dreszer, T. R., Fujita, P. A., Guruvadoo, L., Haeussler, M., Harte, R. A., Heitner, S., Hinrichs, A. S., Learned, K., Lee, B. T., Li, C. H., Raney, B. J., Rhead, B., Rosenbloom, K. R., Sloan, C. A., Speir, M. L., Zweig, A. S., Haussler, D., Kuhn, R. M. and Kent, W. J. (2008). "The UCSC Genome Browser Database", *Nucleic Acids Research*, Vol. 36, pp. 773-9.
- Kerkel, K., Schupf, N., Hatta, K., Pang, D., Salas, M., Kratz, A., Minden, M., Murty, V., Zigman, W. B., Mayeux, R. P., Jenkins, E. C., Torkamani, A., Schork, N. J., Silverman, W., Croy, B. A. and Tycko, B. (2010). "Altered DNA Methylation in Leukocytes with Trisomy 21", *PLoS Genetics*, Vol. 6 No. 11, pp. 1-13.
- Kobayashi, T., Washiyama, K. and Ikeda, K. (2003). "Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by fluoxetine (Prozac)", *British Journal of Pharmacology*, Vol. 138, pp. 1119-1128.
- Korenberg, J., Kawashima, H., Pulst, S., Ikeuchi, T., Ogasawara, N., Yamamoto, K., Schonberg, S., West, R., Allen, L., Magenis, E., Ikawa, K., Taniguchi, N. and Epstein, C. (1990). "Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype", *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 47, pp. 236-246.
- Korenberg, J. R., Bradley, C. and Disteche, C. M. (1992). "Down syndrome: molecular mapping of congenital heart disease and duodenal stenosis", *The American Journal of Human Genetics*, Vol. 50, pp.294-302.
- LaFleur-Brooks, M. (2008). *Exploring Medical Language: A Student-Directed Approach*, 7a. edición, Mosby Elsevier. St. Louis, Missouri, USA.
- Lightshot screenshot tool (2014), available at: "Lightshot screen capture tool software", <http://app.pntrscr.com> (accessed 15th October 2013).
- Maglott, D., Ostell, J, Pruitt, K. D. and Tatusova, T. (2011). "Entrez Gene: gene-centered information at NCBI". *Nucleic Acids Research*, Vol. 39, pp. D52-D57.

- Mao, R., Zielke, C. L., Zielke, H. R. and Pevsner, J. (2003). “Global up-regulation of chromosome 21 gene expression in the developing down syndrome brain”, *Genomics*, Vol. 81, pp. 457-67.
- Montoya, J. C., Satizábal, J. M, Soto, J., García, F. and Sánchez, A. (2008). “Perspectiva y comprensión bioquímica del síndrome de Down”, *El Hombre y la Máquina*, Vol. 30, pp. 119-129.
- Montoya, J. C., Soto, J., Satizábal, J. M., Sánchez, A. and García-Vallejo, F. (2011). “Genomic study of the critical region of chromosome 21 associated to Down syndrome”, *Colombia Médica*, Vol. 42, pp. 26-38.
- Montoya, J. C., Peña, A., Satizábal, J. M. and García-Vallejo, F. (2012). “Análisis Sistémico *In Silico* de la Expresión Diferencial de Genes Localizados en la Región Crítica del Síndrome de Down (DSCR) en el Cerebro Humano”, *Revista Facultad de Medicina*, Vol. 20 No. 1, pp. 15-26.
- Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A. (1999). “MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex”, *Nature Genetics*, Vol. 23, pp. 58-61.
- Park, J., Oh, Y. and Chung, K. (2009). “Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: DYRK1A and RCAN1”, *BMB reports*, Vol. 42 No. 1, pp. 6-15.
- Possik, P. A., Sommer, C. A., Issa Hori, J., Machado-Santelli, G. M., Jamur, M. C. and Henrique-Silva, F. (2004). “DSCR2, a Down syndrome critical region protein, is localized to the endoplasmic reticulum of mammalian cells”, *European Journal of Histochemistry (EJH)*, Vol. 48 No. 3, pp. 267-72.
- R Development Core Team (2008) available at: “R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing”, [www.R-project.org](http://www.R-project.org) (accessed 30th July 2014).
- Ram, G. and Chinen, J. (2011). “Infections and immunodeficiency in Down syndrome”, *Clinical & Experimental Immunology*, Vol. 164, pp. 9-16.
- Rodríguez, M., Téllez, N., Cerbón, M. A., López, M. and Cervantes, A. (2004). “Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica”, *Revista de investigación clínica*, Vol. 56 No. 1, pp. 56-71.
- Ryu, Y. S., Park, S. Y., Jung, M. S., Yoon, S. H., Kwen, M. Y., Lee, S. Y., Choi, S. H., Radnaabazar C., Kim M. K., Kim H., Kim K., Song W. J. and Chung S. H. (2010). “Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: a functional link between Down syndrome and Alzheimer’s disease”, *Journal of Neurochemistry*, Vol. 115, pp. 574-84.
- Shao, R., Kirkness, E. F. and Barker, S. (2009). “The single mitochondrial chromosome typical of animals has evolved into 18 minichromosomes in the human body louse, *Pediculus humanus*”, *Genome Research*, Vol. 19, pp. 904-912.
- Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Fruhwald, M. C., Dai, Z., Held, W. A., Costello, J. F., Lang, J. C., Eng, C., Lil, B., Wright, F. A. Caligiuril, M. A. and Plass, C. (2001). “Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies”, *Human Molecular Genetics*, Vol. 10, pp. 1413-9.
- Song, J., Seo, S., Kim, J., Paik, S. and Chung, K. (2008). “Down syndrome critical region 2 protein inhibits the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor b in HEK293 cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 376, pp. 478-482.

- StatSoft, Inc. (2003), available at “STATISTICA (data analysis software system), Version 7”, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com) (accessed 20th July 2014).
- Suh, K. S. and Yuspa, S. H. (2005). “Intracellular chloride channels: critical mediators of cell viability and potential targets for cancer therapy”, *Current pharmaceutical design*, Vol. 11 No. 21, pp. 2753-64.
- Sun, X., Wu, Y., Chen, B., Zhang, Z., Zhou, W., Tong, Y., Junying, Y., Xia, K., Gronemeyer, H. and Flavell, R. (2011). “Regulator of calcineurin 1 (RCAN1) facilitates neuronal apoptosis through caspase-3 activation”, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, pp. 9049-9062.
- Tan, X., Anzick, S. L., Khan, S. G., Ueda, T., Stone, G., Digiovanna, J. J., Tamura, D., Wattendorf, D., Busch, D., Brewer, C. C., Zalewski, C., Butman, J. A., Griffith, A. J., Meltzer, P. S. and Kraemer, K. H. (2013). “Chimeric Negative Regulation of p14ARF and TBX1 by a t(9;22) Translocation Associated with Melanoma, Deafness, and DNA Repair Deficiency”, *Human Mutation*, Vol. 34 No. 9, pp. 1250-9.
- The ENCODE Project Consortium. (2012). “An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome”, *Nature*, Vol. 489, pp. 57-74.
- Ushijima, T. (2005). ”PERSPECTIVES: Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells”, *Nature Reviews*, Vol.5, pp. 223-231.
- Vidal-Taboada, J.M., Lu, A., Pique, M., Pons, G., Gil, J. and Oliva, R. (2000). “Down syndrome critical region gene 2: expression during mouse development and in human cell lines indicates a function related to cell proliferation”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 272, pp. 156-163.
- Voet, D. and Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*, Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Weirgmann, R. (2003). “Problemas otorrinolaringológicos en el paciente con Síndrome de Down”, *Pediatría al Día*, Vol. 19 No. 2, pp. 17-21.
- Wolffe, A. P. and Matzke, M. A. (1999). “Epigenetics: regulation through repression”, *Science*, Vol. 286, pp. 481-6.
- Yang, Y. and Raine, A. (2009). “Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis”, *Psychiatry Research*, Vol. 174 No. 2, pp. 81-8.
- Zhang, Y., Rohde, C., Tierling, S., Jurkowski, T.P., Bock, C., Santacruz, D., Ragozin, S., Reinhardt, R., Groth, M., Walter, J. and Jeltsch, A. (2009). “DNA Methylation Analysis of Chromosome 21 Gene Promoters at Single Base Pair and Single Allele Resolution”, *PLoS Genetics*, Vol. 5 No. 3, pp. 1-15.

**Tabla 1.** Valores en porcentaje del contenido de GC observado y esperado (50 % para todos los 16 genes DSCR en promotores de tipos celulares). Se indican los valores calculados para el  $\chi^2$ . Se obtuvo un valor de  $\chi^2 = 108,9838$ , con  $gl = 15$ ,  $p < ,000\ 000$ . Se observan sumas desiguales entre los GC observados y esperados.

<b>Gen</b>	<b>% GC observado</b>	<b>% GC esperado</b>	<b><math>O - E</math></b>	<b><math>\frac{(O-E)^2}{E}</math></b>
RCAN1	61,9	50,0	11,9	2,8
PSMG1	50,4	50,0	0,4	0,0
DSCR3	66,5	50,0	16,5	5,4
DSCR5	72,5	50,0	22,5	10,1
DSCR6	68,6	50,0	18,6	6,9
CLIC6	67,5	50,0	17,5	6,1
SIM2	65,7	50,0	15,7	4,9
ETS2	62,8	50,0	12,8	3,3
PRMT2	71,0	50,0	21,0	8,8
BACE2	73,0	50,0	23,0	10,6
DYRK1A	78,6	50,0	28,6	16,4
BRWD1	71,3	50,0	21,3	9,1
RUNX1	73,2	50,0	23,2	10,8
KCNJ6	75,3	50,0	25,3	12,9
DSCAM	54,4	50,0	4,4	0,4
SH3BGR	55,2	50,0	5,2	0,5
Suma	1067,9	800	267,9	109,0

**Tabla 2.** Porcentajes de metilación de regiones promotoras en 16 genes DSCR para los tipos celulares humanos Leucocitos, HEK293, HepG2, Fibroblastos normales y trisómicos.

<b>Gen</b>	<b>Leucocitos</b>	<b>HeK293</b>	<b>HepG2</b>	<b>Fibroblastos</b>	<b>Fibroblastos trisómicos</b>
RCAN1	0,4	0,0	0,0	0,3	0,3
PSMG1	0,5	0,9	0,3	0,4	0,6
DSCR3	0,3	0,3	0,0	1,1	0,2
DSCR5	0,0	4,7	4,6	3,3	3,3
DSCR6	13,2	98,6	89,2	32,5	16,7
CLIC6	0,0	95,1	29,4	6,9	0,0
SIM2	0,0	63,1	10,4	7,8	3,7
ETS2	0,6	96,5	93,9	11,6	2,1
PRMT2	2,3	9,4	2,4	0,0	5,7
BACE2	0,8	0,9	0,7	0,4	0,2
DYRK1A	0,4	1,7	0,3	0,0	0,0
BRWD1	4,0	5,8	6,1	4,6	5,3
RUNX1	0,6	0,4	0,3	0,6	1,0
KCNJ6	3,8	2,1	19,6	9,7	5,5
DSCAM	43,9	22,8	32,4	12,9	28,4
SH3BGR	98,1	72,1	79,1	64,8	81,5



**Figura 1.** Gráfico donde se indican el %bmet (eje izquierdo) y el Promedio *Score* de metilación (eje derecho) de los 19 genes analizados en la DSCR. Se observa que el gen DSCR6 posee el más alto mientras que el DYRK1A posee el más bajo de este grupo de genes. El gen RCAN1 posee un promedio Promedio *Score* mucho más alto que el promedio de los demás genes. En color inverso se muestra el gen DSCAM.

**Figura 2.** Porcentajes de GC (%GC) y relación de CpG observado/esperado, en 16 regiones promotoras de los genes RCAN1, PSMG1, DSCR3, DSCR5, DSCR6, CLIC6, SIM2, ETS2, PRMT2, BACE2, DYRK1A, BRWD1, RUNX1, KCNJ6, DSCAM, SH3BGR, por medio de los amplicones del proyecto NAME21(Zhang et al. 2009).

**Figura 3.** “Loadings” o cargas del Componente Principal 1 (CP1; 86,590 %) del ACP, dominado en su eje positivo por los genes ETS2, CLIC6, DSCR6 y SIM2; en el eje negativo ligeramente dominado por DSCR3 y RCAN1 principalmente.

**Figura 4.** “Loadings” o cargas del Componente Principal 2 (CP2; 11,629 %) del ACP, dominado en su eje positivo por los genes ETS2, KCNJ6, DSCR6 y DSCAM; en el eje negativo por SIM2 y CLIC6 principalmente.

**Figura 5.** Gráfico del ACP, donde se indican los dos componentes principales (CP1 en el eje vertical y CP2 en el eje horizontal).

**Figura 6.** Niveles de metilación los tipos celulares humanos Hepatocitos, HeLa-S3, HEK293, HepG2 e IMR90. Se indican tres niveles de metilación y sus respectivas frecuencias para cada tipo celular.

**Figura 7.** Niveles de metilación de 19 genes DSCR sin discriminar tipo celular. Se indican tres niveles de metilación y sus respectivas frecuencias para cada gen.













