

**HALLAZGOS MOLECULARES Y PATOLÓGICOS EN PLACENTAS DE  
PACIENTES CON SÍNDROME DE DOWN**

**RUSBELL JOHANNA MARTINEZ PINILLA**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**BOGOTÁ D.C.**

**2014**

**HALLAZGOS MOLECULARES Y PATOLÓGICOS EN PLACENTAS DE  
PACIENTES CON SÍNDROME DE DOWN**

**RUSBELL JOHANNA MARTINEZ PINILLA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CON ENFASIS EN GENÉTICA HUMANA**

**DIRECTOR**

**PAOLA ANDREA AYALA RAMIREZ. Bac, Msc.  
INSTITUTO DE GENETICA HUMANA  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**CODIRECTOR**

**REGGIE GARCIA ROBLES. MD, PhD.  
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN NUTRICION, GENETICA Y  
METABOLISMO  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS  
BOGOTA D.C.**

**2014**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la resolución No 13 de julio de 1946**

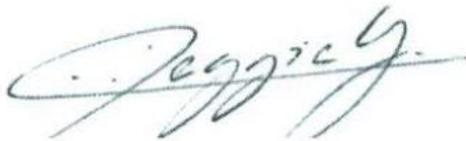
“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar verdad y justicia”

**HALLAZGOS MOLECULARES Y PATOLÓGICOS EN PLACENTAS DE  
PACIENTES CON SÍNDROME DE DOWN**

**RUSBELL JOHANNA MARTINEZ PINILLA**



**DIRECTOR  
PAOLA ANDREA AYALA RAMIREZ. Bac, Msc.  
INSTITUTO DE GENETICA HUMANA  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

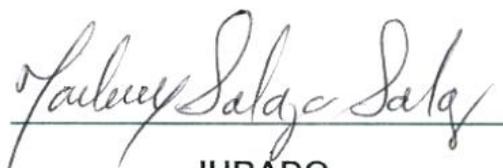


---

**CODIRECTOR  
REGGIE GARCIA ROBLES. MD, PhD.  
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN NUTRICION, GENETICA Y  
METABOLISMO  
UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

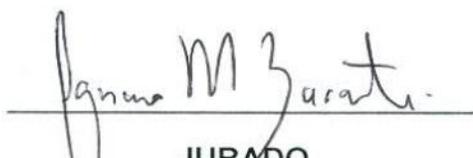
**HALLAZGOS MOLECULARES Y PATOLÓGICOS EN PLACENTAS DE  
PACIENTES CON SÍNDROME DE DOWN**

**RUSBELL JOHANNA MARTINEZ PINILLA**



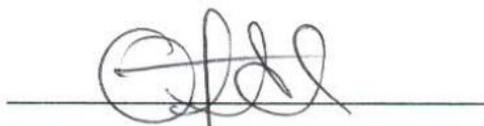
JURADO

**DRA. MARLENY SALAZAR. PhD.  
DOCENTE  
UNIVERSIDAD DEL QUINDIO**



JURADO

**DR. IGNACIO ZARANTE. PhD.  
DIRECTOR DEPARTAMENTO DE FISILOGIA Y DOCENTE  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**



JURADO

**DRA. OLGA LUCIA SOPO. Msc.  
JEFE AREA DE HISTOCOMPATIBILIDAD E INMUNOGENETICA  
FUNDACION CARDIOVASCULAR DE COLOMBIA**

**HALLAZGOS MOLECULARES Y PATOLÓGICOS EN PLACENTAS DE  
PACIENTES CON SÍNDROME DE DOWN**

**RUSBELL JOHANNA MARTINEZ PINILLA**

---

**DRA. INGRID SCHULLER  
DECANA ACADEMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

---

**DR. MANUEL FRANCO  
DIRECTOR DE POSGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS**

*A Dios por guiar y bendecir mi camino,  
A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional en todos  
los momentos de mi vida y a mi esposo por su amor y buenos consejos.*

## AGRADECIMIENTOS

- A la Vicerrectoria Académica de la Pontificia Universidad Javeriana por la financiación aportada al proyecto N° 4368.
- Al Departamento de Patología del Hospital Universitario San Ignacio y al Dr. Jaramillo por ayudarnos con la consecución de las muestras y permitirnos utilizar las instalaciones para el desarrollo de este estudio.
- A la Dra. Mercedes Olaya, patóloga del Hospital Universitario San Ignacio por su ayuda y por aportar sus conocimientos en este estudio.
- A Derna Luz Castro, histotecnóloga del Hospital Universitario San Ignacio por toda su colaboración en el desarrollo de la tesis.
- A la Dra. Paola Ayala, docente del Instituto de Genética de la Pontificia Universidad Javeriana por su orientación, paciencia y por compartir sus conocimientos conmigo.
- Al Dr. Reggie García, docente de la Universidad el Bosque por ser una guía durante el desarrollo de este estudio y por compartir sus conocimientos.
- A la Dra. Martha Bermudez, docente del Instituto de Genética de la Pontificia Universidad Javeriana por el acompañamiento incondicional y por regalarme sus valiosos conocimientos.
- A los pacientes por permitirnos la utilización de sus muestras.
- Y a todas las personas que ayudaron al desarrollo y culminación de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	18
1. FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	20
1.1. Justificación.....	22
2. MARCO TEORICO.....	23
2.1. Revisión histórica.....	23
2.2. Definición.....	23
2.3. Epidemiología.....	24
2.4. Etiología.....	25
2.5. Clasificación.....	26
2.5.1. Trisomía 21 Universal.....	26
2.5.2. Mosaicismo.....	27
2.5.3. Traslocación Robertsoniana.....	28
2.6. Presentación fenotípica.....	29
2.7. Patologías asociadas.....	30
2.8. Diagnostico prenatal.....	31
2.8.1. Diagnostico prenatal no invasivo.....	31
2.8.2. Diagnostico prenatal invasivo.....	33
2.8.3. Asesoría genética.....	33
2.9. Manejo Clínico.....	34
2.10. Genética del cromosoma 21.....	34
2.10.1. Región critica del cromosoma 21.....	35
2.10.2. Genes dosis sensible localizados en DSCR y asociados a SD.....	36
2.11. Metabolismo del folato y la homocisteina y su relación con el SD....	37
2.11.1. Acido fólico.....	37
2.11.1.1. Estructura química.....	37
2.11.1.2. Ciclo del folato.....	37
2.11.1.3. Absorción y transporte del folato.....	38

2.11.1.4.	Funciones del folato.....	38
2.11.2.	Homocisteina.....	39
2.11.2.1.	Estructura química.....	39
2.11.2.2.	Metabolismo de la homocisteina.....	39
2.11.3.	Síndrome de Down y CBS.....	40
2.11.3.1.	Estructura de la CBS.....	40
2.11.3.2.	Sobreexpresión de la CBS en SD.....	41
2.12.	Placenta.....	43
2.12.1.	Definición.....	43
2.12.2.	Desarrollo de la placenta.....	43
2.12.3.	Morfología de la placenta.....	47
2.12.3.1.	Estructura macroscópica.....	47
2.12.3.2.	Estructura microscópica.....	47
2.12.4.	Circulación placentaria.....	48
2.12.4.1.	Circulación fetal.....	48
2.12.4.2.	Circulación materna.....	48
2.12.5.	Fisiología de la placenta.....	49
2.12.6.	Cordón umbilical.....	49
2.12.7.	Líquido amniótico.....	50
2.12.8.	Alteraciones placentarias y síndrome de Down.....	50
3.	OBJETIVOS.....	53
3.1.	Objetivo general.....	53
3.2.	Objetivos específicos.....	53
4.	FORMULACION DEL PROBLEMA.....	53
5.	METODOLOGIA.....	54
5.1.	Población de estudio.....	54
5.1.1.	Criterios de selección de las muestras.....	54
5.1.1.1.	Criterios de inclusión.....	54
5.1.1.1.1.	Criterios de inclusión (casos).....	54
5.1.1.1.2.	Criterios de inclusión (controles).....	54
5.1.1.2.	Criterios de exclusión.....	54

5.1.1.2.1. Criterios de exclusión (casos).....	54
5.1.1.2.2. Criterios de exclusión (controles).....	55
5.1.2. Variables.....	55
5.1.2.1. Variables independientes cualitativas.....	55
5.1.2.2. Variables independientes cuantitativas.....	55
5.2. Obtención y recolección de las muestras.....	55
5.3. Extracción de ARN a partir de placentas embebidas en parafina....	56
5.4. Cuantificación de ARN.....	56
5.5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	56
5.6. Curvas de calibración.....	57
5.7. Inmunohistoquímica.....	58
5.8. Hematoxilina eosina.....	59
5.9. Manejo estadístico de los datos.....	59
6. RESULTADOS.....	60
6.1. Descripción de la población.....	60
6.2. PCR en tiempo real.....	61
6.2.1. Estandarización de las condiciones de la PCR en tiempo real.....	61
6.2.2. Cistationina $\beta$ Sintasa (CBS).....	62
6.2.3. 18S ribosomal (18S).....	64
6.2.4. Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH).....	65
6.2.5. Curvas de calibración.....	67
6.2.6. Resultados de la cuantificación absoluta de ARNm del gen CBS en muestras de placentas embebidas en parafina.....	68
6.2.6.1. Genes housekeeping.....	69
6.2.6.2. CBS.....	69
6.3. Inmunohistoquímica.....	71
6.4. Hematoxilina eosina.....	75
7. DISCUSION.....	81
8. CONCLUSIONES.....	87
9. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES.....	89
10. BIBLIOGRAFIA.....	90

## INDICE DE TABLAS

Tabla 01. Presentación fenotípica del Síndrome de Down.....	29
Tabla 02. Descripción de las sondas y primers utilizados para la PCR en tiempo real de los genes CBS, GAPDH y 18-S.....	58
Tabla 03. Características demográficas de la población.....	61
Tabla 04. Condiciones estandarizadas de la PCR en tiempo real para cada gen..	62
Tabla 05. Condiciones de Amplificación de CBS.....	62
Tabla 06. Condiciones de Amplificación de 18S.....	64
Tabla 07. Condiciones de Amplificación de GAPDH.....	66
Tabla 08. Valores de las curvas de calibración de los genes CBS, 18S y GAPDH.....	68
Tabla 09. Valores normalizados con 18S y GAPDH de los niveles de ARNm de CBS en placentas embebidas en parafina.....	70
Tabla 10. Niveles de expresión de la proteína CBS en placentas embebidas en parafina.....	74
Tabla 11. Hallazgos microscópicos en la evaluación histopatológica de las placentas.....	76
Tabla 12. Estudios que han reportado medición de CBS.....	83

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cariotipo que corresponde a un individuo con SD universal debido a que se observa un cromosoma extra en el par 21.....	27
Figura 2. Cariotipo que corresponde a una trisomía con traslocación robertsoniana. Se observan dos cromosomas 21 y un cromosoma extra 21 fusionado al cromosoma 14.....	28
Figura 3. Ruta Bioquímica del metabolismo de la Homocisteína-Metionina. La Homocisteína utiliza dos vías para su metabolización: la vía de la remetilación (izquierda arriba) y la vía de transulfuración (izquierda abajo).....	40
Figura 4. Locus del gen CBS dentro de la DSCR.....	41
Figura 5. Las flechas indican las alteraciones directas e indirectas en los metabolitos, inducidos por la sobreexpresión de CBS en las personas con SD, modificado de.....	42
Figura 6. Formación de las vellosidades primarias, secundarias y terciarias.....	45
Figura 7. Se observa amplificación en el marcador D21S1435 de tres picos en proporción 1:1:1 por lo cual sugiere una trisomía en el cromosoma 21.....	60
Figura 8. Amplificación de CBS por PCR en tiempo real. En la figura se observa Amplificación de una muestra (rosado) y un control negativo (morado).....	63
Figura 9. Amplificación de CBS por PCR en tiempo real visualizado en gel de poliacrilamida al 12%.....	63
Figura 10. Amplificación de 18S por PCR en tiempo real. En la figura se observa Amplificación de una muestra (rosado) y un control negativo (negro).....	65
Figura 11. Amplificación de 18S por PCR en tiempo real visualizado en gel de poliacrilamida al 12%.....	65

Figura 12. Amplificación de GAPDH por PCR en tiempo real. En la figura se observa Amplificación de una muestra (verde) y un control negativo (azul).....	66
Figura 13. Amplificación de GAPDH por PCR en tiempo real visualizado en gel de poliacrilamida al 12%.....	67
Figura 14. Cuantificación de los niveles de ARNm de CBS normalizando con 18S.....	70
Figura 15. Cuantificación de los niveles de ARNm de CBS normalizando con GAPDH.....	71
Figura 16. Control positivo hepatocarcinoma.....	72
Figura 17. Localización citoplasmática de CBS en placentas. 40X.....	72
Figura 18. Marcación intensa de la proteína CBS en placenta. 40X.....	73
Figura 19. Marcación moderada de la proteína CBS en placenta. 16X.....	73
Figura 20. Marcación leve de la proteína CBS en placenta. 40X.....	74
Figura 21. Niveles de expresión de la proteína CBS (%) en placentas embebidas en parafina.....	74
Figura 22. Aspecto general de la placenta con trastorno cromosómico. Edema de vellosidades, bordes vellositarios irregulres (circinados), en el centro, inclusión de trofoblasto y cisterna. Hematoxilina-Eosina 4X.....	77
Figura 23. Vellosidad de bordes irregulares. Hematoxilina-Eosina 16X.....	77
Figura 24. Inclusión de trofoblasto. Hematoxilina-Eosina 40X.....	78
Figura 25. Inclusión de trofoblasto. Hematoxilina-Eosina 40X.....	78
Figura 26. Control normal placenta de 21 semanas de gestación. Hematoxilina eosina 4x.....	79
Figura 27. Control normal placenta de 21 semanas de gestación. Hematoxilina eosina 10x.....	79
Figura 28. Control normal placenta de 21 semanas de gestación. Hematoxilina eosina 40x.....	80

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ARN a partir de tejido embebido en parafina.....	105
Anexo 2. Protocolo PCR en tiempo real para la curva estándar y las muestras de los genes CBS, 18S y GAPDH.....	107
Anexo 3. Protocolo PCR convencional para amplificar y reamplificar CBS, 18S y GAPDH.....	109
Anexo 4. Protocolo de purificación con el kit wizard® SV gel and PCR clean-up system de los reamplificados de CBS, 18S y GAPDH.....	112
Anexo 5. Protocolo inmunohistoquímica para cbs en placentas embebidas en parafina utilizando el kit immunocruz™ mouse abc staining system: sc-2017.....	114
Anexo 6. Formato utilizado para lectura de los hallazgos histopatológicos en placentas embebidas en parafina.....	117

## GLOSARIO

- **Embrión:** Ser humano con periodo de desarrollo desde la implantación hasta la semana octava del desarrollo.
- **Recién nacido:** Es el feto expulsado o extraído completamente de la madre, independientemente de la duración del embarazo.
- **Feto:** Ser humano con periodo de desarrollo desde la novena semana hasta el nacimiento.
- **Citotrofoblasto:** Es la capa más interna del trofoblasto, unidas al sincitiotrofoblasto del embrión y que funciona como un anclaje para el corión embrionario al endometrio materno.
- **Sincitiotrofoblasto:** Es la capa más externa del trofoblasto embrionario, adosada al citotrofoblasto, cuya función es erosionar los capilares del endometrio materno en el desarrollo de la circulación placentaria.
- **Placenta:** Es un órgano transitorio presente en los mamíferos placentarios y que relaciona estrechamente al bebé con su madre, satisfaciendo las necesidades de respiración, nutrición y excreción del feto durante su desarrollo.
- **Síndrome de Down:** Es un trastorno genético causado por la presencia de una copia extra del cromosoma 21. Se caracteriza por la presencia de un grado variable de discapacidad cognitiva y la presencia de rasgos fenotípicos característicos que le dan un aspecto reconocible.

## ABREVIATURAS

SD	Síndrome de Down
CBS	Cistationina $\beta$ Sintasa
DSCR	Región crítica del cromosoma 21
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ADN	Acido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
ECLAMC	Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas
GAPDH	Gliceraldehido-6-fosfato deshidrogenasa
Chr21	Cromosoma 21

## RESUMEN

El Síndrome de Down (SD) es la aneuploidía más frecuente entre los recién nacidos vivos con una prevalencia global de 1 por cada 600 a 700 nacidos y es causado por la presencia de una copia extra del cromosoma 21, generando una variedad de hallazgos fenotípicos que incluyen retraso mental, alteraciones craneofaciales, retraso en el crecimiento, déficit neurológico, defectos cardíacos, trastornos mieloproliferativos y alteraciones gastrointestinales, entre otros. Los hallazgos fenotípicos en los individuos con trisomía 21 parecen ser el resultado de la síntesis excesiva de uno o más genes que se encuentran en la región crítica del cromosoma 21 (DSCR). El gen Cistationina  $\beta$  Sintasa (CBS) se encuentra localizado en el cromosoma 21 (21q22.3) y se cree que su sobreexpresión participa en la presentación de algunos hallazgos fenotípicos en el Síndrome de Down. El objetivo de este estudio es comparar los niveles de expresión de proteína y ARNm de la CBS y los hallazgos histopatológicos entre placentas de recién nacidos sanos y placentas de recién nacidos con Síndrome de Down.

**Métodos:** Se desarrollo un estudio de casos y controles para evaluar los niveles de expresión de la CBS y los hallazgos histopatológicos en placentas. Se analizaron un total de 22 placentas mediante las técnicas PCR en tiempo real e inmunohistoquímica, de las cuales 6 placentas corresponden a fetos con Síndrome de Down y 16 a placentas de fetos sanos. Los análisis estadísticos de la expresión del ARNm de la CBS fueron evaluados por medio de la prueba Mann-Whitney, los niveles de la proteína por medio de la prueba de  $X^2$  de acuerdo a una escala de intensidad de la expresión y para los hallazgos histopatológicos se compararon variables dicotómicas con la prueba exacta binomial con el programa Epidat con un nivel de confianza del 95%. **Resultados:** Se encontró aumento estadísticamente significativo en la expresión de ARNm ( $p= 0,0465$ ) y en los niveles de proteína ( $p= 0,009$ ) del gen CBS en placentas provenientes de recién nacidos con SD con respecto a los controles. En cuanto a los hallazgos histopatológicos evidenciados en placentas con SD, se encontró presencia de bordes circinados ( $p= 0,0007$ ) e inclusiones de trofoblasto ( $p= 0,0037$ ).

**Conclusión:** Los resultados sugieren que la sobreexpresión de la CBS a nivel de placentas de fetos con trisomía 21 podría desarrollar una alteración directa en la vía de la homocisteína- metionina e indirecta en el ciclo del folato.

**Palabras clave:** *Cistationina  $\beta$ -Sintasa (CBS), Síndrome de Down, Placenta.*

## 1. FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION

El SD es la aneuploidía más frecuente, con una incidencia de aproximadamente 1 en 700 recién nacidos vivos, resultante de la presencia de una copia extra del cromosoma humano 21 (1). La trisomía 21 determina una compleja patología metabólica y genética (2). Las manifestaciones más frecuentes, incluyen retraso mental, anomalías morfológicas de la cabeza y las extremidades, baja estatura e hipotonía. Otras características clínicas son malformaciones congénitas, en particular del corazón, obstrucciones de las vías gastrointestinales, aumento del riesgo de leucemia, y la aparición temprana de Alzheimer (3). A pesar de la gran cantidad de estudios clínicos y citogenéticos se conoce poco sobre la fisiopatología molecular de esta enfermedad, sin embargo el estudio de las regiones comprometidas en diferentes individuos con SD identificó una región común con un grupo de genes candidatos que podrían explicar los hallazgos de la enfermedad. Esta región es conocida como "región crítica para el Síndrome de Down" y se localiza en el extremo terminal del brazo largo del cromosoma 21 (21q22) (4). Se cree que la síntesis excesiva de productos de múltiples genes en el cromosoma 21 están involucrados con el fenotipo clínico así como en la patogénesis de las anomalías inmunológicas, endocrinas, bioquímicas y neurológicas características del SD (3). La CBS es una enzima que participa en las vías metabólicas de la homocisteína-metionina e indirectamente en la vía del folato (6). El gen *CBS* se encuentra localizado en el cromosoma 21 (21q22.3) y se cree que su sobreexpresión participa en la presentación de algunos hallazgos fenotípicos en el Síndrome de Down (3,5).

La placenta es un órgano transitorio de origen fetal que cumple múltiples funciones, entre ellas funciones metabólicas (7). Las vías metabólicas de la homocisteína- metionina y folato en la placenta aún no son claras, sin embargo, en un estudio previo se evaluó la expresión de varios genes en placentas que codifican para enzimas, transportadores y receptores que participan en el metabolismo del folato y la homocisteína-metionina, encontrando cambios que

indican favorecimiento de la activación de las vías del folato y remetilación de la homocisteína con expresión mínima del gen *CBS* (8). Cabe resaltar que en los individuos con SD la actividad aumentada de la CBS podría alterar el metabolismo de la homocisteína- metionina de tal manera que compromete a la resíntesis de metionina dependiente de folato, la disminución de homocisteína disponible generaría una “trampa de folato o trampa de metilo” que lleva a un déficit funcional de folato que podría contribuir al cuadro metabólico en esta compleja patología genética (2). La evidencia sugiere que el metabolismo placentario de la homocisteína podría jugar un papel importante en el desarrollo fetal (8) y se considera importante el papel de la sobreexpresión del gen *CBS* en el SD (6). Además, se ha postulado que el compromiso del metabolismo de la homocisteína- metionina y el folato podrían jugar un papel importante en el desarrollo de la discapacidad intelectual, anomalías cardíacas e incremento en el riesgo de leucemia en individuos con SD. Es probable que la comprensión de estas importantes vías metabólicas tenga un impacto en la prevención, diagnóstico, pronóstico y manejo del SD (1).

Por otro lado, se ha postulado que la presencia de genes de la región crítica de SD sobreexpresados en las placentas de estos pacientes podrían ser candidatos a marcadores de RNA de esta patología que podrían ser detectados tempranamente en sangre materna (126).

## **1.1. Justificación**

En Colombia, según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), la segunda causa de mortalidad en menores de un año para el 2009 fueron las anomalías congénitas, con una tasa de 2,95 muertes infantiles por cada 1000 nacidos (65). El SD hace parte de las anomalías congénitas más frecuentes en la población colombiana con una prevalencia estimada de 17.82:10.000 (9,10), siendo considerado un problema de salud pública en nuestro país. Hasta el momento existen pocas publicaciones a nivel mundial sobre hallazgos moleculares y patológicos en placentas con SD por lo que es necesaria la realización de estudios que contribuyan a un mejor entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad y que permitan identificar posibles marcadores tempranos de la misma.

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1. Revisión Histórica**

El dato antropológico más antiguo que se conoce del SD tiene su origen en el siglo VII D.C., que corresponde a un cráneo sajón con alteraciones óseas compatibles con trisomía 21 (11). El primer informe documentado de un niño con SD se atribuye a Étienne Esquirol en 1838, denominándose en sus inicios “cretinismo” o “idiotia furfurácea”. P. Martin Duncan en 1886 describe textualmente a “una niña de cabeza pequeña, redondeada, con ojos achinados, que dejaba colgar la lengua y apenas pronunciaba unas pocas palabras”. En ese mismo año el médico inglés John Langdon Down publicó un reporte clínico titulado: “Observaciones en un grupo étnico de idiotas”, en el cual describió las características faciales, la coordinación neuromuscular anormal y las dificultades que enfrentaban con el lenguaje oral, llamando a este grupo de pacientes “mongólicos” debido a las similitudes faciales de estos individuos con las razas nómadas del centro de Mongolia (12, 13, 14). Tras varias comunicaciones científicas, en 1909 G. E. Shuttleworth menciona como factor de riesgo la edad materna avanzada para la aparición del SD. Para el año 1932, se hace referencia por primera vez a un reparto anormal de material cromosómico como posible causa del SD y en 1959 Lejeune, Gautrier y Turpin demuestran que las personas con SD portan 47 cromosomas (13).

### **2.2. Definición**

El síndrome de Down es la anomalía cromosómica más común entre los recién nacidos vivos causado por la presencia de una copia extra del cromosoma 21; es la causa genética más frecuente de retraso mental, se caracteriza por una variedad de rasgos dismórficos y está asociado a compromiso cardíaco, digestivo y endocrino (11, 12, 13,14, 19, 43).

La expresividad de las características fenotípicas del SD son muy variables en las personas afectadas (43).

### **2.3. Epidemiología**

El síndrome de Down es una de las malformaciones más comunes en la mayoría de las poblaciones. A nivel mundial, la frecuencia global es de 10 por cada 10.000 nacidos vivos (59) y se relaciona estadísticamente con un incremento del riesgo a una edad materna superior a los 35 años. El riesgo de niños con Síndrome de Down se ha documentado en 1 de cada 1.250 niños para una mujer de 25 años de edad, 1 de cada 1.000 a los 30 años, 1 de cada 400 a los 35 años, 1 de cada 100 a los 40 años y 1 de cada 30 a los 45 años (63).

La base de datos de vigilancia europea de malformaciones congénitas EUROCAT reporta una frecuencia total para SD de 9.96 por 10.000 nacidos vivos apoyado en el registro de los países europeos en el periodo de 2007 a 2011. Sin embargo, hay notables diferencias en la prevalencia que dependen prioritariamente de sus variables socioculturales y del proceso reproductivo. En países donde el aborto es ilegal, como ocurre en Irlanda, la prevalencia es mayor de 25.34 por 10.000 nacimientos vivos (59, 60). En España en cambio, la prevalencia es menor de 7.24 por 10.000, debido quizá a la alta tasa de abortos provocados de fetos con síndrome de Down que alcanza el 77% (61, 62).

Un estudio realizado en 10 regiones de Estados Unidos en el periodo de 1999 a 2003 describe una prevalencia general para trisomía 21 de 11.8 por 10.000 nacidos vivos (64), lo cual concuerda con lo reportado en las bases de datos de la CDC (centro para el control y prevención de enfermedades). Según informe de la Red de vigilancia de anomalías congénitas de Canadá (CCASN), la prevalencia de SD entre los años 2004 al 2007 fue de 14.44 por 10.000 nacidos vivos.

El ECLAMC (Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas) es un programa de investigación clínica y epidemiológica de los factores de riesgo de la etiología de las anomalías congénitas en hospitales Latino Americanos. Comenzó a operar en 1967 como una investigación limitada a la ciudad de Buenos Aires, Argentina, y gradualmente se expandió hasta integrar a 9 países de América del Sur, entre ellos Colombia. Los datos reportados en el

periodo de 1995 al 2008 para la prevalencia de SD por 10.000 nacidos vivos por países es: Argentina 20.1, Bolivia 15.5, Brasil 17.2, Chile 24.7, Ecuador 14.8, Paraguay 19.8 Uruguay 13.2, Venezuela 14.9 y Colombia 17.8 (9, 10).

Otro estudio publicado en Colombia en el 2012 de 46 hospitales de Bogotá entre enero de 2001 a noviembre de 2010 reporta una frecuencia menor a la reportada en el 2009, que corresponde a 10,27 por 10.000 nacidos vivos (65).

#### **2.4. Etiología**

Aproximadamente en el 95% de los casos, el cromosoma extra se produce como resultado de la no disyunción meiótica. En la mayoría de los casos el error se produce en la separación de los cromosomas homólogos durante la ovogénesis materna con mayor frecuencia en la meiosis I (MI) (75%) que en la meiosis II (MII) (25%). Aunque en menor proporción la segregación anormal puede ser de origen paterno (5%) o de origen mitótico (2%) (54).

La edad materna avanzada y la recombinación alterada son dos factores de riesgo asociados con el síndrome de Down, para los casos en los que ha surgido el cromosoma extra en el ovocito. El proceso de la ovogénesis es largo y requiere una detención meiótica, lo que lo hace más vulnerable a la mala segregación de los cromosomas en comparación con la espermatogénesis. Por otra parte, con el aumento de edad, hay una rápida degradación de las proteínas celulares implicadas en la formación del huso que impone el riesgo de la no disyunción tanto en MI como en MII (54, 55, 58).

La recombinación, iniciada en el ovario fetal, estabiliza la tétrada y asegura una adecuada disyunción. Pero el proceso es aleatorio y puede estar ausente incluso en euploidias. Esta meiosis chiasmata contribuye al riesgo de la no disyunción meiotica y este riesgo aumenta con la edad debido al rápido deterioro de las proteínas de ovario que conforman el sistema de vigilancia. Se ha demostrado que los cromosomas que sufren el proceso de la no disyunción a menudo muestran patrones alterados de recombinación. Por lo tanto, el microambiente del ovario de las mujeres mayores parece ser más propenso a errores debido a la acumulación

de defectos relacionados con el medio ambiente y la edad (54, 56). Otros estudios también han demostrado que tanto la ausencia de quiasmas como la colocación subóptima de quiasmas imponen susceptibilidad para la no disyunción del cromosoma 21 (57). Un único cambio telomérico conduce a un aumento del riesgo de error en MI, mientras que los intercambios pericentroméricos aumentan el riesgo de error en MII (54).

En cuanto a la traslocación robertsoniana y el mosaicismo son generados por alteraciones estructurales directas o inherentes del cigoto (4).

## **2.5. Clasificación**

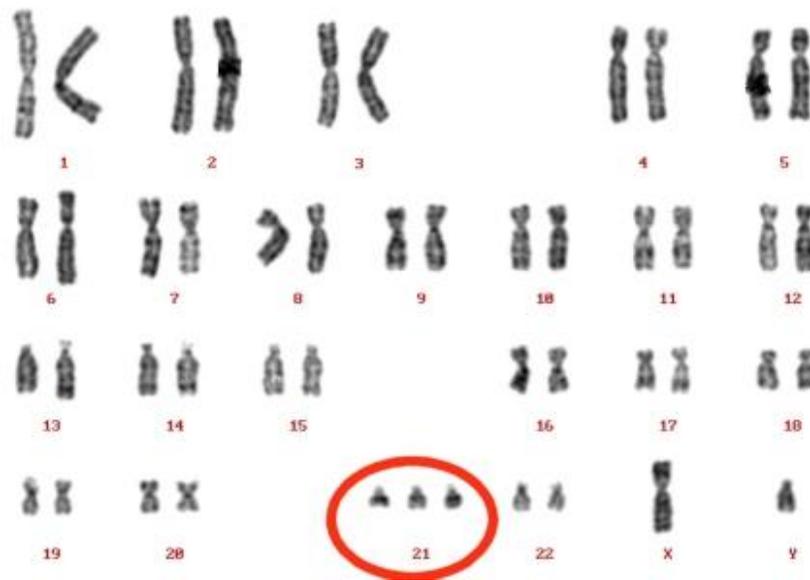
Desde el punto de vista citogenético el SD pueden originarse por: 1) trisomía 21 Universal, 2) mosaicismo y 3) traslocación robertsoniana (19).

### **2.5.1. Trisomía 21 universal**

Este hallazgo se observa en el 95% de los casos de SD. Existen tres copias libres del cromosoma 21, en vez de las dos normales y su ocurrencia está en función de la edad materna (Figura 1) (19).

El cromosoma extra es debido a un error durante la primera división meiótica llamándose a esta variante, “trisomía libre” o regular. El error se debe en este caso a una disyunción incompleta del material genético de uno de los progenitores. (En la formación habitual de los gametos el par de cromosomas se separa, de modo que cada progenitor sólo transmite la información de uno de los cromosomas de cada par. Cuando no se produce la no disyunción se transmiten ambos cromosomas). La causa cierta de este fenómeno aún se ignora y existen diferentes teorías al respecto. Una de las más aceptadas refiere que la no disyunción estaría relacionada con menor recombinación durante la meiosis (16, 17, 18).

Se ha determinado que el cromosoma 21 extra es de origen materno en el 95% de los casos de SD y solo alrededor del 5% de origen paterno (16, 17, 18).



**Figura 1.** Cariotipo que corresponde a un individuo con SD universal debido a que se observa un cromosoma extra en el par 21(19).

### 2.5.2. Mosaicismo

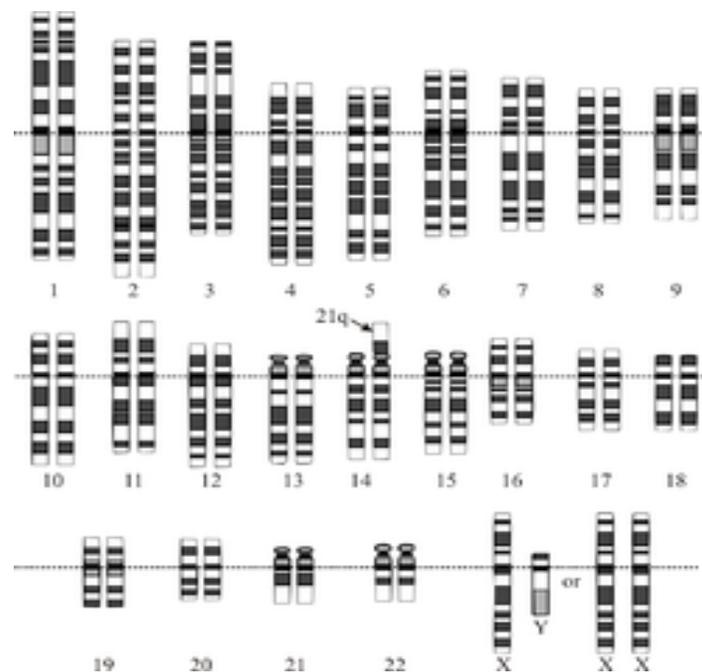
Se presenta en alrededor del 2- 4% de los casos clínicamente detectados como SD. Es la presencia de 2 o más líneas celulares del mismo origen con diferente constitución cromosómica en un mismo individuo. Se observan dos líneas celulares: una normal y otra con trisomía 21 libre (19). Se ha establecido que los mosaicismos pueden originarse de dos formas:

- **Meióticos:** La concepción fue trisómica, pero durante los ciclos de división celular posteriores se origina una línea celular que pierde la copia extra del cromosoma 21. Se estima que la mayoría de los casos de SD en mosaico corresponden a este origen, que estaría vinculado con la edad materna (20, 21).
- **Mitóticos:** La concepción es cromosómicamente normal, pero en algún momento de las sucesivas divisiones celulares ocurre la no disyunción, durante la mitosis, y se origina la línea trisómica (20, 21).

### 2.5.3. Traslocación Robertsoniana

Esta alteración estructural se observa en alrededor del 2- 4% de los casos de síndrome de Down. Se denomina traslocación robertsoniana a la fusión de dos cromosomas acrocéntricos por su centrómero, con pérdida del material satélite de sus brazos cortos, formándose así un cromosoma compuesto por los brazos largos de los cromosomas fusionados, con lo cual una copia del cromosoma 21 está unida a un cromosoma del grupo D (13-14-15) o a un cromosoma del grupo G (21-22) (Figura 2). No se ha encontrado vinculación entre esta alteración y la edad materna. Las translocaciones pueden ser de origen familiar (alguno de los padres la porta en forma balanceada) en alrededor del 50% de los casos, o de "*novo*", es decir no heredadas (19, 22).

La traslocación del cromosoma 21 con un cromosoma del grupo D corresponde a un origen familiar en el 95% de los casos, mientras que la que involucra al grupo G se observa en el 5% (19, 22).



**Figura 2.** Cariotipo que corresponde a una trisomía con traslocación robertsoniana. Se observan dos cromosomas 21 y un cromosoma extra 21 fusionado al cromosoma 14 (22).

## 2.6. Presentación fenotípica

La expresividad de los rasgos fenotípicos del síndrome es sumamente amplia y difiere de un sujeto a otro (Tabla 1) (13, 14, 19, 23, 24, 25).

<b>Estructura</b>	<b>Características fenotípicas del SD</b>
Cráneo	<ul style="list-style-type: none"><li>- Retraso en la osificación de los huesos del cráneo.</li><li>- Cierre tardío de las fontanelas.</li><li>- Hipoplasia o aplasia de los senos frontales.</li><li>- Leve microcefalia con braquicefalia y occipital aplanado.</li></ul>
Cuello	<ul style="list-style-type: none"><li>- En general es corto y piel redundante en la nuca.</li></ul>
Ojos	<ul style="list-style-type: none"><li>- Los ojos son “almendrados”, y en el iris suele observarse una pigmentación moteada conocida como “manchas de Brushfield”.</li><li>- Las hendiduras palpebrales siguen una dirección oblicua hacia arriba y afuera</li><li>- Presentan un pliegue de piel que cubre el ángulo interno y la carúncula del ojo (epicanto).</li><li>- En menor proporción presentan nistagmo horizontal, estrabismo, catarata uni o bilateral y dacriostenosis</li></ul>
Nariz	<ul style="list-style-type: none"><li>- Es pequeña con la raíz nasal aplanada y las narinas tienen una orientación antevertida</li></ul>
Boca	<ul style="list-style-type: none"><li>- Es pequeña con paladar estrecho y con protrusión lingual hacia afuera ya sea por la hipotonía muscular, que permite el descenso de la mandíbula, o bien por lo estrecho y pequeño de la cavidad bucal en donde no cabe la lengua o por un crecimiento de la lengua (macroglosia).</li><li>- En una proporción menor de los casos micrognatia (mandíbula muy pequeña), retrognatia (ausencia de proyección de la mandíbula), paladar hendido y labio fisurado.</li></ul>
Orejas	<ul style="list-style-type: none"><li>- Son pequeñas con un hélix muy plegado y habitualmente con ausencia del lóbulo.</li><li>- El conducto auditivo puede ser muy estrecho en algunos de los pacientes con SD.</li></ul>
Manos	<ul style="list-style-type: none"><li>- Son pequeñas y cuadradas con metacarpianos y falanges cortas (braquidactilia) y clinodactilia por</li></ul>

	<p>hipoplasia de la falange media del 5º dedo.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- En la palma de la mano se encuentra un solo pliegue, uni o bilateral llamado “pliegue palmar único”.</li> </ul>
Pies	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sandal gap que consiste en la separación entre el primero y segundo dedo del pie, así como un surco plantar que se inicia en la parte media de la planta del pie y se dirige hacia el espacio interdigital entre el primero y segundo dedo y es más evidente en los primeros meses de vida del paciente.</li> </ul>
Genitales	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El tamaño del pene es pequeño y el volumen testicular es menor que el de los niños de su edad, la presencia de criptorquidia es relativamente frecuente.</li> </ul>
Piel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La piel es redundante en la región cervical sobretodo en el período fetal y neonatal. Puede observarse livedo reticularis (cutis marmorata) de predominio en extremidades inferiores. Con el tiempo la piel se vuelve seca e hiperqueratósica.</li> </ul>

**Tabla 1.** Presentación fenotípica del Síndrome de Down (13, 14, 19, 23, 24, 25).

## 2.7. Patologías asociadas

Las personas con SD presentan una variedad de patologías relacionadas al síndrome, entre las cuales se encuentran:

- Discapacidad intelectual y del neurodesarrollo: El 100% de las personas con SD presentan deterioro cognitivo y un grado variable de retraso mental. Los déficits cognitivos que presentan son morfosintaxis, memoria verbal a corto plazo y memoria explícita a largo plazo y retraso en el desarrollo psicomotor (19, 24, 26, 27 28, 43).
- Enfermedad de Alzheimer: Se presenta en personas con SD de más de 35 años y se caracteriza por la pérdida gradual de la memoria (29, 30, 31, 43).
- Trastornos conductuales y psiquiátricos: Afectan al 17,6% de las personas con SD. Los trastornos de comportamiento más comunes son el déficit de atención, trastorno de la conducta, hiperactividad y comportamiento agresivo. En cuanto a los trastornos psiquiátricos presentan enfermedad depresiva grave, demencia y manía de comienzo tardío (19, 32, 33, 34, 43).

- Enfermedades cardiovasculares: Aproximadamente del 40 al 50% de las personas con SD presentan cardiopatía congénita, casi la mitad de ellas corresponde a defectos del septo aurículo-ventricular y con menor frecuencia pueden presentar defectos de cierre del septo ventricular, ostium secundum, ductus arterioso persistente y la tetralogía de Fallot (19, 35, 36, 37, 43).
- Alteraciones gastrointestinales: Se presentan en el 10% de los casos, las anomalías más comunes son la atresia esofágica y estenosis duodenal. Con menor frecuencia pueden presentar malformaciones anorrectales, enfermedad de Hirschprung, onfalocele, ano imperforado y páncreas anular (19, 38, 39, 43).
- Trastornos endocrinos: Las anormalidades endocrinas incluyen disfunción tiroidea y diabetes. Dentro de la disfunción tiroidea, el hipotiroidismo es de alta prevalencia (54%) en la trisomía 21 (19, 43, 46).
- Alteraciones oftalmológicas: Se presentan en un 60% de las personas con SD, siendo los más comunes el astigmatismo, cataratas congénitas, hipermetropía y la miopía (19, 40, 43).
- Discapacidad auditiva: Corresponde al 75%, con mayor frecuencia presentan hipoacusias y otitis media a repetición (19, 43, 44, 45).
- Otras alteraciones: Retraso en el crecimiento, leucemia megacariocítica aguda, síndrome mielodisplásico, anomalías de las vías respiratorias superiores e inferiores, apnea del sueño, asma, hiperqueratosis palmoplantar, dermatitis seborreica, cutis marmorata, hipospadias, criptorquidia, cáncer testicular, inestabilidad atlantoaxial, trastornos odontoestomatológicos y alteración inmunológica (19, 42, 41, 43, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

## **2.8. Diagnóstico prenatal**

### **2.8.1. Diagnóstico prenatal no invasivo**

- Marcadores Bioquímicos: En el primer trimestre se realiza medición de la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) y de la gonadotropina coriónica humana total y libre (hCG). Una disminución en plasma materno del PAPP-A y un aumento de hCG se relacionan significativamente con un feto con SD. Cuando estas dos pruebas bioquímicas se encuentran alteradas, en el segundo trimestre del embarazo se realizan mediciones de los niveles de alfafetoproteína (AFP) en suero, estriol no conjugado, inhibina A y hCG total y libre, en embarazos de trisomía 21, los valores de AFP y el estriol se encuentran disminuidos y las concentraciones de inhibina A y hCG total y libre se encuentran aumentadas (87,88).
- Ultrasonido: En el primer y segundo trimestre se realiza una ecografía para visualizar la translucencia nucal, que se refiere a la capa subcutánea de líquido detrás del cuello del feto e inferior al cráneo. Un aumento de la translucencia nucal del feto se asocia con mayor riesgo de SD. Otros hallazgos ecográficos asociados con el SD son la ausencia del hueso nasal, fémur y humero cortos e intestino ecogénico (87,88).

La tasa de detección de SD combinando marcadores bioquímicos y ecografía es de aproximadamente el 70%, con una tasa de falsos positivos del 5% (87,88).

- Análisis de ADN fetal en plasma materno: El descubrimiento de los ácidos nucleicos fetales de células libres en el plasma materno en 1997 abrió nuevas posibilidades de diagnóstico. El ADN libre del feto circulante en el plasma de mujeres embarazadas puede detectarse desde la cuarta semana de gestación. Se cree que el ADN fetal que se origina en las células trofoblásticas comprende alrededor de menos de 10% del total del ADN libre en circulación materna durante el embarazo. A diferencia del ADN materno, el ADN fetal está compuesto de fragmentos cortos de ADN, de los cuales el 80% es <193 pares de bases de longitud. Para la detección e identificación de la trisomía 21 en el ADN fetal, se han utilizado diferentes técnicas de biología molecular tales como: PCR digital y secuenciación de ADN (87,88). El objetivo de la PCR

digital es medir la cantidad total de ADN (materno más fetal) del cromosoma 21 y se compara con un cromosoma de referencia. Por lo tanto, la trisomía 21 fetal se diagnostica mediante la detección de un pequeño incremento en la cantidad total del locus del gen Chr21 contribuido por el Chr21 trisómico en el feto en comparación con un locus del gen en un cromosoma de referencia (89). En cuanto a la secuenciación de ADN permiten la secuenciación masiva en paralelo y la producción de decenas de millones de etiquetas de secuencias cortas en un solo corrido. El diagnóstico de SD consiste en contar el número de etiquetas de secuencia asignadas a cada cromosoma, con lo cual se encontrara un cromosoma extra 21. Este método no requiere la diferenciación de ADN fetal frente a materno (90).

### **2.8.2. Diagnóstico prenatal invasivo**

En la actualidad hay dos procedimientos invasivos que se utilizan de forma rutinaria para obtener tejido fetal que son la amniocentesis y biopsia de vellosidades coriónicas (CVS). La CVS consiste en extraer células de la placenta y se realiza en el primer trimestre, entre las 10 a 13 semanas de gestación mientras que la amniocentesis puede realizarse a partir de las 15 semanas de gestación y consiste en extraer una muestra de líquido amniótico a través de una aguja que se inserta en el útero de la madre. El riesgo de aborto involuntario es del 1% debido a la invasividad de estas pruebas (87). Para determinar la presencia de la copia extra del cromosoma 21 en el material obtenido del feto se realiza citogenética convencional que es considerada actualmente la prueba Gold Standard en el diagnóstico prenatal de aneuploidias junto con algunas técnicas moleculares como hibridación fluorescente in situ (FISH), hibridación genómica comparativa (CGH), PCR cuantitativa fluorescente y en tiempo real, análisis cuantitativos de polimorfismos de un solo nucleótido (Q-SNP), microarrays y ligación multiplex – dependiente de amplificación de sondas (MLPA) (91).

### **2.8.3. Asesoría genética**

El conocimiento del riesgo genético puede influir en la atención previa a la concepción, la atención prenatal, el tipo de parto y la atención postnatal. Hay un número de situaciones que pueden aumentar el riesgo genético. El caso más conocido es el aumento del riesgo de SD con la edad materna. Originalmente, el aumento del riesgo de SD constituye una indicación para el diagnóstico prenatal para mujeres embarazadas en edad avanzada, pero hoy en día, esta política ha sido sustituida ampliamente por la detección prenatal de las mujeres embarazadas, independientemente de su edad (92). El riesgo de recurrencia para padres de niños con trisomía 21 universal depende del riesgo determinado por la edad materna, al que se suma empíricamente un 1%. Padres de niños con trisomía 21 por traslocaciones de *novi*, no tienen riesgo significativamente aumentado de recurrencia; mientras que si el padre es portador de una traslocación balanceada tiene un riesgo de recurrencia de 4 al 5% y si la madre es portadora de la misma traslocación el riesgo de recurrencia aumenta de 10 al 15% (93).

## **2.9. Manejo Clínico**

El enfoque clínico se basa en la detección temprana de las patologías asociadas al SD y en programas de salud preventiva que contribuyen a la mejora de la calidad de vida conllevando a un incremento de la supervivencia de las personas con trisomía 21 (113).

## **2.10. Genética del cromosoma 21**

El cromosoma 21 es el autosoma humano más pequeño y representa alrededor del 1 al 1.5% del genoma humano. La secuenciación del cromosoma 21 determinó que el brazo corto (21p) está compuesto en gran parte por genes del RNA ribosomal y otras secuencias repetitivas. En cambio, el brazo largo (21q) reveló la existencia de 225 genes (127 genes conocidos y 98 nuevos genes predichos *in silico*) y 59 pseudogenes; su longitud es de 33,5 Mb y aproximadamente el 3% de su secuencia codifica para proteínas. El tercio distal de 21q es más rico en genes y en GC en comparación con los dos tercios proximales que son

uniformemente ricos en AT y que tiene un segmento de aproximadamente 7 Mb que alberga siete genes (66,67,68).

Las proteínas que codifican para los genes que se encuentran en el cromosoma 21q se dividen en varias categorías funcionales incluyendo: factores de transcripción, reguladores y moduladores (17 genes), estructura de cromatina (4 genes) proteasas e inhibidores de proteasa (6 genes), vía de la ubiquitina (4 genes), interferones y respuesta inmune (9 genes), quinasas (8 genes), de procesamiento de ARN (5 genes), fosfatasas (2 genes), moléculas de adhesión (4 genes), canales (7 genes), receptores (5 genes), transportadores (2 genes), metiltransferasas (3 genes), estructurales (4 genes), dominio SH3 (3 genes), metabolismo de un carbono (4 genes), metabolismo del oxígeno (3 genes), metabolismo de energía (4 genes) y misceláneos (28 genes) (Tabla 1). El 1% del cromosoma 21q corresponde a secuencias conservadas no génicas, es decir, secuencias que no son "funcionalmente" transcritas y no corresponde a genes que codifican para proteínas; la conservación significativa de estas secuencias indica que son funcionales, aunque su función es desconocida (66,67, 68).

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

La identificación y caracterización de los genes del cromosoma 21q permitió la comparación de las regiones triplicadas del 21q entre individuos con fenotipo de SD, con lo cual se identificó una región de solapamiento común que contiene algunos genes candidatos que podrían explicar las patologías y muchos de los fenotipos asociados al SD. Esta región es conocida como Región Crítica del Cromosoma 21 (DSCR) y se localiza en el extremo distal del brazo largo del cromosoma 21 (21q22). El tamaño de esta región, hasta el año 2000, se consideró de 1,6 a 2,5 Mb, sin embargo, estudios recientes han detectado un mayor tamaño de 4,3 a 5 Mb entre bandas 21q22.13- 21q22.2 del cromosoma 21 (4, 68).

La sobreexpresión de estos genes candidatos presentes en la DSCR conlleva a una síntesis excesiva de productos de múltiples de genes (efecto de la dosis

génica sensible) y probablemente son la base de los rasgos dismórficos y la patogénesis inmunológica, neurológica, endocrina y las alteraciones bioquímicas que son características del SD (69, 70).

### **2.10.2. Genes dosis sensible localizados en DSCR y asociados a SD**

Varias investigaciones se han encaminado a la identificación de estos genes dosis-sensible debido a la gran importancia que ellos representan para la plena comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la patología. Esta búsqueda ha sido posible con la generación de varios modelos de ratón teniendo en cuenta que tienen tres cromosomas (Mmu10, Mmu16 y Mmu17) con regiones conservadas y ortólogas al 21 humano (70,72). Las primeras cepas utilizadas fueron la Ts65Dn y Ts1Cje; que eran animales que contenían tres copias de duplicaciones de partes de Mmu16 con un cubrimiento de 104 y 81 genes ortólogos respectivamente (72). Posteriormente desarrollaron otro modelo conocido como el “ratón trisómico” el cual contiene duplicaciones de Mmu10, Mmu16 y Mmu17, lo que resulta en la trisomía para todos los 250 genes ortólogos y es el modelo más completo para SD disponible en la actualidad. En los últimos años crearon un nuevo modelo de ratón Tc1, que lleva una copia de segregación libre del cromosoma 21 humano. Este cromosoma tiene varias deleciones y por lo tanto contiene 83% de los genes del 21 humano, lo cual permite el estudio de otros genes que no se encuentran en las regiones ortólogas Mmu10, Mmu16 y Mmu17 (70, 71). También se han utilizado grupos de individuos con trisomía 21 para comprender la interacción de estos genes con SD mediante la realización de estudios de proteómica, genómica y transcriptómica (3).

Con lo anterior se han establecido los genes dosis sensible localizados en la DSCR que se asocian a los fenotipos y patologías presentes en SD, entre los que se encuentran el gen CBS y además los genes DYRK1A, RCAN1, SIM2, DSCAM, APP, ITSN1, SYNJ, DSCR1, COL6A1, SLC19A1, MTHFR, RUNX1, ERG, ETS2, SOD1, ZNF295 y GART (3, 15, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 76).

## **2.11. Metabolismo del folato y la homocisteína y su relación con el SD**

Es importante entender el metabolismo del ácido fólico y la homocisteína-metionina debido a que la sobreexpresión del gen CBS, que se encuentra dentro de la DSCR, expresa la enzima CBS que participa en estas vías y se ha relacionado con hallazgos fenotípicos y patológicos del síndrome de Down (69, 76).

### **2.11.1. Ácido fólico**

#### **2.11.1.1. Estructura química**

El ácido fólico es un miembro hidrosoluble de la familia de las vitaminas esenciales del complejo B y se compone de un anillo de pterina unido por un puente de metileno a un ácido p-aminobenzoico y en su extremo carboxilo se pueden unir desde uno hasta siete residuos de glutamato. En los alimentos los folatos se encuentran predominantemente en forma de poliglutamatos aunque también existen mezclas de mono y poliglutamatos. El nombre de ácido fólico hace referencia a la forma sintética y el folato es el designado a la forma natural de esta vitamina (77, 78).

#### **2.11.1.2. Ciclo del folato**

El folato es reducido a dihidrofolato (DHF), y este a su vez se reduce a tetrahydrofolato (THF) por la acción de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). El THF resultante directamente se convierte en 5,10-metilenTHF por la acción de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT). SHMT es una enzima dependiente de la vitamina B6 que utiliza serina como donante de un carbono. La conversión de THF en 5,10-metilenTHF, vía 10-formilTHF y 5,10-metenilTHF, es catalizada por la enzima metilenotetrahydrofolato deshidrogenasa trifuncional (MTHFD1) que tiene formiltetrahydrofolato sintetasa, ciclohidrolasa meteniltetrahydrofolato y metilenotetrahydrofolato deshidrogenasa. El 10-formilTHF dona grupos de un carbono para la biosíntesis de purinas, mientras que 5,10-metilenTHF se utiliza como un cofactor para la conversión de dUMP en dTMP. La última reacción está

catalizada por la enzima timidilato sintasa (TYMS) y produce DHF, que requiere la posterior reducción de nuevo a THF por la acción de la DHFR. El 5,10-metilenTHF también se puede reducir a 5-metilTHF por acción de la enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) dependiente de riboflavina (vitamina B2). Intracelularmente el 5- MTHF funciona como un donante de metilos para la remetilación de homocisteína (8,78).

#### **2.11.1.3. Absorción y transporte del folato**

La enzima folilpoli- $\gamma$ -glutamato carboxipeptidasa (FGCP), que está anclada al borde apical en el cepillo intestinal y es codificada por el gen *glutamato carboxipeptidasa II (GCPII)* es responsable de realizar la hidrólisis de los poliglutamatos en el intestino. Los monoglutamatos posteriormente se absorben en la parte superior del duodeno y el yeyuno acoplados al receptor de folato de afinidad protónica PCFT1 (8,78).

El monoglutamato 5-MTHF es la principal forma de folato que circula en el plasma y es transportado a la célula por medio del receptor de folato  $\alpha$  (FR $\alpha$ ) que es una glicoproteína glicosilfosfatidilinositol con alta afinidad al 5-MTHF y se expresa en un número limitado de células epiteliales, predominantemente en los túbulos proximales del riñón, el plexo coroideo y la placenta. Los otros receptores de folato,  $\beta$  y  $\gamma$ , tienen una afinidad mucho más baja para 5- MTHF (8, 78).

Otro transporte del 5-MTHF se produce a través del transportador de folato reducido de expresión ubicua (RFC) cuya afinidad es considerablemente menor que la del FR $\alpha$  (8,78).

#### **2.11.1.4. Funciones del folato**

El folato cumple un papel importante como donante de metilos en una gama de procesos bioquímicos y metabólicos, ya que interviene en la síntesis de ácidos nucleicos, el catabolismo de la histidina, la remetilación de la homocisteína, reacciones de metilación (ADN, proteínas) y aporta carbonos para la formación de las bases purínicas y pirimidínicas (77).

## **2.11.2. Homocisteína**

### **2.11.2.1. Estructura química**

La homocisteína es un aminoácido azufrado que contiene un grupo tiol, no es constituyente de la dieta y no es incorporado a las proteínas; es un producto exclusivamente intermediario del metabolismo de la metionina (79).

### **2.11.2.2. Metabolismo de la Homocisteína**

La homocisteína participa en dos vías metabólicas: transulfuración irreversible y remetilación (Figura 7).

- La remetilación de la homocisteína a metionina es catalizada por la metionina sintasa (MS), enzima que une el ciclo del folato con el metabolismo de la homocisteína y se expresa de forma ubicua en la mayoría de las células. La MS utiliza como cofactor la cobalamina (B12) para transferir el grupo metilo del 5-MTHF a la homocisteína, resultando en la formación de metionina. Cuando la cobalamina se encuentra en estado oxidado o inactivo, la enzima metionina sintasa reductasa (MTRR) reactiva la cobalamina por metilación reductiva para continuar el ciclo de remetilación. La metionina se transforma en S-adenosilmetionina (SAM), la cual dona el grupo metilo en una reacción catalizada por una metiltransferasa a proteínas, ADN, ARN y fosfolípidos generando S-adenosilhomocisteína, la cual es hidrolizada en adenosina y homocisteína (8). En el hígado y riñón la remetilación de la homocisteína también puede ser realizada por la betaína homocisteína metiltransferasa (BHMT) (Figura 3) (78, 80).
- En la vía de transulfuración, la homocisteína es degradada irreversiblemente a cisteína. La transulfuración se ve facilitada por la acción de dos enzimas dependientes de la vitamina B6: cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) y cistationina  $\gamma$ -lilasa (CTH). CBS cataliza la condensación de la homocisteína y serina a cistationina y agua, posteriormente CTH cataliza la hidrólisis de cistationina en

cisteína y  $\alpha$ -cetobutirato, siendo la cisteína un precursor del glutatión. CBS se expresa en el hígado, los riñones, músculo, cerebro y ovario y también durante la embriogénesis temprana en los sistemas neuronales y cardíacos (78). CBS puede catalizar una reacción alternativa donde se une a cisteína en lugar de serina, lo que resulta en la formación de cistationina y sulfuro de Hidrogeno ( $H_2S$ ) (Figura 3) (82).



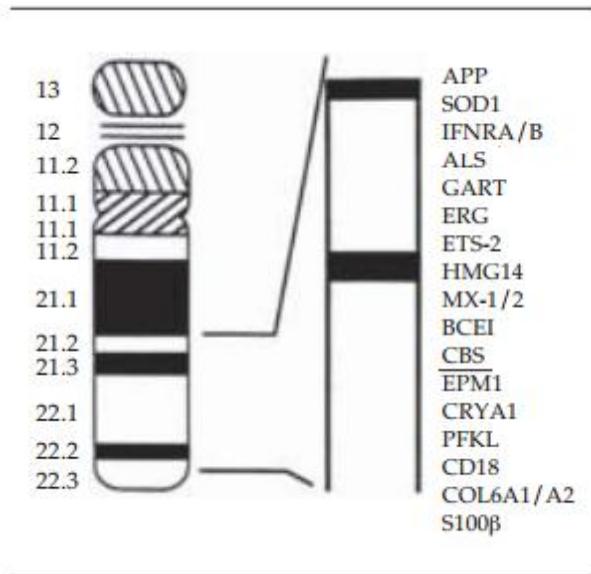
**Figura 3.** Ruta Bioquímica del metabolismo de la Homocisteína-Metionina. La Homocisteína utiliza dos vías para su metabolización: la vía de la remetilación (izquierda arriba) y la vía de transulfuración (izquierda abajo) (78, 80).

### 2.11.3. Síndrome de Down y CBS

#### 2.11.3.1. Estructura de la Cistationina $\beta$ sintasa

El gen CBS se encuentra localizado en la DSCR del cromosoma 21 humano, en la región 21q22.3 y codifica para la enzima CBS (Figura 4) (82). CBS es un

homotetramero citosolico que consta de cuatro subunidades de 63 KDa y de tres dominios funcionales: el dominio central que contiene el núcleo catalítico, que es el responsable de la reacción catalizada por fosfato de piridoxal, el dominio C-terminal que contiene una región de regulación que es responsable de la activación alostérica de la enzima por SAM y el dominio N-terminal que contiene hemo, y este regula la enzima en respuesta a condiciones redox (81).

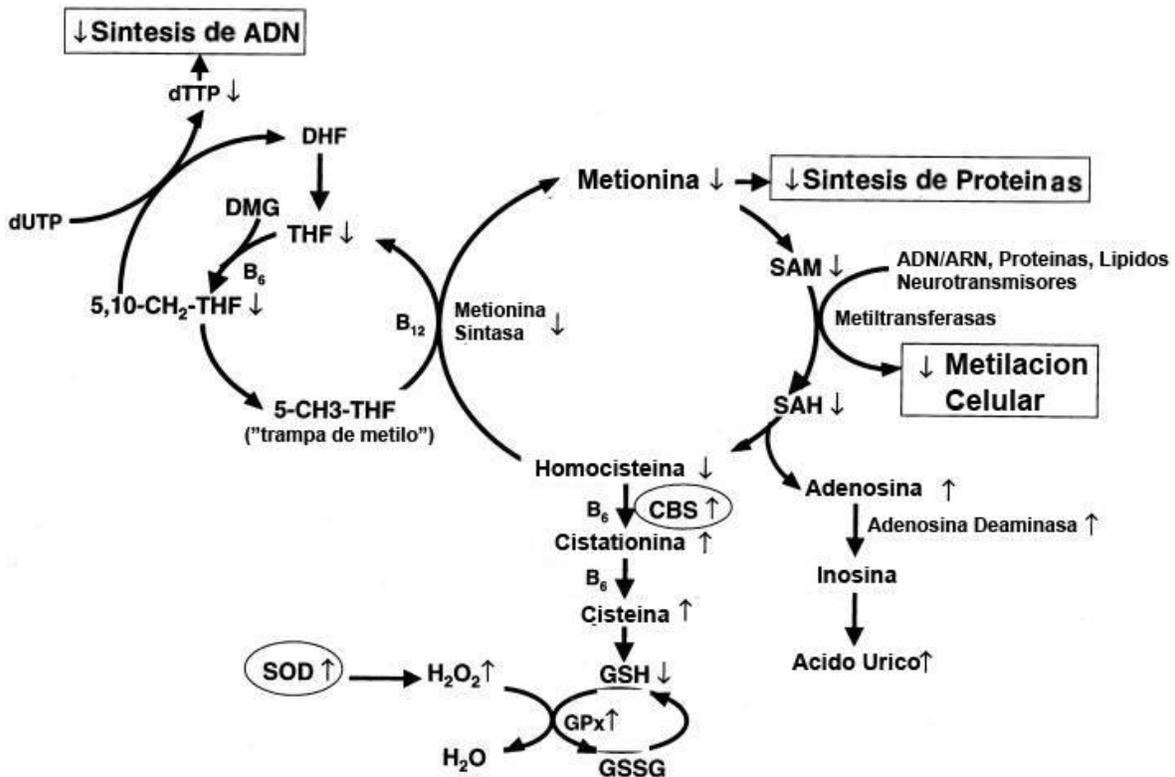


**Figura 4.** Locus del gen CBS dentro de la DSCR (73)

### 2.11.3.2. Sobreexpresión de la CBS en SD

Se ha descrito en individuos con SD un incremento del 157% de la actividad enzimática de la CBS y se ha asociado con niveles bajos de homocisteína (2, 116). También se ha observado que los niveles de CBS son aproximadamente tres veces mayores en cerebros de pacientes con SD en comparación con cerebros de pacientes sanos (83). Un incremento en la vía de transulfuración debido a la sobreexpresión de CBS indirectamente disminuye la actividad de la MS, con lo cual se promueve la acumulación de 5-MTHF que conlleva a la formación de una “trampa de metilo” y a su vez a una reducción en la conversión de 5-MTHF a THF, el cual es importante en la síntesis de nucleótidos para la síntesis de ADN y ARN; además se presenta una disminución significativa de la

metionina, SAM y SAH lo que sugiere una depresión general en la capacidad de metilación celular en los niños con SD. Debido a la sobreexpresión de CBS se refleja también un aumento en la producción de adenosina, resultando en altos niveles de ácido úrico (Figura 5). Lo anterior resulta en un déficit del folato funcional secundaria a la sobreexpresión de CBS y a la trampa de folato en SD (2).



**Figura 5.** Las flechas indican las alteraciones directas e indirectas en los metabolitos, inducidos por la sobreexpresión de CBS en las personas con SD, modificado de (2).

También se ha demostrado que los bajos niveles de glutatión debido a la sobreexpresión de CBS y la triplicación de la actividad de SOD1 conllevan a un desequilibrio en la relación de SOD1 y glutatión lo que conduce a un estrés oxidativo debido a la acumulación de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) intracelular. La SOD1 se encuentra en el citoplasma y sintetiza como producto final  $H_2O_2$  y oxígeno molecular, que son convertidos por la catalasa y el glutatión a agua y se encuentra

dentro de la DSCR. El desequilibrio entre la producción de especies reactivas y la capacidad de desintoxicar rápidamente a la célula se ha asociado a un déficit de memoria y aprendizaje en individuos con SD (2,76). Adicionalmente se ha sugerido que la sobreexpresión de CBS en los cebreros con SD podría ser una causa de la anormalidad en el desarrollo cognitivo en los niños con SD y de demencia en la vida adulta (82).

Por otro lado, la acumulación de ácido úrico, es otra de las características que se presentan debido al exceso de producción de adenosina secundaria a la sobreexpresión de CBS en SD. La hiperuricemia se ha relacionado con un aumento del estrés oxidativo en SD (2, 76, 86).

Además la CBS puede convertir la cisteína en sulfuro de hidrógeno, que es un neuromodulador importante en el cerebro. La sobreexpresión de CBS conduce a la producción de niveles tóxicos de H<sub>2</sub>S. Estas alteraciones metabólicas podrían desempeñar un papel importante en la discapacidad cognitiva y Alzheimer en SD (76, 83, 84).

## **2.12. Placenta**

### **2.12.1. Definición**

La placenta es un órgano transitorio que permite el desarrollo del embrión y constituye el principal medio de comunicación entre la madre y el feto, cumpliendo funciones de intercambio gaseoso entre oxígeno y dióxido de carbono, nutrición, excreción y secreción de hormonas (7, 85, 96).

### **2.12.2. Desarrollo de la placenta**

La formación de la placenta inicia en el día cinco de gestación, en el momento en que el blastocisto lleva a cabo su primera diferenciación en dos estructuras celulares, la masa interna del blastocisto y el trofoectodermo. El trofoectodermo es una capa de células epiteliales que recubre el blastocele y contribuye exclusivamente a la formación del trofoblasto. En el día octavo postfertilización, una vez es adherido el blastocisto al epitelio endometrial, comienza la

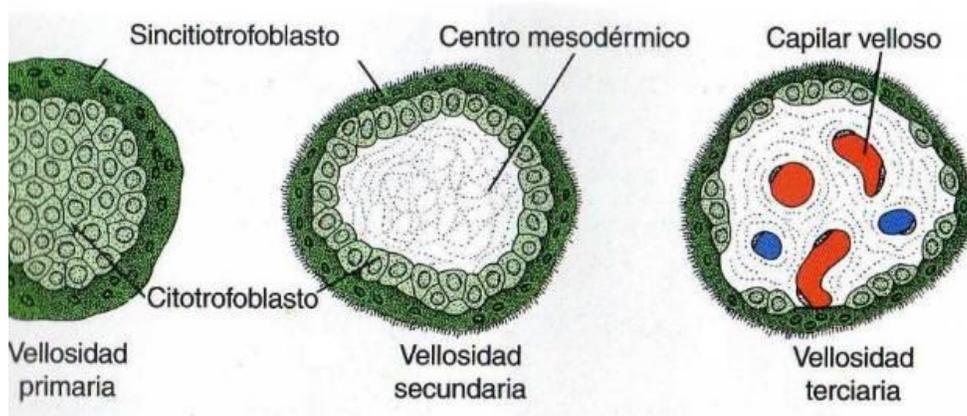
diferenciación de la decidua endometrial, la proliferación del trofoblasto y su división en forma gradual en dos capas, citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto (7, 85, 94, 95). Las células trofoblásticas más cercanas al embrioblasto constituyen el citotrofoblasto que está compuesto por células de Langhans las cuales presentan un solo núcleo y el trofoblasto mas externo que contacta hacia la cara materna por fusión de células del trofoblasto subyacentes, da lugar al sincitiotrofoblasto que está formado por una masa protoplasmática con numerosos núcleos (7, 85, 94, 95).

Para que se produzca la implantación, el endometrio es transformado en decidua diferenciándose en decidua basal, capsular y parietal. La decidua basal consiste en una capa compacta de células voluminosas con abundantes lípidos y glucógeno, es la parte subyacente a los productos de la concepción y forma el componente materno de la placenta y cubre al corion frondoso, la decidua capsular se encuentra en contacto con el corion liso y es la porción superficial subyacente al producto de la concepción y la decidua parietal reviste el resto de la pared uterina (7, 85, 94, 95).

En el día nueve posfecundación, el sincitiotrofoblasto forma lagunas ocupadas inicialmente por liquido derivado de la secreción glandular endometrial, pero que pronto son ocupadas por sangre materna y se designan lagunas trofoblásticas, las cuales se fusionan para constituir un espacio único llamado espacio intervelloso, el cual es limitado parcialmente por columnas de sincitiotrofoblasto y separa la placa basal de la placa corionica. Después del día doce, el citotrofoblasto prolifera rápidamente penetrando en el interior de las columnas del sincitiotrofoblasto y en el interior de las columnas aparece tejido conjuntivo que contiene fibroblastos, fibras de colágeno y células de Hofbauer que proceden del mesénquima externo embrionario. Entre el día dieciocho y veintiuno, se forman capilares sanguíneos dentro de la columna, constituyendo así, los troncos vellositarios primarios o vellosidades de anclaje. El citotrofoblasto de las columnas prolifera también en su porción basal próxima a la decidua y se extiende lateralmente formando una envoltura continua alrededor del embrioblasto. A la vez el sincitiotrofoblasto se

divide en dos partes; una interna y otra externa; la interna es el sincitiotrofoblasto definitivo, que tapiza el espacio intervelloso y la externa es el sincitiotrofoblasto periférico que presenta un proceso degenerativo y forma la capa fibrinoide de Nitabuch, que separa al trofoblasto de tejidos maternos (7, 85, 94, 95, 96).

A partir de las vellosidades de anclaje y en la proximidad de la placa corionica o del techo del espacio intervelloso, se originan una serie de vellosidades que constituyen las vellosidades primarias, las cuales se dividen para originar las vellosidades de segundo orden y esta a su vez se ramifican para formar las vellosidades terciarias, que se dirigen a la placa basal y en su trayecto vuelven a dividirse formando múltiples ramificaciones de *novo* de los capilares donde se llevara el intercambio materno fetal (Figura 6). Cada vellosidad primaria con sus ramificaciones forma el cotiledón siendo esta la unidad básica de transferencia entre la sangre materna y la fetal. Los vasos sanguíneos formados en el eje de los troncos vellositarios se continúan con los vasos de la placa coriónica y del pedículo de fijación y estos originaran al cordón umbilical. Este sistema vascular extraembrionario al ponerse en contacto con los vasos procedentes del embrión, hace que se establezca la comunicación entre las dos circulaciones (7, 85, 94, 95, 96).



**Figura 6.** Formación de las vellosidades primarias, secundarias y terciarias (114).

Las vellosidades del polo embrionario siguen creciendo y dilatándose, originando así el corion frondoso. Las vellosidades del polo anembrionario o vegetativo se

comprimen y disminuyen en cantidad y tamaño hasta degenerarse y desaparecer por completo originando así el corion liso, el citotrofoblasto experimenta una intensa involución, dejando de ser una capa continua de células para volverse células aisladas cada vez más escasas (7, 85, 94, 95, 96).

Al final del primer trimestre, cuando se completa la implantación del embrión, el trofoblasto se diferencia aun más, dando lugar al trofoblasto vellosos y extraveloso. El trofoblasto vellosos forma las vellosidades coriónicas, que transportan principalmente oxígeno y nutrientes entre el feto y la madre. El trofoblasto extraveloso migra hacia la decidua y el miometrio y también penetra vasculatura materna, por lo tanto se diferencia en trofoblasto intersticial y endovascular. El trofoblasto intersticial invade la decidua y finalmente penetra en el miometrio para formar lecho placentario de células gigantes y rodea las arterias espirales. El trofoblasto endovascular invade y transforma las arterias espirales provenientes de una división anterior de la arteria hipogástrica de la madre que emergen durante el embarazo para crear el flujo de sangre de baja resistencia que caracteriza la placenta (7,85).

En el tercer mes de gestación, se forman tabiques a partir de la decidua basal, los cuales no están en contacto con la lámina coriónica y dividen de forma incompleta el espacio intervelloso. Estos tabiques se alzan sobre la placa basal pero no llegan a alcanzar el techo del espacio intervelloso o placa corionica. De esta manera el espacio intervelloso queda tabicado en su base pero no es su parte superior. Debido a la formación de los tabiques, la superficie materna de la placenta queda dividida entre 15 a 20 segmentos llamados cotiledones (7, 85, 94, 95, 96).

Al final del embarazo la capa de citotrofoblasto ha desaparecido por completo y el sincitiotrofoblasto contacta directamente con la membrana basal. Las columnas citotrofoblasticas de la zona basal desaparecen casi por completo, quedando convertidas en sustancia fibrinoide. El sincitiotrofoblasto periférico de la placa basal se degenera y se transforma igualmente en material fibrinoide (7, 85, 94, 95, 96).

### **2.12.3. Morfología de la placenta**

#### **2.12.3.1. Estructura macroscópica**

La placenta tiene dos componentes: la porción fetal, que proviene del corion frondoso, y la porción materna que corresponde a la decidua basal (85) y en condiciones normales es de forma discoidea y al término de la gestación, su diámetro es de 15 a 25 cm, su espesor es de 2 a 3 cm y presenta un peso de 500 a 600 g (7, 85, 94, 96).

Presenta dos caras, la cara materna de superficie irregular, debido a la presencia de los cotiledones cubiertos por una delgada capa de decidua basal y separados por surcos que se forman a partir de los tabiques deciduales. La cara fetal en cambio es lisa y está cubierta por amnios a través del cual se visualizan las ramificaciones de los vasos coriónicos que convergen hacia y desde el cordón umbilical (7, 85, 94, 96).

#### **2.12.3.2. Estructura microscópica**

Las vellosidades coriónicas están formadas por una capa epitelial, estroma y capilares sanguíneos, que con frecuencia se encuentran en íntimo contacto con el epitelio por lo que la placenta humana es hemocoriónica (94, 96).

En el primer trimestre hay un número escaso de vellosidades, que presentan un diámetro relativamente grande (170  $\mu\text{m}$ ). Su epitelio está formado por dos capas diferenciales el sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto. El sincitiotrofoblasto es una masa citoplasmática con los núcleos repartidos de forma uniforme y con microvellosidades de 3  $\mu\text{m}$  de longitud en la superficie de dichas células. En su citoplasma se pueden ver vacuolas de contenido líquido que se forman por pinocitosis, y todo el sincitiotrofoblasto está delimitado por una membrana basal. El citotrofoblasto que se encuentra por dentro de la capa de sincitiotrofoblasto está formado por células cúbicas bien definidas con un núcleo central redondo u ovoideo. El estroma que está en el centro de la vellosidad es laxo, con escasas fibras conjuntivas y abundante sustancia fundamental de aspecto mucoso. Dentro de la vellosidad se encuentran numerosas células redondas u ovoides que

corresponden a las células de Hofbauer. Los vasos sanguíneos se sitúan en el centro del estroma (94, 96).

Al final de la gestación, las vellosidades son abundantes y más delgadas, su diámetro ha disminuido a 40  $\mu\text{m}$ . Solo se observan algunas células aisladas de citotrofoblasto, el sincitiotrofoblasto se ha quedado reducido a nudos sincitiales. Los vasos vellositarios están en la periferia de la vellosidad, donde contactan con el sincitiotrofoblasto y forman, en las zonas anucleadas, las membranas vasculosincitiales, donde la sangre materna y fetal están separadas por una capa de sincitiotrofoblasto y el endotelio del capilar fetal con su membrana basal es más visible en el último trimestre. Los capilares fetales están dilatados y ocupan casi todo el estroma (94, 96).

#### **2.12.4. Circulación placentaria**

La circulación materna y fetal contribuye a la circulación placentaria.

##### **2.12.4.1. Circulación fetal**

La sangre fetal llega a la placenta a través del cordón umbilical, que dispone de dos arterias que aportan sangre desoxigenada y una vena que recoge sangre rica en oxígeno, que la incorporará al feto desde la placenta. Las arterias umbilicales se anastomosan inmediatamente o después de entrar a la placa corionica, estos vasos se ramifican varias veces formando redes y conjuntamente arteria y vena atraviesan la placa corionica y se incorporan a las vellosidades corionicas, primero en los troncos vellositarios primarios, posteriormente en los de segundo y tercer orden, para finalmente llegar a las vellosidades terminales, donde dan lugar a una serie de capilares. Estos capilares forman sinusoides de 40-50  $\mu\text{m}$  de diámetro y ramas de lazos paralelos. La formación de sinusoides, la longitud y disposición de los capilares favorecen el intercambio de sustancias entre el feto y la madre (7,96).

##### **2.12.4.2. Circulación materna**

Hacia los días catorce y quince de la fecundación, las arterias espirales conectan con el espacio intervelloso, estableciéndose la circulación materna placentaria. En

el primer trimestre, las arterias espirales experimentan cambios que consisten en la sustitución de parte de la pared de la arteria, el endotelio y el músculo, por trofoblasto y sustancia fibrinoide, con ello hay una mayor demanda del flujo sanguíneo materno a la placenta. Entre 100 a 120 arterias espirales penetran, a través de la placa basal y vierten su contenido en el espacio intervelloso en el centro de los cotiledones fetales. Dicha sangre llega a las vellosidades con una presión reducida pero suficiente para llevarla alrededor de las vellosidades. La sangre viaja entre las vellosidades hasta alcanzar las redes capilares de los vasos fetales, donde ocurre el intercambio a través de las membranas vasculo-sincitiales (7,96).

#### **2.12.5. Fisiología de la placenta**

La placenta permite el intercambio de productos metabólicos y gaseosos entre la madre y el feto, funciona como barrera entre la circulación materna y la fetal, sintetiza sustancias como colesterol, ácidos grasos y glucógeno y cumple funciones endocrinas e inmunológicas (95, 97).

La placenta actúa como un órgano endocrino ya que sintetiza diferentes hormonas, entre las cuales se encuentran las hormonas esteroideas (17- $\beta$  estradiol, estriol y progesterona), hormonas similares a las hipofisarias (gonadotropina coriónica humana, somatomamotrofina coriónica humana, Hormona de crecimiento coriónico humano y tirotropina coriónica humana) y hormonas similares a las hipotalámicas (hormona liberadora de gonadotropina coriónica, hormona liberadora de corticotropina coriónica, hormona liberadora de tirotropina coriónica, somatostatina). Estas hormonas atraviesan la circulación materno-fetal y son importantes para el desarrollo fetal y el mantenimiento del embarazo (85, 95, 96).

#### **2.12.6. Cordón umbilical**

Es un tallo cilíndrico vascular de 1 a 2,5 cm de diámetro y de 30 a 60 cm de longitud que sirve de unión entre el feto y la placenta. En condiciones normales el cordón se inserta en el centro de la placenta pero es frecuente en forma

excéntrica. El cordón contiene una vena y dos arterias en una matriz gelatinosa llamada gelatina de Wharton, la cual está formada por un tejido de aspecto mesenquimatoso rico en mucopolisacáridos (85,96).

Los tres vasos sanguíneos contenidos en el cordón siguen un trayecto helicoidal a través de la gelatina de Wharton, conformando estructuras en forma de enrollamientos. Se han descrito un promedio de 11 enrollamientos de cordón umbilical entre el feto y la inserción placentaria. La presencia de estos enrollamientos hace que el cordón umbilical sea más resistente a la torsión y compresión. La tríada conformada por los enrollamientos, la gelatina de Wharton y el líquido amniótico, son los encargados de proteger el flujo sanguíneo a través del cordón (85,96).

#### **2.12.7. Líquido amniótico**

El líquido amniótico desempeña un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento del feto. Permite el desarrollo normal de los tractos respiratorio, gastrointestinal, urinario y del sistema musculoesquelético, a la vez que amortigua traumas físicos y proporciona una barrera contra la infección en un ambiente termorregulado. Está constituido por agua (98,4%), albúminas, sales, glucosa, úrea, vitaminas y hormonas. En el sedimento se encuentran células epidérmicas fetales, células del amnios y materia sebácea; también células epiteliales del tracto respiratorio y del tracto urinario del feto. Su volumen normal oscila entre 600 ml a 800 ml y se encuentra en una constante recirculación (98).

#### **2.12.8. Alteraciones placentarias y Síndrome de Down**

La placenta, originada de las mismas divisiones celulares que dan origen al feto, muestra también cambios histológicos, los cuales pueden ser muy prominentes en abortos tempranos, menores de la semana seis de gestación. Los grandes cambios morfológicos en los niños, sugieren trastornos cromosómicos y también los cambios morfológicos en la placenta pueden sugerirlos, tales como morfología vellositaria hidrópica, con inclusiones de trofoblasto, cisternas y bordes circinados

(101, 111); estos cambios pueden estar mezclados con vellosidades de tamaño normal. Otro patrón observado es el de vellosidades avasculares con menor grado de edema y estroma mixomatoso invadido por grandes células del trofoblasto. Estos cambios, sin embargo, no son patognomónicos de alguna trisomía. Ambos patrones carecen característicamente de proliferación del trofoblasto, propio de las enfermedades trofoblásticas gestacionales como las molas (99, 111).

Por otra parte, se ha descrito que la perturbación de las funciones del trofoblasto puede dar lugar a una serie de resultados adversos en el embarazo, tales como malformaciones, retraso del crecimiento fetal, aborto espontáneo y muerte fetal. La invasión limitada del trofoblasto se ha correlacionado con preeclampsia y restricción del crecimiento fetal, mientras que una invasión del trofoblasto excesivo está asociado con mola invasiva, placenta creta y coriocarcinoma (100, 111).

Específicamente para trisomía 21, se ha visto alteración en la disposición del trofoblasto, asociado con la maduración alterada de las vellosidades; en estas vellosidades se observa persistencia de doble capa de trofoblasto en vellosidades que debieran tener únicamente una capa trofoblástica (102, 111).

Alteraciones en el cordón umbilical también pueden ser vistas en cromosopatías, el enrollamiento anormal se ha relacionado con varios eventos, aunque con resultados diferentes en los estudios; algunos relacionan el hiperenrollamiento con muerte fetal (103, 111) mientras que otros además de la muerte fetal, lo relacionan significativamente con parto pretérmino, pH umbilical arterial <7.05, anormalidades fetales cromosómicas o estructurales, trombosis de vasos placentarios fetales, hipoxia/isquemia fetal crónica y bajo peso para la edad gestacional (104, 111). Los cordones hipoenrollados se han asociado con tinción de meconio, partos intervenidos, bajo APGAR, alteraciones en el pH fetal y anormalidades cromosómicas (103, 111). También la presencia de sólo dos vasos en el cordón, se ha asociado con las alteraciones cromosómicas; las malformaciones fetales más frecuentes que se presentan junto con la arteria umbilical única, son las del tracto urinario, seguidas de los trastornos cromosómicos, y luego suelen ser vistas en niños con restricción del crecimiento

intrauterino; la presencia de un solo vaso funicular se relaciona también con aumento de la mortalidad perinatal y mayor número de “accidentes del cordón” (105, 106, 107, 111).

Secundario a las alteraciones del cordón, puede presentarse vasculopatía trombótica fetal, la cual por sí misma es una causa de morbilidad fetal, poco conocida y por ello, poco diagnosticada, relacionada con muerte neonatal y fetal y también con pobre pronóstico neurológico en los niños afectados (108,111). Esta entidad está constituida por todas las patologías que afectan la perfusión fetal, incluyendo las tromboembólicas, originadas en una coagulopatía fetal y obstrucciones del cordón umbilical. El patrón de las trombosis refleja la localización de la obstrucción: cuando se observa en el plato corial o en las vellosidades madre, se infiere obstrucción en el cordón. Los factores predisponentes son los conocidos para todas las trombosis (Triada de Virchow), como son la estasis, el daño endotelial y la hiperviscosidad sanguínea; por ello, los factores que reducen la velocidad del flujo sanguíneo se han asociado con esta entidad, como el hiperenrollamientos del cordón umbilical, circulares del cordón en cuello o en otra áreas del cuerpo, estrecheces en el diámetro del cordón e inserciones anormales del cordón en la placenta, como velamentosa o marginal (109,111). Otros factores, como las condiciones uterinas también se han implicado, tales como el oligoamnios y anomalías anatómicas del útero ya que predisponen a compresiones del cordón contra el cuerpo fetal o contra el útero (110,111). Así mismo la mionecrosis secundarias a la presencia de meconio, migración leucocitaria en corioamnionitis, daño secundario a inflamación crónica en villitis (109,111) predispone a trombosis por alteración endotelial. Condiciones de hiperviscosidad pueden verse en diabetes materna y reacciones leucemoides maternas (101, 111).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Comparar los niveles de expresión de la Cistationina  $\beta$  Sintasa y los hallazgos histopatológicos en placentas de recién nacidos con Síndrome de Down y placentas de recién nacidos sanos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar los niveles de ARNm de la Cistationina  $\beta$  sintasa utilizando la técnica de PCR en tiempo real en placentas de casos y controles.
- Determinar los niveles de proteína de la Cistationina  $\beta$  sintasa y su localización por la técnica de inmunohistoquímica en placentas de casos y controles.
- Determinar los hallazgos histopatológicos utilizando la coloración hematoxilina eosina en placentas de casos y controles.

### 4. FORMULACION DE HIPOTESIS

**Ha=** Existen diferencias entre casos y controles en los niveles de expresión de proteína y ARNm de la Cistationina  $\beta$  sintasa y entre los hallazgos histológicos de ambos grupos.

**Ho=** No existen diferencias entre casos y controles en los niveles de expresión de proteína y ARNm de la Cistationina  $\beta$  sintasa ni entre los hallazgos histológicos de ambos grupos.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. Población de estudio**

Se realizó un estudio de casos y controles. Se recolectaron muestras de placenta desde el 2000 al 2012 de mujeres con parto vaginal o cesárea con fetos con diagnóstico de Síndrome de Down y muestras de placenta con fetos sanos y embarazo sin complicaciones como población control, las cuales se encuentran embebidas en parafina en el Departamento de Patología del Hospital Universitario San Ignacio. Los pacientes con SD han firmado el consentimiento informado del ECLAMC (Estudio Colaborativo de Malformaciones Congénitas) y los pacientes controles en el proyecto “Metabolismo de la homocisteína, su relación con polimorfismos de la MTRR, CBS y expresión de genes para factores procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticos en el tercer trimestre de gestaciones normales” financiado por la vicerrectoría, donde expresan que las muestras pueden ser utilizadas: “En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato los datos de identificación”. El tamaño total de la muestra fue de 22 placentas, de los cuales 6 corresponden a los casos y 16 a los controles.

#### **5.1.1. Criterios de selección de las muestras**

##### **5.1.1.1. Criterios de inclusión**

###### **5.1.1.1.1. Criterios de inclusión (Casos)**

Muestras de placentas embebidas en parafina de recién nacidos con diagnóstico clínico de Síndrome de Down y por pruebas citogenéticas o moleculares.

###### **5.1.1.1.2. Criterios de inclusión (Controles)**

Muestras de placentas embebidas en parafina provenientes de niños vivos no malformados y productos de embarazos sin complicaciones

##### **5.1.1.2. Criterios de exclusion**

###### **5.1.1.2.1. Criterios de exclusion (Casos)**

Muestras de placentas embebidas en parafina de individuos con Síndrome de Down cuyo embarazo haya cursado con patologías que puedan afectar la función e histología placentaria (preeclampsia, diabetes, síndrome antifosfolipido, trombofilias, etc.).

Muestras de placenta de individuos con trisomía 21 y que no tengan consentimiento informado.

#### **5.1.1.2.2. Criterios de exclusión (Controles)**

Muestras de placentas embebidas en parafina de individuos sanos cuyo embarazo haya cursado con patologías que puedan afectar la función e histología placentaria (preeclampsia, diabetes, síndrome antifosfolipido, trombofilias, etc.).

#### **5.1.2. Variables**

##### **5.1.2.1. Variables independientes cualitativas**

- Proteína Cistationina  $\beta$  sintasa

##### **5.1.2.2. Variables independiente cuantitativas**

- ARNm Cistationina  $\beta$  sintasa

#### **5.2. Obtención y recolección de las muestras**

Se realizó una búsqueda en la base de datos del ECLAMC (Estudio Colaborativo de Malformaciones Congénitas) entre los años 2000 al 2012. A partir de los datos se recolectaron los bloques de placentas embebidas en parafina de los niños con Síndrome de Down del archivo del Departamento de Patología del Hospital Universitario San Ignacio. Otro grupo fue tomado de la base de datos de patología perinatal del mismo departamento de Patología, cuya autopsia perinatal tenía diagnóstico sospechoso de trastorno cromosómico. Las muestras de placentas embebidas en parafina de los controles se tomaron del proyecto "Metabolismo de la homocisteína, su relación con polimorfismos de la MTRR, CBS y expresión de

genes para factores procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticos en el tercer trimestre de gestaciones normales”.

### **5.3. Extracción de ARN a partir de placentas embebidas en parafina**

La extracción de ARN a partir de dos cortes de 10  $\mu\text{m}$  obtenidos de los bloques de placentas embebidas en parafina de los casos y controles del estudio, fue realizado siguiendo el protocolo estandarizado del Laboratorio de Diagnóstico Molecular del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana (Anexo No 1).

### **5.4. Cuantificación de ARN**

La cuantificación del ARN obtenido de la extracción de las muestras de placentas embebidas en parafina se realizó mediante espectrofotometría, en el equipo Nanodrop, utilizando 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra. Para calcular la concentración en  $\text{ng}/\mu\text{l}$  del ARN contenido en cada muestra se utilizaron dos absorbancias a 260 y 280 nm y para obtener el valor de la pureza con respecto a las proteínas presentes se utilizó la relación 260/280, teniendo en cuenta que la pureza óptima oscila entre 1.8 y 2.2.

### **5.5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)**

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y cuantificación en un solo paso, esto es posible debido a que utiliza fluorocromos. La intensidad de fluorescencia producida por la sonda es directamente proporcional a la concentración del producto de PCR generado. Las reacciones se caracterizan por un punto en el tiempo (o ciclo de la PCR en tiempo real) donde se detecta por primera vez la amplificación de la diana; este valor es conocido como el ciclo umbral ( $C_t$ ) que hace referencia al tiempo en el que la intensidad de fluorescencia es mayor que la fluorescencia del ruido de fondo. En consecuencia, cuanto mayor sea la cantidad de ADN diana en el material de partida, aparecerá

un aumento más rápido de la señal fluorescente produciendo así un Ct más bajo (112).

Para la amplificación y cuantificación de los fragmentos de ARNm por PCR en tiempo real tanto para el gen CBS como para los genes *house keeping* (18-S y GAPDH), fueron diseñados y sintetizados los primers y sondas taqman específicas para cada gen por la casa comercial Roche- Molbiol (Tabla 2), se realizó la estandarización de la técnica PCR en tiempo real y la reacción se llevó a cabo con un volumen final de 20  $\mu$ l contenido en cada capilar, utilizando como control negativo agua destilada estéril (Anexo No 2). Se utilizó el equipo LightCycler 1.5® (Roche) para la PCR en tiempo real teniendo en cuenta los protocolos estandarizados para la amplificación de cada par de primers, los cuales se muestran en el capítulo de resultados.

## **5.6. Curvas de calibración**

Para el diseño de la curva estándar se realizó una PCR convencional previamente estandarizada para los genes CBS, 18S y GAPDH a partir del ADN extraído de una placenta fresca del archivo del Laboratorio de diagnóstico molecular del Instituto de Genética Humana y luego los productos obtenidos de cada gen se reamplificaron por PCR convencional y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio de 5  $\mu$ l de cada producto, las bandas se visualizaron con una lámpara de luz UV y se compararon con un patrón de peso molecular (Anexo No 3). Se llevó a cabo una purificación a los productos reamplificados de CBS, 18-S y GAPDH utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Anexo No 4). Se calculó la concentración de ADN de los reamplificados CBS, 18S y GAPDH en el nanodrop y a partir de esta concentración se obtuvo el número total de copias por  $\mu$ L en cada reamplificado utilizando el programa DNA Copy Calculator de Illumina. Conociendo el número total de copias de cada reamplificado se realizaron cinco diluciones seriadas en logaritmo base 10 con un rango de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^1$  copias/ml. Las diluciones

obtenidas de cada gen se sometieron a PCR en tiempo real por duplicado en el equipo LightCycler® obteniendo así, los puntos de la curva a partir de los Ct de las diluciones, el cálculo de la eficiencia y el error. Teniendo la curva estándar de cada gen, se extrapolaron los valores obtenidos de las muestras del estudio para determinar la concentración total de ARNm para los genes CBS, 18-S y GAPDH.

Gen	Tipo de Primer	Secuencia primer (5' – 3')	Secuencia sonda Taqman	Tamaño del fragmento
CBS	Forward	5'GACACCACCGCTGATGAG3'	5' 6FAM- CACTGAAGCCACCAG CATGTCCAG- BBQ	107 pb
	Reverse	5'TTCAGCTTCCTGGCAATG3'		
18S	Forward	5'ACGGACCAGAGCGAAAGCAT3'	5'- 6FAM- ATCGCCGGTCCGGCA TCGTTTATGG - BBQ	145 pb
	Reverse	5'GCGGGTCATGGGAATAACG3'		
GAPDH	Forward	5'TTGACCTCAACTACATGGTTT 3'	6FAM- CAAGCTTCCCGTTC TCAGCCT –BBQ	118 pb
	Reverse	5'GAAGATGGTGATGGGATTT3'		

**Tabla 2.** Descripción de las sondas y primers utilizados para la PCR en tiempo real de los genes CBS, GAPDH y 18-S

### 5.7. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es un procedimiento histopatológico que detecta la presencia de un péptido o proteína en una muestra de tejido, utilizando un anticuerpo (monoclonal o policlonal, IgG o IgM) específico contra él.

Para la detección de la expresión de la proteína CBS y su localización en placentas embebidas en parafina se realizó la estandarización de la tinción inmunohistoquímica en el departamento de patología del Hospital Universitario San Ignacio (Anexo 5), utilizando una dilución de 1:50 del anticuerpo monoclonal de ratón producido contra CBS recombinante de origen humano (CBS (15X): sc -

100519) proveniente de la casa comercial SantaCruz Biotechnology Inc., como control positivo se utilizó un tejido de hepatocarcinoma humano embebido en parafina del archivo del departamento de patología del Hospital Universitario San Ignacio. La inmunotinción fue evaluada por un único patólogo cegado para todos los datos clínicos, quien revisó todas las muestras histológicas, la intensidad de la tinción se graduó como Ausente, Leve, Moderada o Intensa y la extensión como Ausente, focal o difusa. La marcación se evaluó en el citoplasma del sincitiotrofoblasto. Para la evaluación de la expresión de la proteína se observaron 10 campos de alto poder de cada placenta mediante microscopía óptica.

### **5.8. Hematoxilina eosina**

Para la detección de los hallazgos histopatológicos los tejidos de las placentas embebidas en parafina fueron coloreadas con Hematoxilina eosina y fueron evaluadas por un único patólogo perinatal cegado para todos los datos clínicos; se observaron todos los segmentos, que incluían tres cortes del plato basal, un corte de membranas y dos cortes de cordón. Los parámetros microscópicos evaluados fueron: tamaño de las vellosidades, presencia de bordes vellositarios circinados, hiperplasia del sincitiotrofoblasto, presencia de citotrofoblasto excesivo, cisternas, inclusiones de trofoblasto y trofoblasto extravelloso, obstrucción de la circulación fetal y arteriopatía decidual (Anexo No 6).

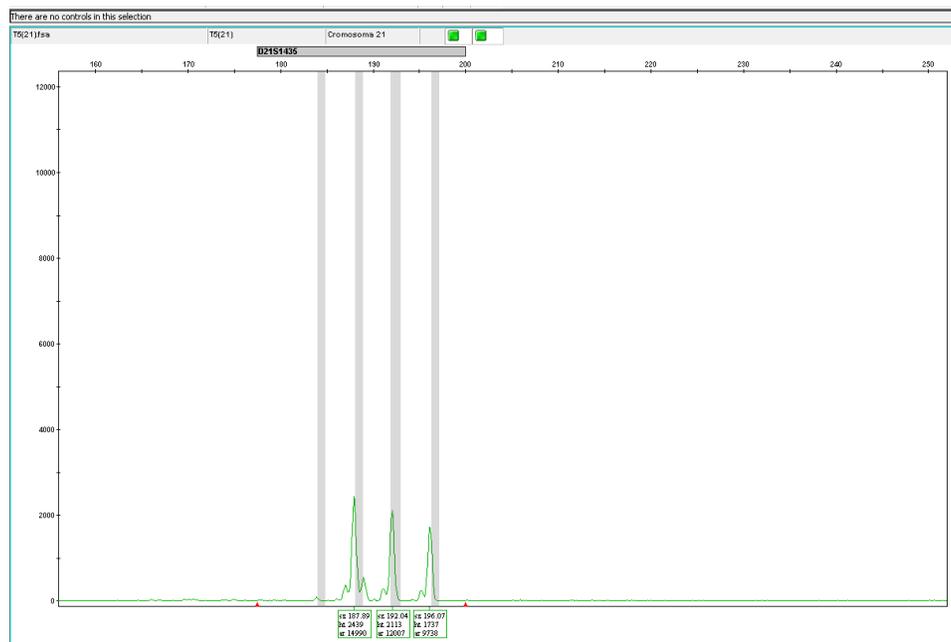
### **5.9. Manejo estadístico de los datos**

Las diferencias en los niveles de ARNm de CBS fueron evaluados por medio de la prueba estadística no paramétrica Mann-Whitney en el programa estadístico Stata 9.1 y el software GraphPad Prism 4. Los niveles de proteína por medio de la prueba de  $X^2$  y test exacto de Fisher de acuerdo a una escala de intensidad de la expresión (83) utilizando Epidat, Stata 9.1 y GraphPad Prism 4. Para los hallazgos histopatológicos se compararon variables dicótomicas con prueba binomial exacta en Stata 9.1 con un nivel de confianza del 95%. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de  $p$  era inferior a 0,05.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Descripción de la población

En el estudio fueron incluidos un total de 10 casos y 16 controles, todos confirmados por clínica y por determinación de la trisomía 21 mediante cariotipo o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente (QF –PCR) en ADN extraído de placentas embebidas en parafina (Figura 7), de los cuales se excluyeron 4 casos debido a que presentaron algún criterio de exclusión. El total de las placentas embebidas en parafina fueron recolectadas del departamento de Patología del Hospital Universitario San Ignacio. En la tabla 3 se muestran las características demográficas de la población. Las variables edad materna y sexo del recién nacido no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Las variables edad gestacional del recién nacido, peso del recién nacido y peso de la placenta presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,0022$ ,  $p= 0,0004$  y  $p= 0,0077$  respectivamente) entre casos y controles.



**Figura 7.** Se observa amplificación en el marcador D21S1435 de tres picos en proporción 1:1:1 por lo cual sugiere una trisomía en el cromosoma 21 (QF-PCR).

	<b>CASOS (n=6)</b>	<b>CONTROLES (n=16)</b>	<b>P</b>
	<b>Mediana (Min – Max)</b>	<b>Mediana (Min – Max)</b>	
<b>Edad materna (años)</b>	27,5 (22 – 38)	29,5 22 – 38	0,5789*
<b>Edad gestacional (semanas)</b>	35 (16 – 38)	38 37 – 39	<b>0,0022*</b>
<b>Peso del recién nacido/feto (gramos)</b>	1762,5 (101,2 – 2360)	2767,5 2470 -3460	<b>0,0004*</b>
<b>Peso de la placenta (gramos)</b>	249,5 (79 – 429)	450 350 – 677	<b>0,0077*</b>
<b>Sexo</b>			
<b>F</b>	5 (83%)	12 (75%)	1,0000**
<b>M</b>	1(17%)	4 (25%)	

**Tabla 3.** Características demográficas de la población  
Prueba de Mann – Whithney \*  
Prueba binomial exacta \*\*

## 6.2. PCR en tiempo real

### 6.2.1. Estandarización de las condiciones de la PCR tiempo real

El proceso de estandarización de las condiciones de la PCR en tiempo real en el laboratorio se realizó para los tres genes analizados CBS, 18-S y GAPDH. Se realizó gradiente de temperatura con diferentes concentraciones de primers para evaluar las mejores condiciones para obtener un amplicon único y con buena señal. Además se realizó una electroforesis para asegurarse que el tamaño del amplicon coincidiera con el diseñado por Roche – Molbiol. Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 4.

Gen	Concentración de primers	Temperatura de anillamiento
<b>CBS</b>	0,5 M $\mu$	60°C
<b>18S</b>	0,5 $\mu$ M	60°C
<b>GAPDH</b>	0,5 $\mu$ M	58°C

**Tabla 4.** Condiciones estandarizadas de la PCR en tiempo real para cada gen.

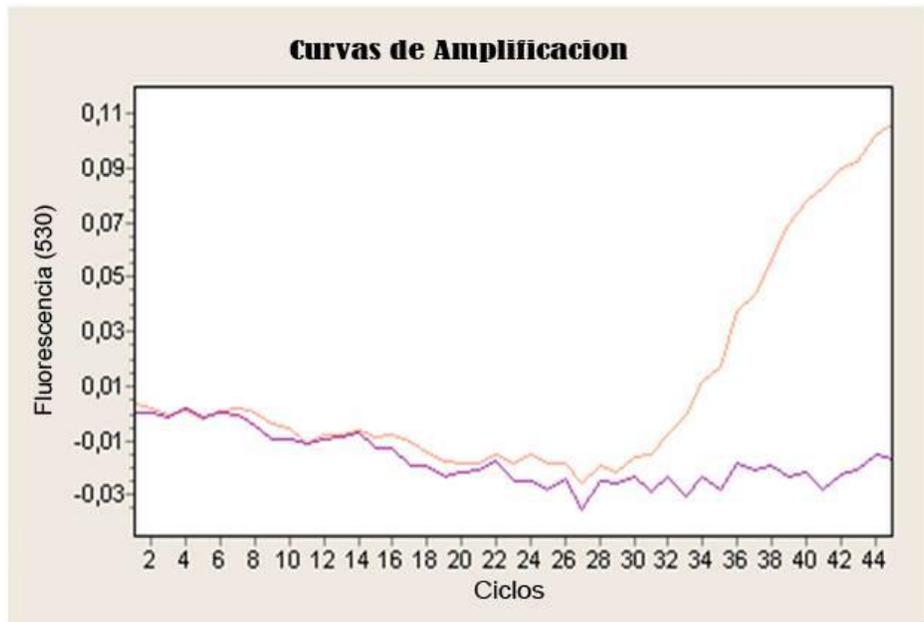
### 6.2.2. Cistationina $\beta$ Sintasa (CBS)

Se realizó la amplificación por tiempo real de un fragmento del gen CBS (Figura 8) a partir del ARN extraído de las placentas embebidas en parafina de los casos y controles teniendo en cuenta el protocolo estandarizado en el laboratorio (Tabla 5), obteniéndose un fragmento de 107 pb el cual se evidenció en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio (Figura 9).

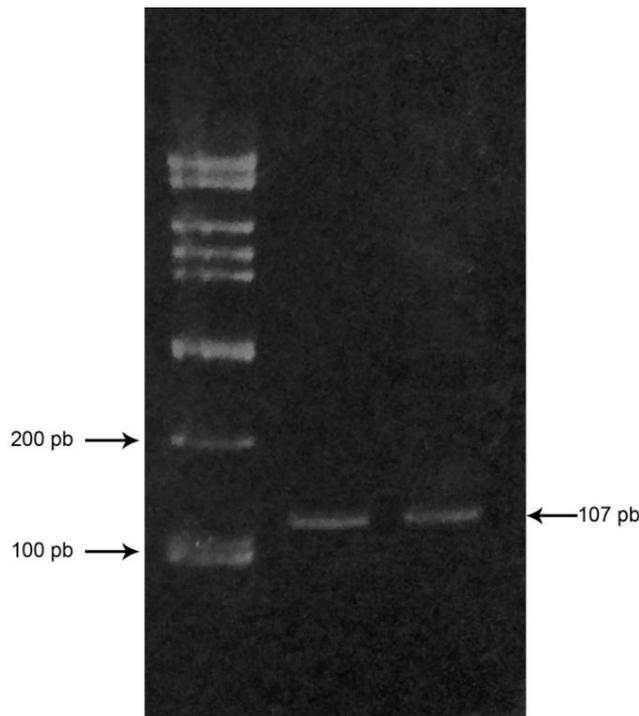
Programa	Ciclos	Modo de análisis
Transcripción reversa	1	
Denaturación	1	
Amplificación	45	Cuantificación
Enfriamiento	1	

Programa	Temperatura °C	Tiempo	Tasa de rampa	Adquisición
Transcripción reversa	63	3 min	20°C/s	Ninguna
Denaturación	95	30 seg	20°C/s	Ninguna
Amplificación	95	10 seg	20°C/s	Ninguna
	60	1 min	20°C/s	Ninguna
	72	1 seg	20°C/s	Una
Enfriamiento	40	10 seg	20°C/s	Ninguna

**Tabla 5.** Condiciones de Amplificación de CBS.



**Figura 8.** Amplificación de CBS por PCR en tiempo real. En la figura se observa Amplificación de una muestra (rosado) y un control negativo (morado).



**Figura 9.** Amplificación de CBS por PCR en tiempo real visualizado en gel de poliacrilamida al 12%. En la figura se observa la amplificación de dos muestras.

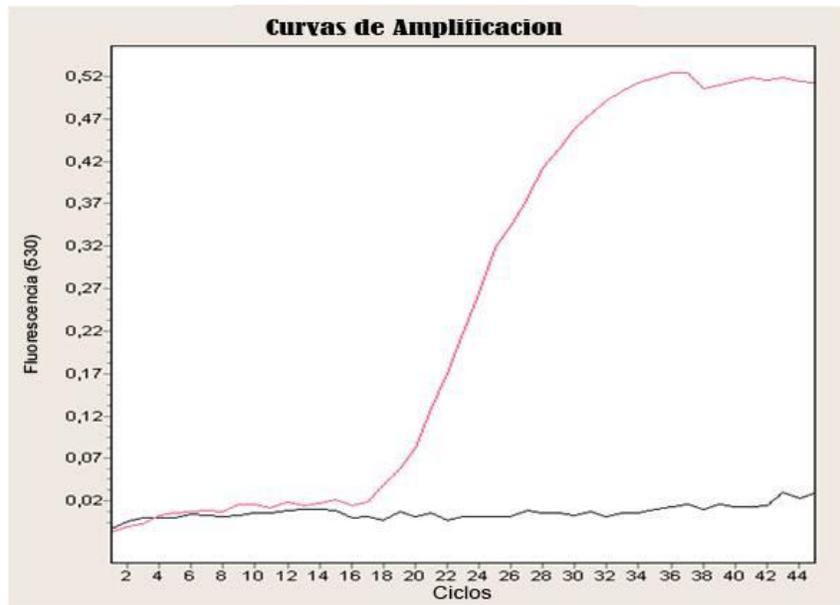
### 6.2.3. 18S ribosomal (18S)

Se realizó la amplificación por tiempo real de un fragmento del gen 18S (Figura 10) como housekeeping para normalizar los resultados de CBS teniendo en cuenta el protocolo estandarizado en el laboratorio (Tabla 6), obteniéndose un fragmento de 145 pb el cual se evidenció en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio (Figura 11).

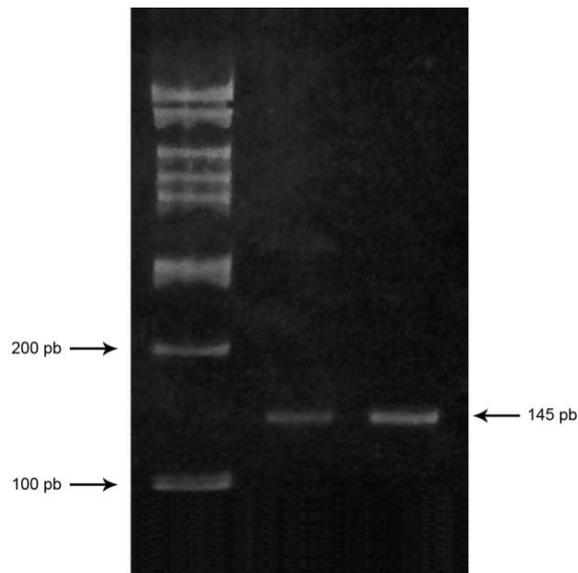
Programa	Ciclos	Modo de analisis
Transcripción reversa	1	
Denaturación	1	
Amplificación	45	Cuantificación
Enfriamiento	1	

Programa	Temperatura °C	Tiempo	Tasa de rampa	Adquisición
Transcripción reversa	63	3 min	20°C/s	Ninguna
Denaturación	95	30 seg	20°C/s	Ninguna
Amplificación	95	10 seg	20°C/s	Ninguna
	60	1 min	20°C/s	Ninguna
	72	1 seg	20°C/s	Una
Enfriamiento	40	10 seg	20°C/s	Ninguna

**Tabla 6.** Condiciones de Amplificación de 18S.



**Figura 10.** Amplificación de 18S por PCR en tiempo real. En la figura se observa Amplificación de una muestra (rosado) y un control negativo (negro).

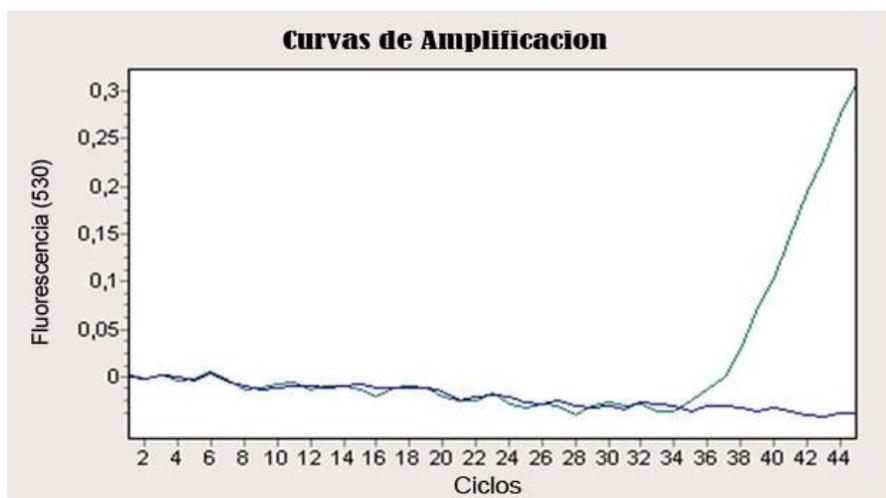


**Figura 11.** Amplificación de 18S por PCR en tiempo real visualizado en gel de poliacrilamida al 12%. En la figura se observa la amplificación de dos muestras.

#### 6.2.4. Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

Se realizó la amplificación por tiempo real de un fragmento del gen GAPDH (Figura 12) como housekeeping para normalizar los resultados de CBS teniendo

en cuenta el protocolo estandarizado en el laboratorio (Tabla 7), obteniéndose un fragmento de 118 pb el cual se evidencio en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio (Figura 13).

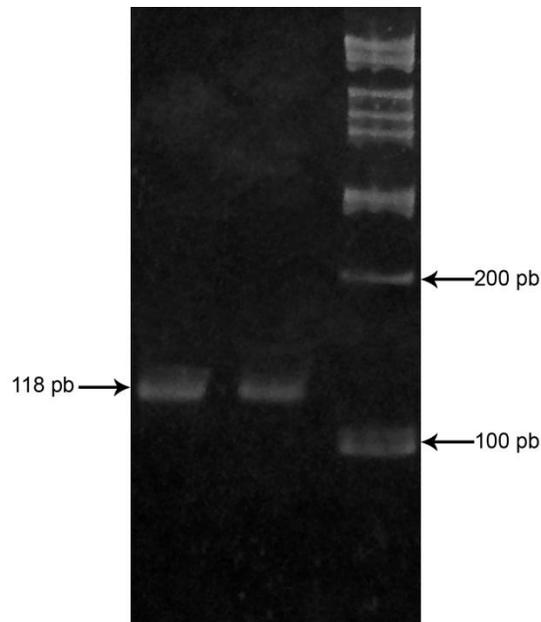


**Figura 12.** Amplificación de GAPDH por PCR en tiempo real. En la figura se observa Amplificación de una muestra (verde) y un control negativo (azul).

Programa	Ciclos	Modo de analisis
Transcripción reversa	1	
Denaturación	1	
Amplificación	45	Cuantificación
Enfriamiento	1	

Programa	Temperatura °C	Tiempo	Tasa de rampa	Adquisición
Transcripción reversa	63	3 min	20°C/s	Ninguna
Denaturación	95	30 seg	20°C/s	Ninguna
Amplificación	95	10 seg	20°C/s	Ninguna
	58	1 min	20°C/s	Ninguna
	72	1 seg	20°C/s	Una
Enfriamiento	40	10 seg	20°C/s	Ninguna

**Tabla 7.** Condiciones de Amplificación de GAPDH.



**Figura 13.** Amplificación de GAPDH por PCR en tiempo real visualizado en gel de poliacrilamida al 12%. En la figura se observa la amplificación de dos muestras.

### 6.2.5. Curvas de calibración

Las curvas de calibración para los genes a evaluar se realizaron a partir de ADN de placenta fresca, el cual fue amplificado y reamplificado por PCR convencional, observado en gel de agarosa al 1%, purificado, cuantificado por espectrofotometría y se obtuvo la concentración de copias/ $\mu\text{L}$  de cada transcrito de acuerdo a los cálculos de Illumina los cuales se basan en lo reportado por Overbergh et al. (115) el cual propuso que con el peso molecular del fragmento de ADN es posible calcular el número de copias así:

$$\mu\text{g}/\text{pmol} = \text{Tamaño en pb del DNA ds} \times 649 \text{ g/mol} \times 10^{-12} \text{ mol}/\text{pmol} \times 10^6 \mu\text{g/g}$$

$$\text{Copias} = (\text{ng}/\mu\text{l de DNA} / \mu\text{g}/\text{pmol}) \times 10^{-12} \text{ mol}/\text{pmol} \times 10^{-3} \text{ mg/g} \times \text{numero de Avogadro}$$

Donde pb= pares de bases, ds= doble cadena, nt= nucleótidos. El promedio del peso de un par de base es 649 g/mol. El número de Avogadro es  $6.022 \times 10^{23}$  copias/mol.

En la Tabla 8 se observan los valores de eficiencia, porcentaje de eficiencia y coeficiente de correlación de las curvas de calibración para los genes CBS, 18S y GAPDH. La curva de calibración para los tres genes se realizó a partir de cinco diluciones seriadas con un rango de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^1$  copias/ml.

Gen	Eficiencia	% Eficiencia	P
CBS	2,13	113%	0,0283
18S	1,90	90%	0,0395
GAPDH	2,22	122%	0,0006

**Tabla 8.** Valores de las curvas de calibración de los genes CBS, 18S y GAPDH

#### 6.2.6. Resultados de la cuantificación absoluta de ARNm del gen CBS en muestras de placentas embebidas en parafina

Se logró amplificar ARNm en el 100% de los casos y controles. La cuantificación absoluta se realizó en el software LightCycler 1.5 con respecto a la curva estándar. Para el estudio del gen CBS se hicieron análisis de la expresión absoluta con respecto a la curva estándar normalizando con los genes 18S y GAPDH. La normalización con los genes housekeeping 18S y GAPDH se llevó a cabo de la siguiente manera:

$$\text{Normalización} = \frac{\text{copias}/\mu\text{g gen Blanco}}{\text{copias}/\mu\text{g gen Housekeeping}}$$

Posteriormente se estableció cuantas veces se encontraba aumentada o disminuida la expresión en los casos con respecto a los controles de la siguiente manera:

$$\text{Tasa de expresión} = \frac{\text{Mediana expresión en casos}}{\text{Mediana expresión en controles}}$$

Para llevar a cabo los ensayos de expresión de CBS, 18S y GAPDH se utilizaron como control positivo un ARN extraído de una muestra de placenta fresca que siempre amplificó y como control negativo agua que no presentó amplificación.

#### **6.2.6.1. Genes housekeeping**

Para corroborar la utilidad de los genes 18S y GAPDH como housekeeping se analizó si existían diferencias en la expresión entre casos y controles. Los resultados arrojaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los casos y controles tanto en 18S ( $p= 0,0653$ ) como en GAPDH ( $p=0,3020$ ) por lo tanto fueron utilizados como housekeeping en este estudio.

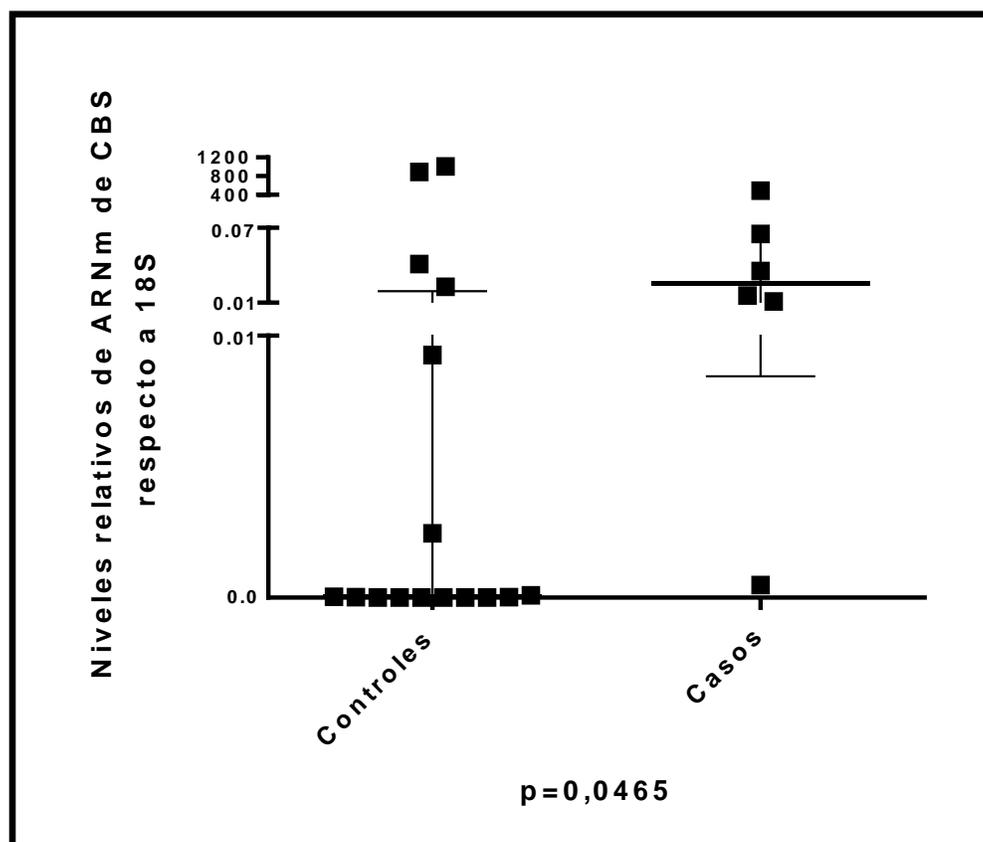
#### **6.2.6.2. CBS**

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles normalizando con 18S ( $p= 0,0465$ ) y una expresión aumentada de CBS en los casos de 871 veces con respecto a los controles. Normalizando con GAPDH no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles ( $p= 0,658$ ) pero sí un ligero aumento en la expresión de CBS en los casos 1,12 con respecto a los controles. En la figura 14 se muestran los resultados de la cuantificación de CBS normalizando con 18S y en la figura 15 resultados de la cuantificación de CBS normalizando con GAPDH. En la tabla 9 se muestran los resultados de la cuantificación de CBS.

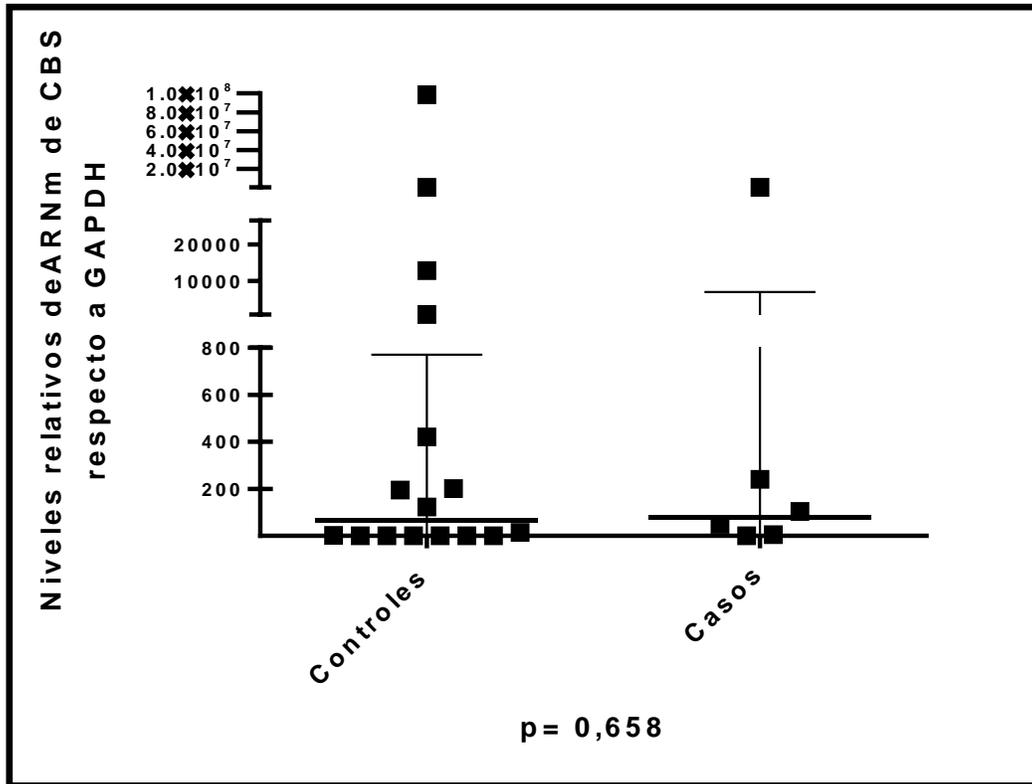
Se realizó factor de normalización calculando la media geométrica entre los dos genes housekeeping y luego normalizando CBS con la media geométrica obtenida de GAPDH y 18S, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,210$ ) pero sí un ligero aumento en la expresión de CBS en los casos de 19,5 veces con respecto a los controles.

	CBS/18S	CBS/GAPDH
<b>Controles</b>		
Mediana	$2,94 \times 10^{-5}$	68,80
Rango Min – Max	$7,55 \times 10^{-9}$ – 1006,8	$2,90 \times 10^{-5}$ - 98662207,3
<b>Casos</b>		
Mediana	0,0256	77,01
Rango Min – Max	$4,87 \times 10^{-4}$ – 488	1,2556 – 27222,22
<b>Tasa de expresión casos/controles</b>		
	871	1,12
<b>P</b>	0,0465	0,658

**Tabla 9.** Valores normalizados con 18S y GAPDH de los niveles de ARNm de CBS en placentas embebidas en parafina.



**Figura 14.** Cuantificación de los niveles de ARNm de CBS normalizando con 18S



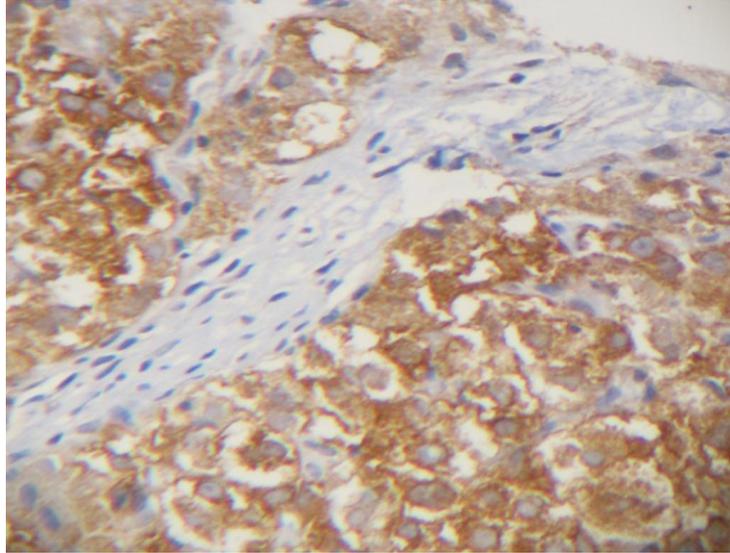
**Figura 15.** Cuantificación de los niveles de ARNm de CBS normalizando con GAPDH

### 6.3. Inmunohistoquímica

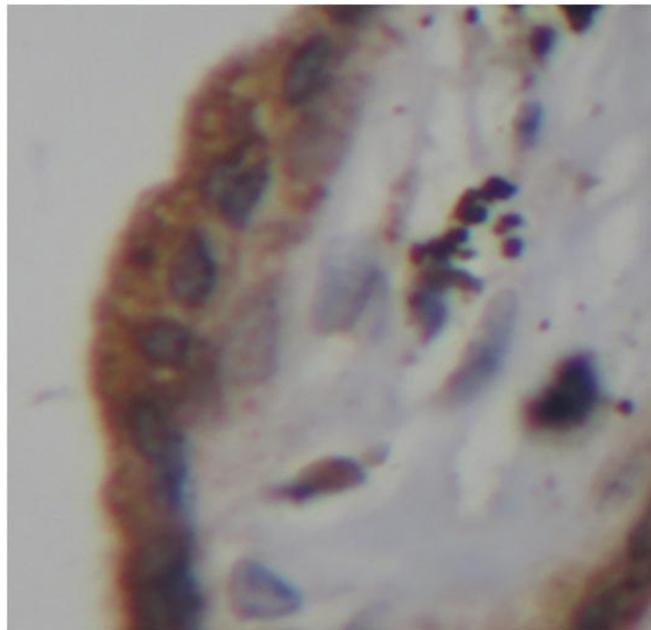
Para llevar a cabo la detección de los niveles de expresión de la proteína CBS y su localización en placentas embebidas en parafina se realizó inmunohistoquímica utilizando el kit comercial ImmunoCruz™ y un anticuerpo monoclonal de ratón producido contra CBS recombinante de origen humano en dilución 1:50 proveniente de la casa comercial SantaCruz Biotechnology Inc.. Se utilizó como control positivo un tejido de hepatocarcinoma humano embebido en parafina (Figura 16). Tanto la localización como los niveles de expresión de CBS fueron evaluadas por único patólogo cegado.

En el 100% de los casos y controles se observó la localización de CBS a nivel citoplasmático del sincitiotrofoblasto (Figura 17).

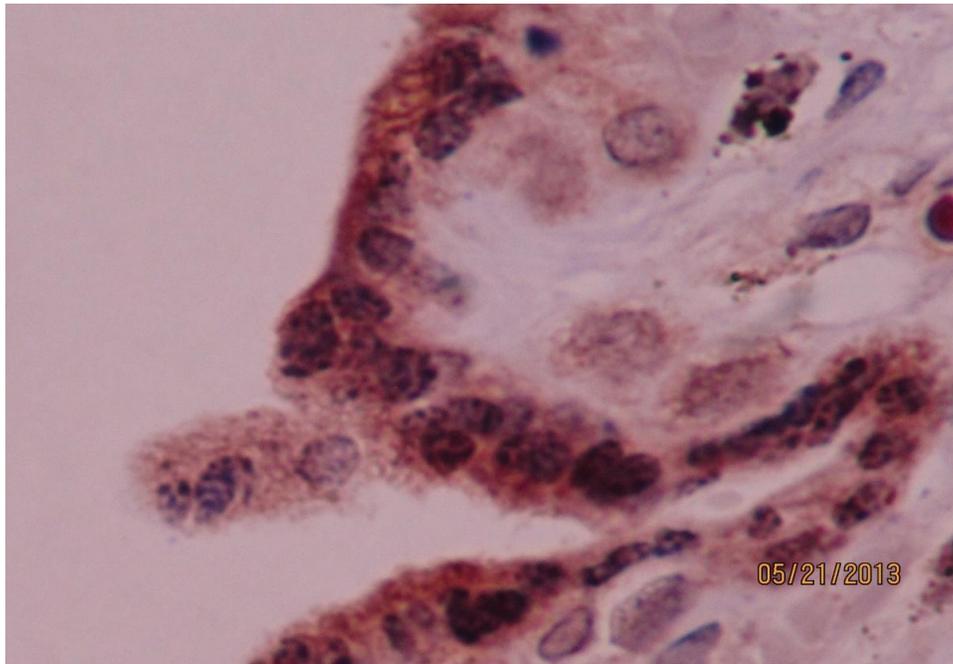
Para la evaluación de la expresión de la proteína se observaron 10 campos por placenta mediante microscopía óptica y la inmunoreacción se clasificó en intensa (Figura 18), moderada (Figura 19) y leve (Figura 20) según su nivel de tinción. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,009$ ) entre casos y controles. En la tabla 10 y en la figura 21 se muestran los resultados de la inmunohistoquímica.



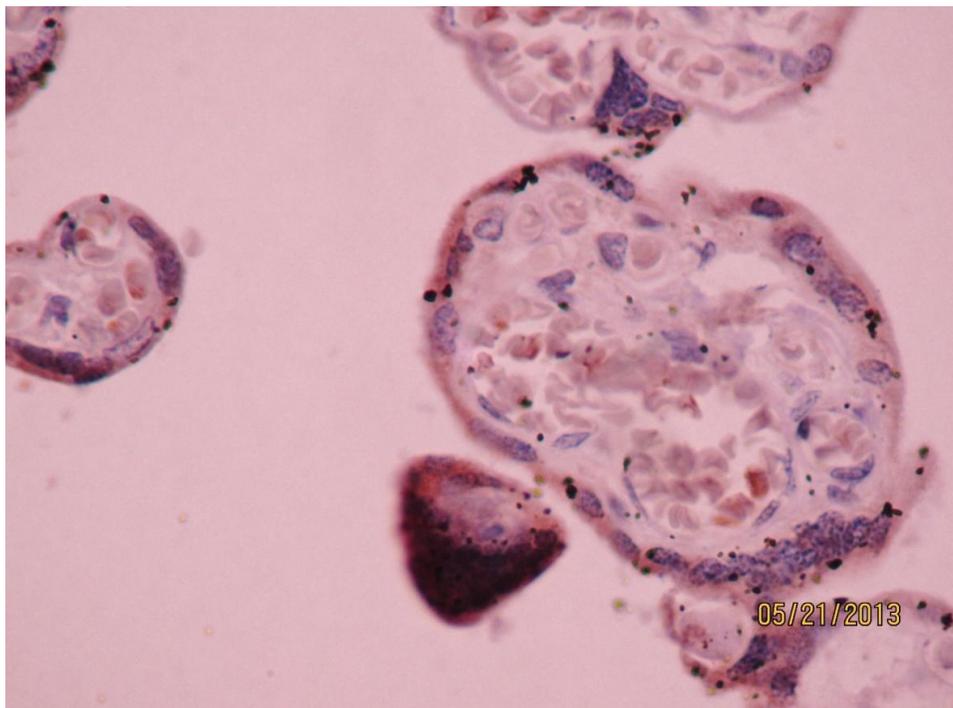
**Figura 16.** Control positivo hepatocarcinoma. Se observa marcación intensa de CBS en color café. 16X



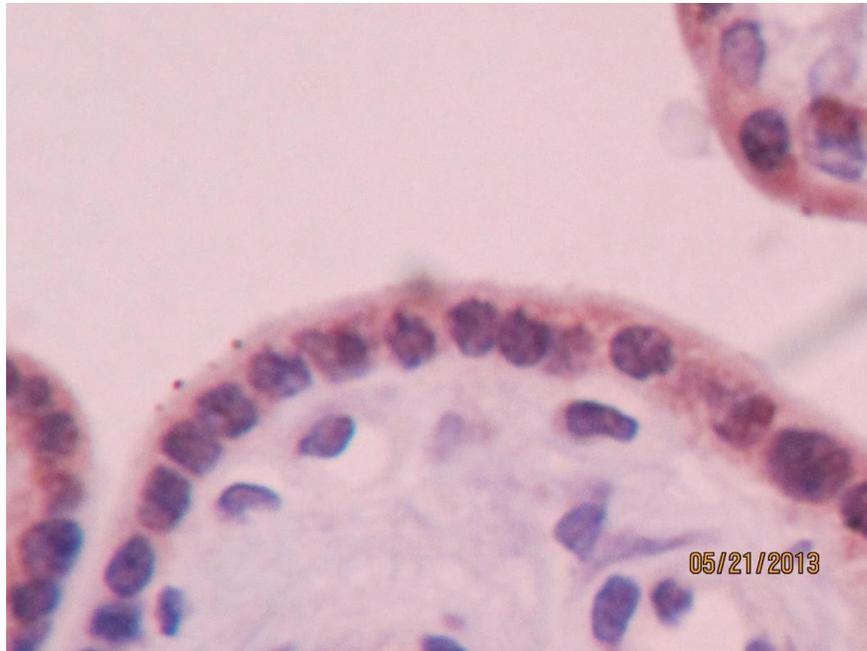
**Figura 17.** Localización citoplasmática de CBS en placentas. 40X



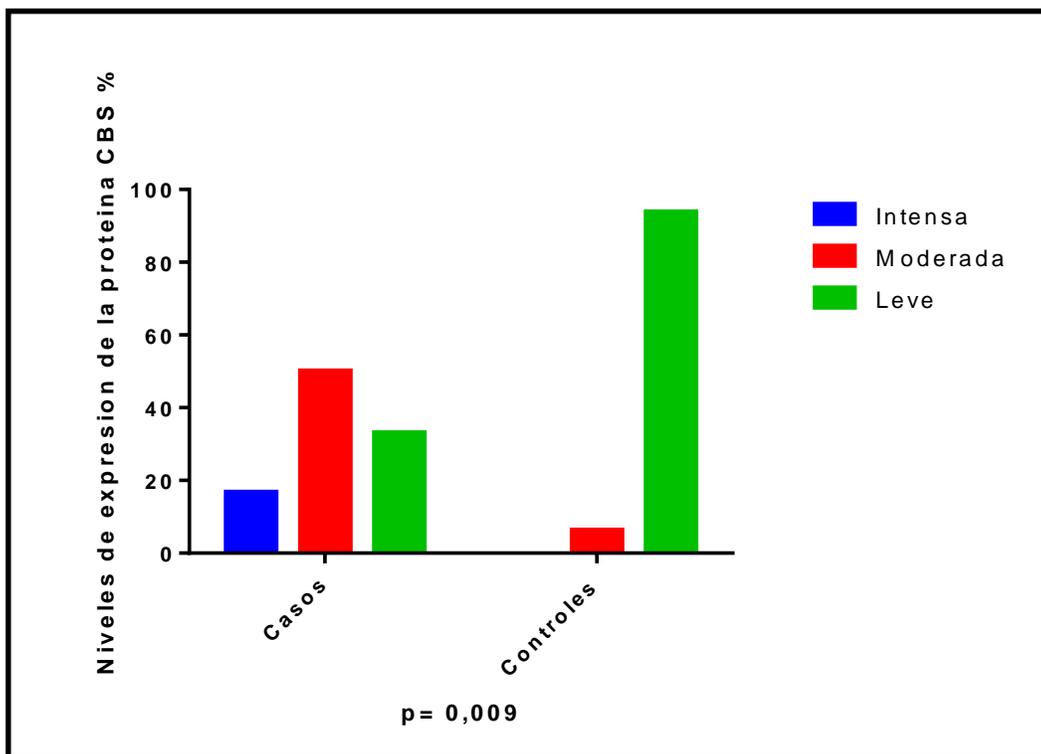
**Figura 18.** Marcación intensa de la proteína CBS en placenta. 40X



**Figura 19.** Marcación moderada de la proteína CBS en placenta. 16X



**Figura 20.** Marcación leve de la proteína CBS en placenta. 40X



**Figura 21.** Niveles de expresión de la proteína CBS (%) en placentas embebidas en parafina

	<b>INTENSA</b>	<b>MODERADA</b>	<b>LEVE</b>	<b>p</b>
<b>Casos</b>	16,67%	50,00%	33%	0,009
<b>Controles</b>	0%	6,25%	93,75%	

**Tabla 10.** Niveles de expresión de la proteína CBS en placentas embebidas en parafina

#### **6.4. Hematoxilina eosina**

Para la evaluación de los hallazgos histopatológicos los tejidos de placenta embebidos en parafina se tiñeron con hematoxilina eosina y un patólogo fetal realizó la observación de todos los segmentos, que incluían tres cortes del plato basal, un corte de membranas y dos cortes de cordón. Los parámetros microscópicos evaluados fueron: tamaño de las vellosidades, presencia de bordes vellositarios circinados, hiperplasia del sincitiotrofoblasto, presencia de citotrofoblasto excesivo, cisternas, inclusiones de trofoblasto y trofoblasto extravelloso, obstrucción de la circulación fetal y arteriopatía decidual. El patólogo fue cegado al diagnóstico fetal y a los resultados moleculares para la evaluación histopatológica.

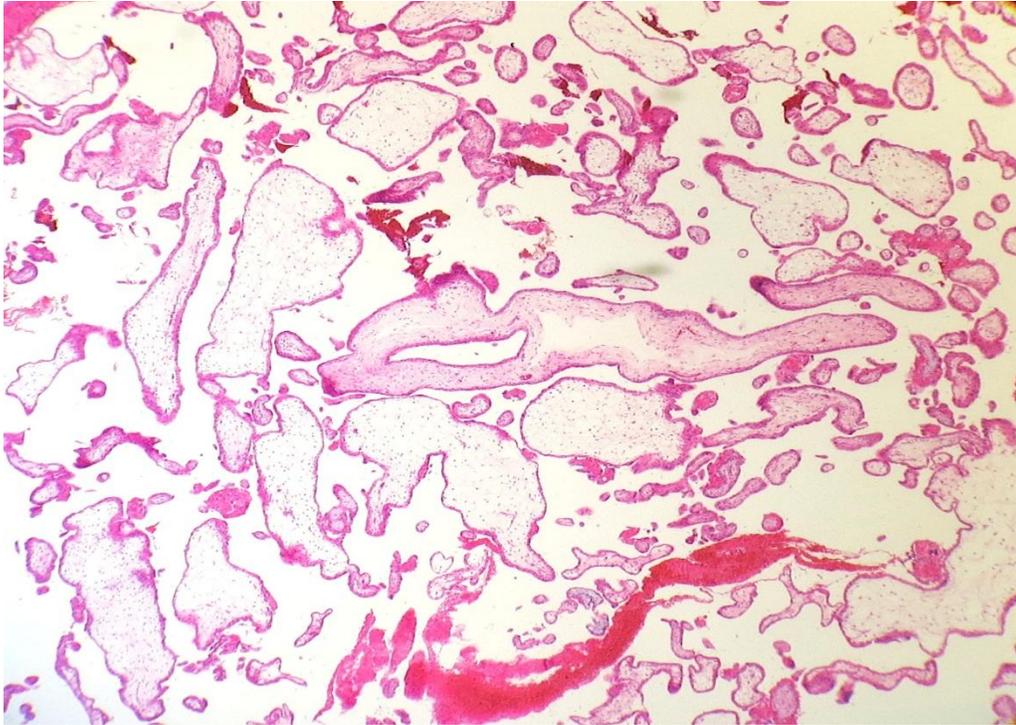
En la tabla 11 y en las figuras 22, 23, 24 y 25 se muestran los hallazgos microscópicos en la evaluación histopatológica de las placentas. Las variables tamaño de las vellosidades, presencia de bordes vellositarios circinados e inclusiones de trofoblasto presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,0171$ ,  $p= 0,0007$  y  $p= 0,0037$  respectivamente) entre casos y controles. Las variables hiperplasia del sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto excesivo, presencia de cisternas, presencia de trofoblasto extravelloso, obstrucción de la circulación fetal y arteriopatía decidual no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. En las figuras 26, 27 y 28 se observa una placenta de 21 semanas de gestación como control normal.

HALLAZGO	CASOS n (%)	CONTROLES n (%)	P
Tamaño de las vellosidades			
Normales	2 (33,3%)	14 (87,5%)	
Grandes	2 (33,3%)	0 (0%)	<b>0,0171*</b>
Pequeñas	2 (33,3%)	2 (12,5%)	
Bordes vellositarios circinados	6 (100%)	0 (0%)	<b>0,0007**</b>
Hiperplasia del sincitiotrofoblasto	4 (67%)	14 (88%)	0,1665**
Citotrofoblasto excesivo	1 (0,16%)	0 (0%)	0,3101**
Presencia de cisternas	1 (0,16%)	0 (0%)	0,3101**
Inclusiones de trofoblasto	3 (50%)	0 (0%)	<b>0,0037**</b>
Presencia de trofoblasto extravelloso	0 (0,0%)	9 (56%)	0,0935**
Obstrucción de la circulación fetal	3 (50%)	8 (50%)	1,0000**
Estasis leucocitaria	3 (100%)	3 (37,5%)	
Cojinete	0 (0%)	4 (50%)	0,1793*
Recanalización	0 (0%)	1 (12,5%)	
Arteriopatía decidual	0 (0%)	4 (25%)	1,0000**

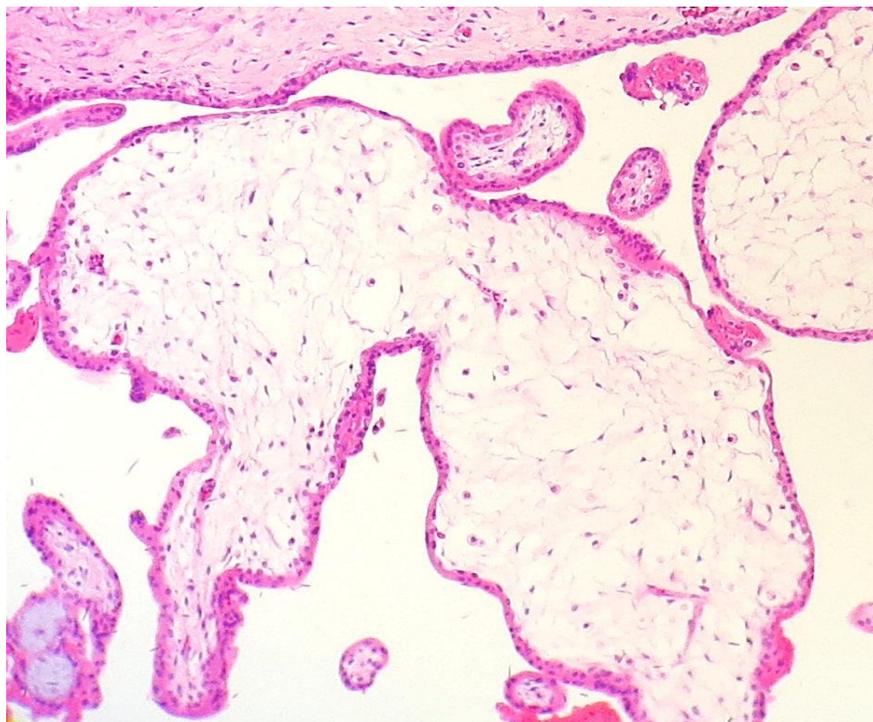
**Tabla 11.** Hallazgos microscópicos en la evaluación histopatológica de las placentas

Prueba de chi cuadrado \*

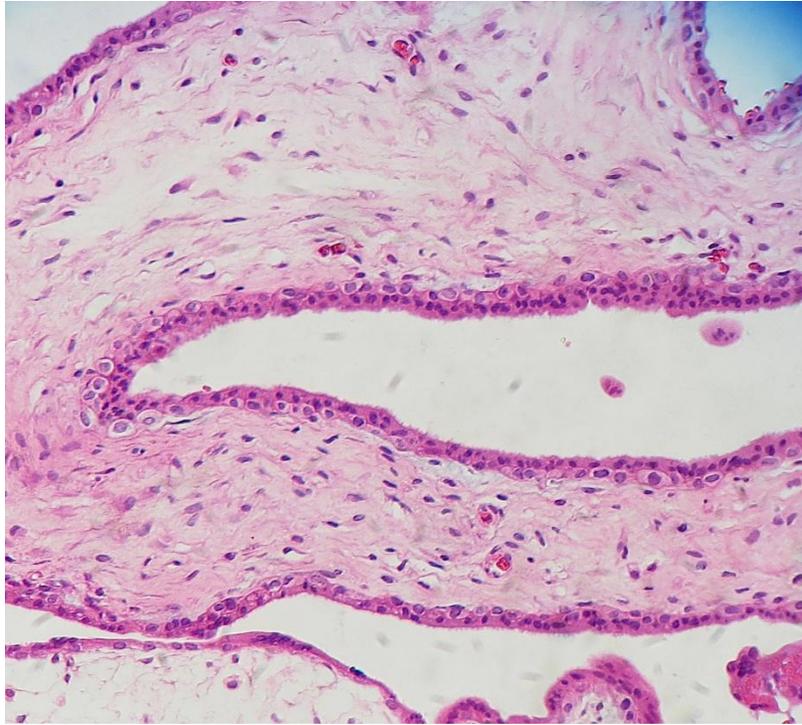
Prueba exacta binomial \*\*



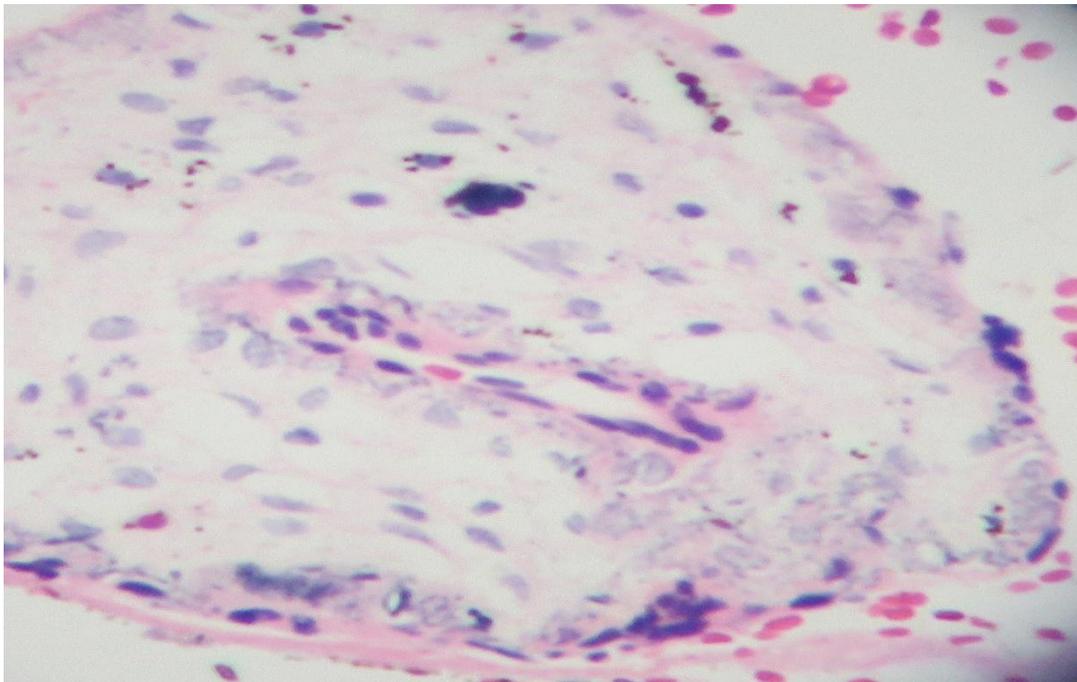
**Figura 22.** Aspecto general de la placenta con trastorno cromosómico. Edema de vellosidades, bordes vellositarios irregulares (circinados), en el centro, inclusión de trofoblasto y cisterna. Hematoxilina-Eosina 4X



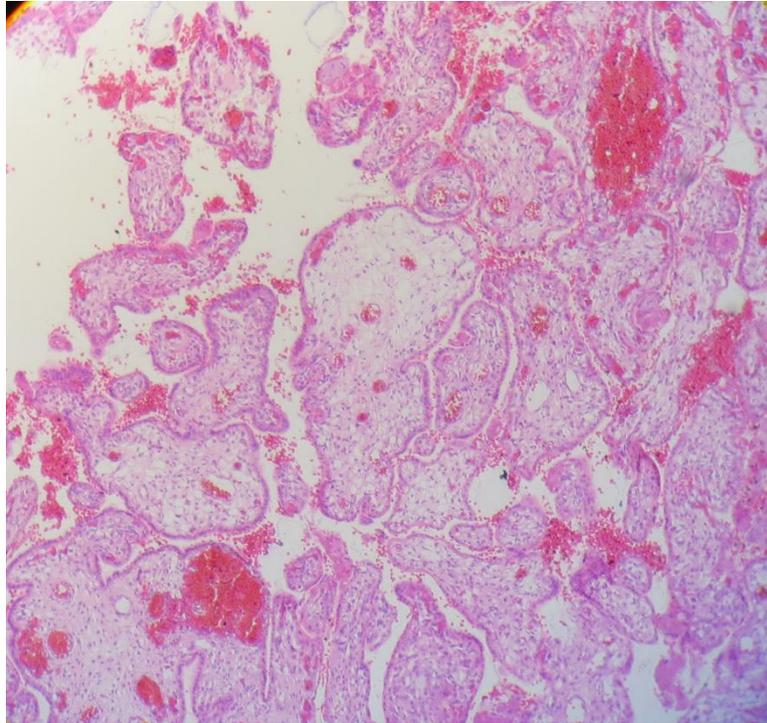
**Figura 23.** Vellosidad de bordes irregulares. Hematoxilina-Eosina 16X



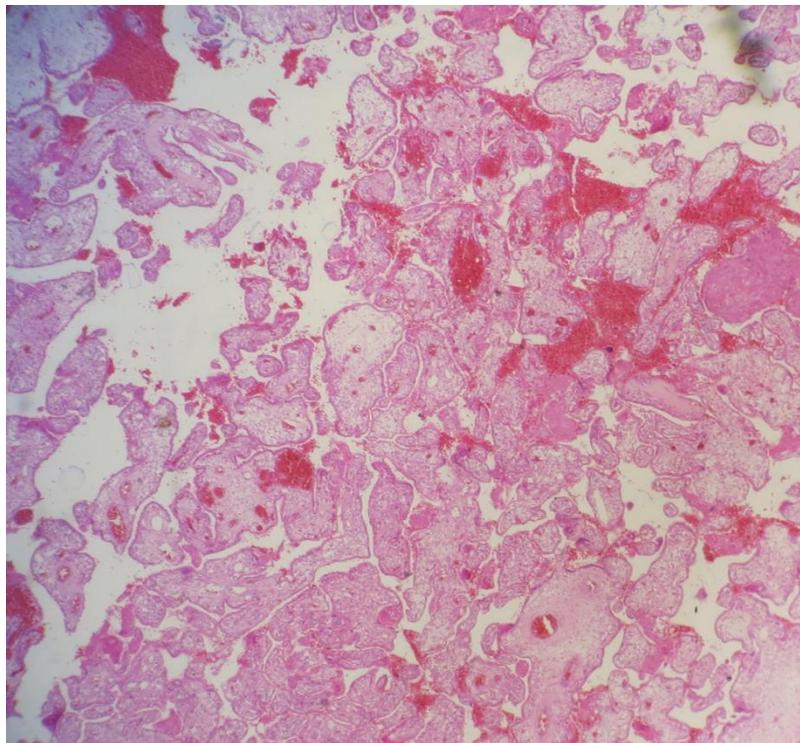
**Figura 24.** Inclusión de trofoblasto. Hematoxilina-Eosina 40X



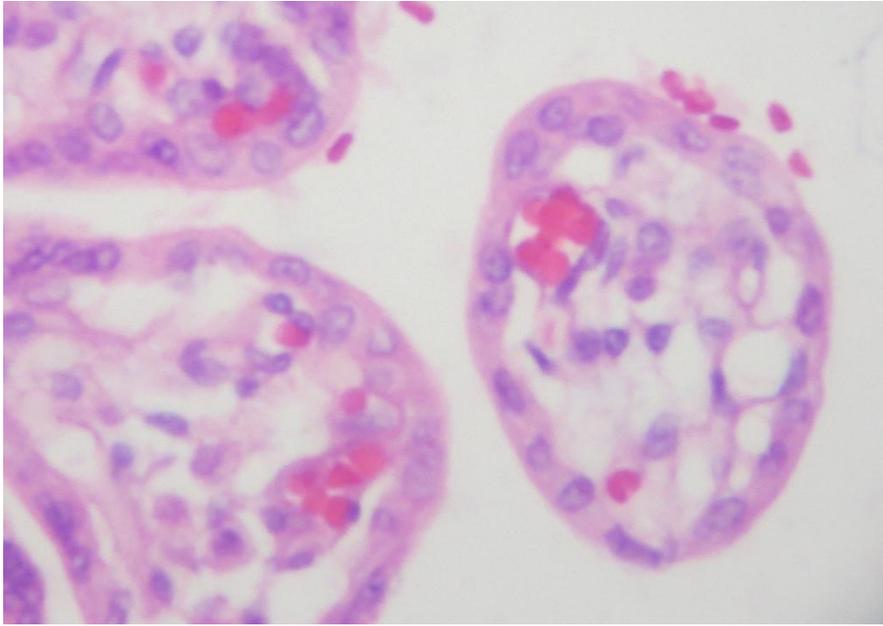
**Figura 25.** Inclusión de trofoblasto. Hematoxilina-Eosina 40X



**Figura 26.** Control normal placenta de 21 semanas de gestación. Hematoxilina eosina 4x



**Figura 27.** Control normal placenta de 21 semanas de gestación. Hematoxilina eosina 10x.



**Figura 28.** Control normal placenta de 21 semanas de gestación. Hematoxilina eosina 40x.

## 7. DISCUSION

En este estudio se encontraron aumentados los niveles relativos ARNm del gen CBS respecto a 18S ( $p= 0,0465$ ) y los niveles de expresión de la proteína ( $p= 0,009$ ) en placentas provenientes de pacientes con síndrome de Down, con diferencias estadísticamente significativas.

Se observó un aumento significativo de 871 veces de los niveles de ARNm de CBS normalizando con 18S en placentas con SD. Sin embargo se encontró solo un ligero aumento de 1,12 veces de los niveles de ARNm de CBS relativos a GAPDH. Respecto a la expresión de GAPDH, Meller *et al.*, evidenciaron que los niveles de expresión de GAPDH son inestables durante el embarazo, debido a que la placenta es un tejido en desarrollo y se somete a diversos cambios en el sistema endocrino e inmune, lo cuales están mediados por cambios en los niveles de expresión génica (118). Patel, *et al.*, observaron que la expresión de GAPDH se ve afectada por la edad gestacional y la hipoxia de la placenta. Encontraron que el nivel de expresión varió considerablemente entre muestras individuales y la expresión de GAPDH en placentas de primer trimestre fue 16 veces mayor con respecto a las de tercer trimestre (119). Sin embargo en el 2008 Murthi *et al.*, mostraron que GAPDH es un gen de expresión estable tanto en la decidua como en las vellosidades placentarias (120). Por otro lado, Patel, *et al.*, estudiaron los niveles de expresión génica utilizando a 18S como gen housekeeping en placentas obtenidas a partir de embarazos normales demostrando que los niveles de 18S son constantes durante la gestación y su expresión no varía entre individuos (119). Murthi, *et al.*, evaluaron al gen 18S para ser utilizado como housekeeping en estudios de expresión génica en tejidos de placenta provenientes de embarazos que cursaron con restricción de crecimiento intrauterino, encontrando que 18S se expresa de manera estable en placentas y su expresión no se ve afectada por complicaciones de la gestación (120). En el 2013, Arenas, *et al.*, evaluaron la expresión de 18S en placenta y miometrio sometidos a tratamientos con mitógenos, encontrando que el gen 18S se mantiene

estable aun en condiciones experimentales (127). Por lo tanto los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que 18S es un housekeeping de elección para placentas.

Empleando el factor de normalización entre los dos genes housekeeping no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,210$ ), lo cual puede ser atribuido a la expresión inestable de GAPDH.

La localización de CBS se evidencio que en el 100% de los casos y controles se encuentra a nivel citoplasmático del sincitiotrofoblasto, lo cual es consistente con lo reportado por Ichinohe, *et al.*, quienes encontraron localización citoplasmática de CBS en astrocitos de cerebros provenientes de pacientes con y sin SD (83). En un estudio reportado en el 2013 por Yamamoto, *et al.*, identificaron que la enzima CBS se expresa en el citoplasma de los túbulos proximales del riñon (128).

En cuanto a los niveles de expresión de la proteína se encontró que en el 50% de los casos los niveles de expresión fueron de marcación moderada con respecto a los controles que el 93,75% revelaron una expresión leve de CBS con diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,009$ ). La marcación leve de los controles es consistente con lo reportado por Solanky *et al.*, quienes estudiaron la expresión en placentas de varios genes que codifican para enzimas, transportadores y receptores que participan en el metabolismo del folato y la homocisteína-metionina, encontrando cambios que indican favorecimiento de la activación de las vías del folato y remetilación de la homocisteína con expresión mínima del gen CBS, además detectaron que la expresión de CBS es constante en placentas tanto de primer trimestre como a término (8). Ichinohe, *et al.*, encontraron una mayor expresión de la proteína CBS en astrocitos de cerebros de pacientes con SD en comparación con los de los individuos normales de la misma edad (83).

	CASOS	CONTROLES	P	TECNICA	REFERENCA
<b>Proteína</b>	15	10	S	Ensayo enzimático	<i>Chadefaux, et al.</i>
<b>ARNm</b>	19	44	S	RT-PCR	<i>Taub, et al.</i>
<b>ARNm</b>	Línea celular SD (CMK)	Línea celular sin SD (CMS)	S	RT-PCR Western blot Western blot	<i>Ge, et al.</i> <i>Ichinohe, et al.</i>
<b>Proteína</b>	18	20	S	Inmunohistoquímica	<i>al.</i>
<b>Proteína</b>	8	7	NS	MALDI –MS	<i>Shin, et al.</i>

**Tabla 12.** Estudios que han reportado medición de CBS.

**NS:** No significativo

**S:** Significativo

**P:** <0,05

En la bibliografía disponible existen muy pocos estudios sobre los niveles de expresión de proteína y actividad enzimática de la CBS en SD. Chadefaux, *et al.*, demostraron un incremento del 157% de la actividad enzimática de CBS en fibroblastos de pacientes con trisomía 21 (116). Taub, *et al.*, reportaron un aumento de los niveles de transcripción de CBS medidos por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa) de 12 veces mayor en mieloblastos con SD con respecto a los mieloblastos sin SD, mostrando diferencias estadísticamente significativas (124). Ichinohe, *et al.*, encontraron un aumento de CBS a nivel de proteína utilizando western blot e inmunohistoquímica en cerebros de individuos con SD de aproximadamente tres veces mayor con

respecto a los individuos normales (83). Ge, *et al.*, analizaron la regulación de la transcripción de CBS en dos líneas celulares de mieloblastos, una con SD (AMK) y otra sin SD (AMS) usando RT-PCR y western blot encontrando 40 veces más transcritos de CBS en AMK (5). Sin embargo en el 2005 Shin, *et al.*, midieron la expresión de la proteína CBS utilizando espectrometría de masas MALDI (MALDI-MS) en cerebros de fetos con SD encontrando niveles comparables de la proteína entre casos y controles (117). En la tabla 13 se muestra los estudios donde se han realizado mediciones de CBS. Los resultados del presente estudio muestran que los niveles de ARNm de CBS se expresan 871 veces más en placentas provenientes de pacientes con SD que en los controles.

En cuanto a los hallazgos histopatológicos evidenciados en placentas con SD fueron presencia de bordes circinados ( $p= 0,0007$ ) e inclusiones de trofoblasto ( $p= 0,0037$ ) con diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Kraus, *et al.*, quienes sugieren que algunos cambios morfológicos en la placenta como contorno vellositario irregular (bordes circinados), grandes e irregulares espacios vasculares estromales y presencia de invaginaciones del trofoblasto intermedio pueden estar asociados a cromosopatías (99, 111). Stocker, *et al.*, identificó alteraciones placentarias relacionadas con trastornos cromosómicos, tales como la morfología vellositaria hídrica, inclusiones de trofoblasto, cisternas y bordes circinados (101, 111). Ovalle *et al.*, describieron hallazgos placentarios sugerentes de defectos cromosómicos entre las cuales se encuentran vellosidades que pueden ser normales o inmaduras para la gestación, inclusiones del trofoblasto, estroma inmaduro, trofoblasto hipoplásico, edema vellositario, fibrosis vellositaria o calcificaciones (125). Sin embargo en los resultados del presente estudio no se encontró presencia de citotrofoblasto excesivo, presencia de cisternas ni hiperplasia de sincitiotrofoblasto lo cual es discrepante con lo reportado por Malassine, *et al.*, quienes identificaron que específicamente para trisomía 21, hay alteración en la disposición del trofoblasto, asociado con la maduración alterada de las vellosidades observándose persistencia de doble capa de trofoblasto en

vellosidades que debieran tener únicamente una capa trofoblástica (102,111). Aunque se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la variable alteración del tamaño de las vellosidades ( $p= 0,0171$ ), no pudo tenerse en cuenta para el análisis debido a que los controles corresponden a placentas maduras mientras que los casos incluyen placentas de segundo trimestre.

La hipótesis que se ha postulado acerca de las implicaciones de la sobreexpresión de CBS a nivel de placentas de fetos con SD es que la triplicación de la enzima CBS presente en el sincitiotrofoblasto podría afectar la vía de la homocisteína-metionina, lo que podría llevar a una disminución del glutatión que junto con la sobreexpresión de SOD-1 conlleva a estrés oxidativo debido a una regulación deficiente del  $H_2O_2$ , causando posiblemente alteraciones histológicas a la placenta tales como presencia de bordes vellositarios circinados, hiperplasia del sincitiotrofoblasto, presencia de citotrofoblasto excesivo, cisternas, inclusiones de trofoblasto y trofoblasto extravelloso y estos cambios placentarios podrían estar involucrados en los hallazgos fenotípicos y patológicos en individuos con SD. Se ha encontrado evidencia a favor de esta hipótesis. Pogribna, *et al.*, han postulado que un incremento en la vía de transulfuración debido a la sobreexpresión de CBS indirectamente disminuye la actividad de la MS, con lo cual se promueve la acumulación de 5-MTHF que conlleva a la formación de una “trampa de metilo” y a su vez a una reducción en la conversión de 5-MTHF a THF; presentándose una disminución significativa de los niveles de metionina, SAM, SAH, homocisteína y glutatión y se refleja también un aumento en la producción de adenosina, resultando en altos niveles de ácido úrico. Lo anterior resulta en un déficit del folato funcional secundaria a la sobreexpresión de CBS y a la formación de la trampa de folato, lo que podría contribuir a la patología metabólica del SD (2). Ichihone, *et al.*, postularon que la sobreexpresión de CBS podría ser una causa de la anormalidad en el desarrollo cognitivo en niños con SD y de Alzheimer tipo demencia en adultos con SD. Zitnanová, *et al.*, revelaron que la acumulación de ácido úrico debido al exceso de producción de adenosina secundaria a la sobreexpresión de CBS conlleva a un aumento del estrés oxidativo en SD (86). En el 2012, Perluigi, *et al.*, demostraron que los bajos niveles de glutatión debido a la

sobreexpresión de CBS y la triplicación de la actividad de SOD1 conllevan a un desequilibrio en la relación de SOD1 y glutatión lo que conduce a un estrés oxidativo debido a la acumulación de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) intracelular. Por lo tanto el desequilibrio entre la producción de especies reactivas y la capacidad de desintoxicar rápidamente a la célula conlleva a un déficit de memoria y aprendizaje en individuos con SD (76). Varios autores han descrito que CBS puede convertir cisteína en sulfuro de hidrógeno, que es un neuromodulador importante en el cerebro. La sobreexpresión de CBS conduce a la producción de niveles tóxicos de  $H_2S$ , los cuales podrían desempeñar un papel importante en la discapacidad cognitiva y Alzheimer en SD (76, 83, 84). Barnejee, et al., informó que las vellosidades coriónicas de placentas con SD muestran un aumento de doble capa de trofoblasto y sugieren que el estrés oxidativo debido a la sobreexpresión de SOD-1 resulta en un aumento de la proliferación del trofoblasto y una diferenciación disminuida del mismo (129).

## 8. CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de ARNm relativos a 18S y de proteína de CBS en placentas con SD, sin embargo al normalizar con el gen housekeeping GAPDH no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión de ARNm del gen CBS. Cabe resaltar que este es el primer estudio a nivel mundial que mide los niveles de ARNm y de proteína de CBS en placentas embebidas en parafina con SD.

Los resultados del presente trabajo son consistentes con la teoría planteada por varios autores, que la sobreexpresión de CBS presente en la DSCR conlleva a una alteración del ciclo de la homocisteína-metionina y a un déficit del folato funcional y probablemente esta podría ser la causa del déficit de memoria y aprendizaje, discapacidad cognitiva y Alzheimer en individuos con SD.

En cuanto a los hallazgos histopatológicos en placentas se encontró presencia de bordes circinados e inclusiones de trofoblasto con diferencias estadísticamente significativas, lo cual es consistente con la literatura reportada y podrían sugerir un diagnóstico preliminar de alteración cromosómica.

Se comprobó la hipótesis planteada de que la triplicación de la enzima CBS presente en el sincitiotrofoblasto podría afectar la vía de la homocisteína-metionina, lo que podría llevar a una disminución del glutatión que junto con la sobreexpresión de SOD-1 conlleva a estrés oxidativo debido a una regulación deficiente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, causando posiblemente alteraciones histológicas a la placenta y estos cambios placentarios podrían estar involucrados en los hallazgos fenotípicos y patológicos en individuos con SD.

Se logro documentar sobreexpresión de CBS en placentas de individuos con SD y su posible asociación con algunos hallazgos histopatológicos encontrados en placentas, lo cual es importante debido a la escasa información de la fisiopatología de la trisomía 21.

## 9. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

Actualmente el diagnóstico genético prenatal de SD se basa en realizar citogenética convencional y FISH mediante la obtención de material genético por amniocentesis y biopsia de vellosidades coriónicas, las cuales son técnicas invasivas que ponen en riesgo la vida del feto y en muchos de los casos induce aborto (87,91). Con los resultados encontrados se podría postular la expresión de ARNm y de CBS como candidato a marcador temprano de SD que podría ser detectado en sangre, teniendo en cuenta que el ARN libre del feto circulante en el plasma de mujeres embarazadas puede detectarse desde la cuarta semana de gestación (90).

Realizar medición de la actividad enzimática de CBS en pacientes con SD para conocer su implicación sobre todos los metabolitos de la vía homocisteína – metionina.

El aumento de la expresión del ARNm y del nivel de proteína del gen CBS en placentas embebidas en parafina de fetos con SD junto con los hallazgos histopatológicos encontrados en el presente estudio pueden sugerir una aproximación diagnóstica de trisomía 21 en pacientes en los cuales no sea posible realizar análisis citogenético.

Aunque el presente estudio cuenta con un tamaño de muestra pequeño debido a la difícil consecución de placentas embebidas en parafina, los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos, lo cual genera nuevo conocimiento de la expresión de CBS en SD.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. **Patterson, D.** 2007. Genetic mechanisms involved in the phenotype of Down syndrome. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*. 13(3):199–206.
2. **Pogribna, M., Melnyk S., Pogribny I., Chango A., Yi P., James S.J.** 2001. Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation. *The American Journal of Human Genetics*, 69, 88-95.
3. **Vilardell, M., Rasche A., Thormann, A., Maschke-Dutz, E., Pérez-Jurado, L., Lehrach, H., Herwig R.** 2011. Meta-analysis of heterogeneous Down Syndrome data reveals consistent genome-wide dosage effects related to neurological processes. *BMC Genomics*. 12: 229.
4. **Montoya Villegas, J. C., Soto J., Satizabal, J. M., Sánchez, A., García F.** 2011. Genomic study of the critical region of chromosome 21 associated to Down Syndrome. *Colomb Med*; 42:26-38.
5. **Ge, Y., Jensen, TL., Matherly, LH., Taub JW.** 2003. Transcriptional regulation of the cystathionine-beta -synthase gene in Down syndrome and non-Down syndrome megakaryocytic leukemia cell lines. *Blood*;101(4):1551-7.
6. **Patterson, D.** 2008. Folate metabolism and the risk of Down syndrome. *Down Syndrome Research and Practice*, 12, 93-97.
7. **Cunningham, H.** 2006. *Obstetricia de Williams*. Mcgraw hill.

8. **Solanky, N., Requena, A., D'Souza, S., Sibley, C., Glazier, J.** 2010. Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta*, 31, 134-143.
9. **Zarante, I., Franco L., López C., Fernández N.** 2010. Frecuencia de malformaciones congénitas: evaluación y pronóstico de 52.744 nacimientos en tres ciudades colombianas. *Biomédica*, 30, 65-71.
10. **Nazer, J., Cifuentes, L.** 2011. Malformaciones congenitas en Chile y Latino America: una vision epidemiologica del ECLAMC del periodo 1995 – 2008. *Scielo*, 139: 72-78.
11. **Hayes, A., Batshaw, P.** 1993. Síndrome de Down. *Clin Ped North América*, 5: 555-569.
12. **Pueschel, SM.** 1981 A historical viewpoint: Down Syndrome growing and learning (Human potentials for children series). *Clinics*, 37-39.
13. **Lopez, P., Lopez, R., Pares, G., Borges, A,Valdespino, L.** 2000. Reseña historica del SD. *Edigraphic*, 5: 193-199
14. **Kwong KL, Wong V.** 1996. Neurodevelopmental profile of Down syndrome in Chinese children *J Pediatr Child Health*, 32: 153-157.
15. **Flórez J.** El tratamiento farmacológico del síndrome de Down. 1999. *Síndrome de Down*, 16: 49-51.
16. **Antonfarakis SE, Peterson MB, McInnis MG.** 1992. The meiotic stage of non disjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 5:1411-613.

17. **Brown AS, Feingold E, Broman KW, Sherman SL.** 2000. Genome-wide variation in recombination in female meiosis: a risk factor for non-disjunction of chromosome 21. *Hum Molec Genet*, 9:515-523.
18. **Antonarakis SE and the Down Syndrome Collaborative Group.** 1991. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med*, 324:872-6.
19. **Kaminker P, Armando R.** 2008. Síndrome de Down. Primera parte: enfoque clínico-genético. *Scielo*, 106: 40.
20. **Uchida JA, Freeman VCP.** 1985. Trisomy 21 Down syndrome. Parental mosaicism. *Hum Gent*, 70:246.
21. **Harris DJ, Begleiter ML, Chamberlín J.** 1982. Parental trisomy 21 mosaicism. *Am J Hum Genet*, 34:125.
22. **Josep M, Corretger et al.** 2005. Síndrome de Down. Aspectos médicos actuales. *Allergol Immunopathol*, 33:241.
23. **Cooley WC, Graham JM.** 1991 Down syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr*, 30:233-253.
24. **Pueschel SM.** 1990. Clinical aspects of Down syndrome from infancy to adulthood. *Am J Med Gen Supp*, 7:52-56.
25. **Tipster D.** 2011. Down Syndrome Trisomy 21 (Mongolism) – Causes, Karyotype, Symptoms, Antenatal Diagnosis. Genetic Disorders.
26. **Kumin L.** 1996. Speech and language skills in children with Down syndrome. *MRDD Research Reviews*; 2:109.

- 27. Lott IT, Dierssen M.** 2010. Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurol*, 9:623.
- 28. Chapman RS, Seung HK, Schwartz SE, Kay-Raining Bird E.** 1998. Language skills of children and adolescents with Down syndrome: II. Production deficits. *J Speech Lang Hear Res*, 41:861.
- 29. I, Doran E, Nguyen V, Tournay A, Head E, Gillen D.** 2012. Down Syndrome and Dementia: A Randomized, Controlled Trial of Antioxidant Supplementation. *Am J Med Genet A*, 155 (8): 1939–1948.
- 30. Zigman WB, Lott IT.** 2007. Review Alzheimer's disease in Down syndrome. *Neurobiology and Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 13(3):237-46.
- 31. Coppus A, Evenhuis H, Verberne GJ, Visser F, van Gool P, Eikelenboom P, van Duijn C.** 2006. Review Dementia and mortality in persons with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res*, 50:768-77.
- 32. Roizen NJ, Patterson D.** 2003. Down's syndrome. *Lancet*, 361:1281.
- 33. Myers BA, Pueschel SM.** 1991. Psychiatric disorders in persons with Down syndrome. *J Nerv Ment Dis*, 179:609.
- 34. Rasmussen P, Börjesson O, Wentz E, Gillberg C.** 2001. Autistic disorders in Down syndrome: background factors and clinical correlates. *Dev Med Child Neurol*, 43:750.
- 35. Freeman SB, Taft LF, Dooley KJ.** 1998. Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. *Am J Med Genet*, 80:213.
- 36. Irving CA, Chaudhari MP.** 2012. Cardiovascular abnormalities in Down's syndrome: spectrum, management and survival over 22 years. *Arch Dis Child*, 97:326.

- 37. Geggel RL, O'Brien JE, Feingold M.** 1993. Development of valve dysfunction in adolescents and young adults with Down syndrome and no known congenital heart disease. *J Pediatr*; 122:821.
- 38. Fabia J, Drolette M.** 1970. Malformations and leukemia in children with Down's syndrome. *Pediatrics*; 45:60.
- 39. Källén B, Mastroiacovo P, Robert E.** 1996. Major congenital malformations in Down syndrome. *Am J Med Genet*; 65:160-166.
- 40. Creavin AL, Brown RD.** 2009. Ophthalmic abnormalities in children with Down syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*; 46:76.
- 41. Pueschel SM, Rothman KJ, Ogilby JD.** 1976. Birth weight of children with Down's syndrome. *Am J Ment Defic*; 80:442.
- 42. Toledo C, Alembik Y, Aguirre Jaime A, Stoll C.** 1999. Growth curves of children with Down syndrome. *Ann Genet*; 42:81.
- 43. Ostermaier K.** 2013. Clinical features and diagnosis of Down syndrome. *Topic feedback*.
- 44. Bull MJ, Committee on Genetics.** 2011. Health supervision for children with Down syndrome. *Pediatrics*; 128:393.
- 45. Shott SR, Joseph A, Heithaus D.** 2001. Hearing loss in children with Down syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*; 61(3):199-205.
- 46. Anwar AJ, Walker JD, Frier BM.** 1998. Type 1 diabetes mellitus and Down's syndrome: prevalence, management and diabetic complications. *Diabet Med*; 15:160.

- 47. Lange B.** 2000. The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. *Br J Haematol*; 110:512.
- 48. Malinge S, Izraeli S, Crispino JD.** 2009. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*; 113:2619.
- 49. McDowell KM, Craven DI.** 2011. Pulmonary complications of Down syndrome during childhood. *J Pediatr*; 158:319.
- 50. Barankin B, Guenther L.** 2001. Dermatological manifestations of Down's syndrome. *J Cutan Med Surg*; 5:289.
- 51. Mercer ES, Broecker B, Smith EA.** 2004. Urological manifestations of Down syndrome. *J Urol*; 171:1250.
- 52. Pueschel SM, Scola FH.** 1987. Atlantoaxial instability in individuals with Down syndrome: epidemiologic, radiographic, and clinical studies. *Pediatrics*; 80:555.
- 53. Ram G, Chinen J.** 2011. Infections and immunodeficiency in Down syndrome. *Clin Exp Immunol*; 164(1): 9–16.
- 54. Ghosh S, Feingold E, Dey S.** 2009. Etiology of Down Syndrome: Evidence for Consistent Association among Altered Meiotic Recombination, Nondisjunction and Maternal Age Across Populations. *Am J Med Genet A*, 149A (7): 1415–1420.
- 55. Wolstenholme J, Angell RR.** 2000. Maternal age and trisomy--a unifying mechanism of formation. *Chromosoma*; 109(7):435-8.
- 56. Cheung VG, Burdick JT, Hirschmann D, Morley M.** 2007. Polymorphic variation in human meiotic recombination. *Am J Hum Gene*; 80(3):526-30.

- 57. Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL.** 1996. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nat Genet*, 14(4):400-5.
- 58. Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB.** 2007. Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res*; 13(3):221-7.
- 59. Michel E, Weijerma A, Furth M, Noordegraaf A, Jacobus P, Chantal J, Reinoud J.** 2008. Prevalencia, características neonatales y mortalidad durante el primer año del síndrome de Down: Un estudio nacional. *J. Pediatrics*, 152: 15-19.
- 60. Johnson Z, Lillis D, Delany V, Hayes C, Dack P.** 1996. The epidemiology of Down syndrome in four counties in Ireland 1981 -1990. *Journal of Public Health Medicine*, 18 (1): 78-86.
- 61. Bermejo E, Cuevas L, Grupo Periférico del ECEMC, Martínez-Frías, L.** 2010. Informe de vigilancia epidemiológica de anomalías congénitas en España: Datos registrados por el ECEMC en el período 1980-2009.
- 62. Vilarroig M.** 2012. The silent disappearance: report of screening eugenics of people with Down syndrome. *Cuad Bioet*, (77):111-21.
- 63. Michel SD.** 2008. Prevalencia, características neonatales y mortalidad en primeros años de vida del SD. *J Pediatrics*, 152: 15-19.
- 64. Mikyong S, Besser L, Kucik, Lu C, Siffel C, Correa, A, the Congenital Anomaly Multistate Prevalence and Survival (CAMPS) Collaborative.** 2009. Prevalence of Down Syndrome Among Children and Adolescents in 10 Regions of the United States. *Pediatrics* 124:6;1565-1571.

- 65. Zarante A, Gracia G, Zarante I.** 2012. Evaluación de factores de riesgo asociados con malformaciones congénitas en el programa de vigilancia epidemiológica de malformaciones congénitas (ECLAMC) en Bogotá entre 2001 y 2010. *Universitas Medica*, 53 (1): 11-25.
- 66. Hattori M, Fujiyama A, Taylor T.D., Watanabe H, Yada T, Park H, Toyoda A, Ishii A, Totoki Y, Choi D, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schillhabel M, Schudy A, Zimmermann Rosenthal A, Kudo J, Shibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine A, Mitsuyama S, Antonarakis SE, Minoshima S, Shimizu N, Nordsiek G, Hornischer K, Brandt P, Scharfe M, Schön O, Desario A, Reichelt J, Kauer G, Blöcker H, Ramser J, Beck A, Klages S, Hennig S, Riesselmann L, Dagand E, Haaf T, Wehrmeyer S, Borzym K, Gardiner K, Nizetic D, Francis F, Lehrach H, Reinhardt R, Yaspo M.** 2000. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405, 311-319.
- 67. Gardiner K, Davisson M.** 2000. The sequence of human chromosome 21 and implications for research into Down syndrome. *Genome Biol*, 1(2): 2.1 -2.9.
- 68. Sommer CA, Henrique Silva, F.** 2008. Trisomy 21 and Down syndrome - A short review. *Braz. J. Biol.*, 68(2): 447-452.
- 69. Pogribna, M., Melnyk, S., Pogribny, I., Chango, A., Yi, P., Jill James S.** 2001. Homocysteine Metabolism in Children with Down Syndrome: In Vitro Modulation. *Am. J. Hum. Genet.* 69:88–95.
- 70. Lana-Elola, E., Watson-Scales, S., Fisher, E., Tybulewicz V.** 2011. Down syndrome: searching for the genetic culprits. *Dis Model Mech*, 4(5): 586–595.

- 71. Kahlem P.** 2006. Gene-Dosage Effect on Chromosome 21 Transcriptome in Trisomy 21: Implication in Down syndrome Cognitive Disorders. *Behavior Genetics*, 36: 3.
- 72. Gardiner K, Fortna A, Bechtel L, Davisson MT.** 2003. Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene*, 318():137-47.
- 73. Kaminker, P., Armando, R.** 2008. Síndrome de Down. Segunda parte: estudios genéticos y función del pediatra. *Arch Argent Pediatr*, 106(4):334-340.
- 74. Locke, A., Dooley, K., Tinker, S., Cheong, S., Feingold, E., Allen, E., Freeman, S., Torfs, C., Cua, C., Epstein, M., Wu, M., Lin, X., Capone, G., Sherman, S., Bean, L.** 2010. Variation in Folate Pathway Genes Contributes to Risk of Congenital Heart Defects Among Individuals With Down Syndrome. *Genet Epidemiol*, 34(6): 613–623.
- 75. Korbil, JO., Tirosh, T., Urban, AE., Chen, XN., Kasowski, M., Dai, L., Gao, MC., Lange, K., Sobel, EM., Barlow, GM., Aylsworth, AS., Carpenter, NJ., Clark, RD., Cohen, MY., Doran, E., Falik-Zaccai, T., Lewin, SO., Lott, IT., McGillivray, BC., Moeschler, JB., Pettenati, MJ., Pueschel, SM., Rao, KW., Shaffer, LG., Shohat, M., Van Riper, AJ., Warburton, D., Weissman, S., Gerstein, MB., Snyder, M., Korenberg, JR.** 2009. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(29):12031-6.
- 76. Perluigi, M., Butterfield, D.** 2012. Oxidative Stress and Down Syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, 10.

- 77. Blom, H., Smulders, Y.** 2011. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab*; 34(1): 75–81.
- 78. Monograph.** 2005. Folic acid. *Alternative Medicine Review* ; 10: 222-29.
- 79. Sen, U., Mishra, P., Tyagi, N., Tyagi, S.** 2010. Homocysteine to Hydrogen Sulfide or Hypertension. *Cell Biochem Biophys*; 57(2-3): 49–58.
- 80. Kian, B., Zabaleta, A., Romero, E.** 2002. Valores referenciales de homocisteína plasmática en adultos aparentemente sanos de Lima – Peru. *Diagnóstico*, 41(1).
- 81. Jhee, KH., Kruger, WD.** 2005. The role of cystathionine beta-synthase in homocysteine metabolism. *Antioxid Redox Signal*; 7(5-6):813-22.
- 82. V., Billard, J., Gupta, S., Potier, B., Woerner, S., Paly, E., Ledru, A., David, S., Luilier, S., Bizot, J., Vacano, G., Kraus, J., Patterson, D., Kruger, W., Delabar, J., London, J.** 2012. Brain Phenotype of Transgenic Mice Overexpressing Cystathionine  $\beta$ -Synthase. *PLoS One*; 7(1): e29056.
- 83. Ichinohe, A., T. Kanaumi, S. Takashima, Y. Enokido, Y. Nagai & H. Kimura.** 2005. Cystathionine [beta]-synthase is enriched in the brains of Down's patients. *Biochemical and biophysical research communications*, 338, 1547-1550.
- 84. Kamoun, P.** 2001. Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Medical Hypotheses*; 57(3): 389–392.
- 85. Aller, J., Pages, G.** 2012. *Obstetricia moderna. Mc Graw Hill.*
- 86. Zitnanova, I., Korytár, P., Aruoma, O., Sustrová, M., Garaiová, I., Muchová, J., Kalnovicová, T., Pueschel, S., Duracková, Z.** 2004. Uric acid and allantoin

levels in Down syndrome: antioxidant and oxidative stress mechanisms?. *Clinica Chimica Acta*; 341(2): 139–146.

**87.Dey, M., Sharma, S., Aggarwal, S.** 2013. Prenatal Screening Methods for Aneuploidies. *N Am J Med Sci*.; 5(3): 182–190.

**88.Driscoll, D., Gross, S.** 2008. First trimester diagnosis and screening for fetal aneuploidy. *Genet Med*.; 10(1): 73–75.

**89.Chiu, R., Chan, K., Gao, Y., Lau, V., Zheng, W., Leung, TY.** 2008 Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105:20458-63.

**90.Fan, HC., Blumenfeld, YJ., Chitkara, U., Hudgins, L., Quake, SR.** 2008. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*;105:16266.

**91.Dudarewicz, L., Holzgreve, W., Jeziorowska, A., Jakubowski, L.** 2005. Molecular methods for rapid detection of aneuploidy. *J Appl Genet*; 46(2):207-215.

**92.Kate, L.** 2012. Genetic risk. *J Community Genet*.; 3(3): 159–166.

**93.Hubner, M., Ramirez, R., Nazer, J.** 2005. *Malformaciones congenitas Diagnóstico y manejo neonatal. Universitaria.*

**94.Cabero, L., Saldivar, D., Cabrillo, E.** 2007. *Obstetricia y medicina materno-fetal. Medica Panamericana.*

**95.Alonso, T., Casilda, M.** 2005. La placenta. *Ciencias.*

**96.Gonzalez, J., Laila, J.M., Fabre, E., Gonzalez, E.** 2006. *Obstetricia. Masson.*

- 97. Lager, S., Powell, T.** 2012. Regulation of Nutrient Transport across the Placenta. *J Pregnancy*.
- 98. Gratacos, E., Gomez, R., Nicolaidis, K., Romero, R., Cabero, L.** 2007. *Medicina fetal. Medica Panamericana*.
- 99. Kraus F, R. R., Gersell D, Nelson M, Dicke J.** 2004. Abortion, Stillbirth, and Intrauterine Fetal Death. *Placental Pathology*, 207-228.
- 100. Lunghi, L., Ferretti, M., Medici, S., Biondi, C., Vesce, F.** 2007. Control of human trophoblast function. *Biol. Reprod Endocrinol.* 5: 6.
- 101. Stocker JT, D. L.** 2001. *Pediatric Pathology*. Lippincott Williams and Wilkins.
- 102. Malassiné, A., Frenzo, J. L., Evain-Brion, D.** 2010. Trisomy 21-affected placentas highlight prerequisite factors for human trophoblast fusion and differentiation. *Int. J. Dev. Biol*, 54, 475-482.
- 103. Predanic, M., Perni, S. C., Chasen, S. T., Baergen, R. N., Chervenak, F. A.** 2005. Ultrasound evaluation of abnormal umbilical cord coiling in second trimester of gestation in association with adverse pregnancy outcome. *American journal of obstetrics and gynecology*, 193, 387-394.
- 104. De Laat, M. W. M., Van Alderen, E. D., Franx, A., Visser, G. H. A., Bot, M. L., Nikkels, P. G. J.** 2007. The umbilical coiling index in complicated pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 130, 66-72.
- 105. Kaplan, C.** 2007. *Color Atlas of Gross Placental Pathology*. New York: Springer.

- 106. Sankaran, S., Kyle, P. M.** 2009. Aetiology and pathogenesis of IUGR. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 23, 765-777.
- 107. Mu, S. C., Lin, C. H., Chen, Y. L., Sung, T. C., Bai, C. H., Jow, G. M.** 2008. The perinatal outcomes of asymptomatic isolated Una umbilical artery in full-term neonates. *Pediatr Neonatol*, 49, 230-3.
- 108. McDonald, D. G. M., Kelehan, P., McMenamin, J. B., Gorman, W. A., Madden, D., Tobbia, I. N., Mooney, E. E.** 2004. Placental fetal thrombotic vasculopathy is associated with neonatal encephalopathy\* 1. *Human pathology*, 35, 875-880.
- 109. Roberts, D. J.** 2008. Placental pathology, a survival guide. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 132, 641-651
- 110. Boyd TK, R. R.** 2007. Pathology of the placenta. In *Potter's pathology of the fetus, infant and child*, 645-694. Mosby Elsevier.
- 111. Olaya, M., Zarante, A.** 2012. Trisomia 13 y sus alteraciones placentarias. Reporte de caso. *Univ, Med*, 53(4): 443-451.
- 112. Wong, M., Medrano, J.** 2005. Real- time PCR for ARNm quantitation. *BioTechniques*, 39:75-85.
- 113. Weijerman ME, de Winter JP.** 2010. Clinical practice. The care of children with Down syndrome. *Eur J Pediatr.*, 169(12):1445-52.
- 114. Lagman, S.** 2007. Embriologia medica: con orientacion clinica. *Panamericana*.
- 115. Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., Mathieu, C.** 1999. Quantification of murine cytokine ARNms using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine*, 11(4):305.

116. **Chadefaux, B., Rethore, M., Raoul, O., Ceballos, I., Poissonnier, M., Gilgenkranz, S., Allard, D.**1985.Cystathionine beta synthase: gene dosage effect in trisomy 21. *Biochem Biophys Res Commun*, 128:40–44.
117. **Shin, JH., Weitzdoerfer, R., Fountoulakis, M., Lubec, G.** 2004. Expression of cystathionine beta-synthase, pyridoxal kinase, and ES1 protein homolog (mitochondrial precursor) in fetal Down syndrome brain. *Neurochem Int.*, 45(1):73-9.
118. **Meller, M., Vadachkoria, S., Luthy, A., Williams, A.** 2005. Evaluation of Housekeeping Genes in Placental Comparative Expression Studies. *Placenta*, 26, 601- 607
119. **Patel, P., Boyd, C., Johnston, D., Williamson C.** 2002. Analysis of GAPDH as a standard for gene expression quantification in human placenta. *Placenta*, 23, 697–698.
120. **Murthi, P., E. Fitzpatrick, E., Borg, A., Donath, S., Brennecke, S., Kalionis, B.** 2008. *GAPDH, 18S rRNA* and *YWHAZ* are Suitable Endogenous Reference Genes for Relative Gene Expression Studies in Placental Tissues from Human Idiopathic Fetal Growth. *Placenta*, 29 (9): 798 -801.
121. **Bourgeron, T. , P Rustin, P., Chrétien, D. , Abedul, M. , Burguesa, M., Viegas, E., Munnich, A., Rötig, A.** La mutación de un succinato deshidrogenasa nucleares gen da lugar a la deficiencia de la cadena respiratoria mitocondrial. *Nat Genet*; 11(2): 144-9.
122. **Schneider, SA. , Bhatia, KP.** 2011. Huntington disease's look-alikes. *Handb Clin Neurol.*, 100:101-12.

- 123. Fountoulakis, M., Cairns, N., Lubec, G.** 1999. Increased levels of 14-3-3 gamma and epsilon proteins in brain of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Neural Transm Suppl.*, 57:323-35.
- 124. Taub, JW., Huang, X., Matherly, LH., Stout, ML., Buck, SA., Massey, GV., Becton, DL., Chang, MN., Weinstein, HJ., Ravindranath, Y.** 1999. Expression of chromosome 21-localized genes in acute myeloid leukemia: differences between Down syndrome and non-Down syndrome blast cells and relationship to in vitro sensitivity to cytosine arabinoside and daunorubicin. *Blood.*, 15;94(4):1393-400.
- 125. Alfredo Ovalle, A., Kakarieka, E., Correa, A., Vial, M., Aspillaga, C.** 2005. Estudio anatomo – clínico de las causas de muerte fetal. *Rev Chil Obstet Ginecol*; 70(5): 303 – 312.
- 126. Oudejans, C. B. M., A. T. J. J. Go, et al.** 2003. "Detection of Chromosome 21-encoded mRNA of Placental Origin in Maternal Plasma." *Clinical Chemistry* 49(9): 1445-1449.
- 127. Arenas, M., Vega, R.** 2013. Housekeeping gene expression stability in reproductive tissues after mitogen stimulation. *BMC Res Notes*, 6:285.
- 128. Yamamoto, J., Sato, W., Kosugi, T., Yamamoto, T., Kimura, T., Taniguchi, S., Kojima, H., Maruyama, S., Imai, E., Matsuo, S., Yuzawa, Y., Niki, I.** 2013. Distribution of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-producing enzymes and the roles of the H<sub>2</sub>S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 32–40.
- 129. Banerjee, S., Smallwood, A., Nargund, G., Campbell, S.** 2002. Placental morphogenesis in pregnancies with Down's syndrome might provide a clue to pre-eclampsia. *Placenta*, 172–174.

## **ANEXO No 1**

### **EXTRACCION DE RNA A PARTIR DE TEJIDO EMBEBIDO EN PARAFINA**

#### **Desparafinación**

1. A dos cortes de tejido de 10 um de tamaño de un bloque de tejido embebido en parafina adicionar 300 ul de xilol a los cortes, mezclar suavemente por inversión durante 5 minutos.
2. Colocar en una plataforma shaker a 37°C por 5 minutos y posteriormente centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos y descartar el sobrenadante con pipeta. Repetir estos pasos dos veces más.
3. Luego adicionar 300 ul de etanol 100% al precipitado y posteriormente colocar las muestras en una plataforma shaker a 37°C por 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos y descartar el sobrenadante. Repetir estos pasos 2 veces más.
4. Por último dejar secar el exceso de etanol por una hora a temperatura ambiente.

#### **Extracción**

1. Posterior al secado de las muestras, agregar 500 ul de lisis celular y 16 ul de proteinasa K (25 mg/ml) y macerar vigorosamente con un agitador de vidrio y luego incubar de 55-65°C por 48 horas.
2. Añadir 1 ml de trizol (Invitrogen) a la muestra e inmediatamente realizar vortex e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Luego adicionar 200 ul de cloroformo, realizar vortex e incubar por 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12000 g por 15 minutos a 4°C.

4. Pasar la fase acuosa a otro tubo y adicionar 500 ul de isopropanol, mezclar e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12000 g por 10 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante.
5. Al precipitado agregar 500 ul de etanol al 70%, mezclar y centrifugar a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado por 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Resuspender el pellet en 30 ul de buffer TE e incubar a 56°C por 10 minutos.
7. Almacenar el RNA a -20°C.

## ANEXO No 2

### PROTOCOLO PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CURVA ESTANDAR Y LAS MUESTRAS DE LOS GENES CBS, 18S Y GAPDH

#### - Protocolo PCR en tiempo real CBS

Condiciones	1X
Agua	0.3 MI
Primer Forward (5 $\mu$ M)	2.0 MI
Primer Reverse (5 $\mu$ M)	2.0 MI
Sonda (2 $\mu$ M)	1.0 MI
Activador	1.3 MI
Master Mix	7.4 MI
Enhancer	1.0 MI
RNA	5 MI
Volumen Final	20 MI

#### - Protocolo PCR en tiempo real 18S

Condiciones	1X
Agua	0.3 $\mu$ L
Primer Forward (5 $\mu$ M)	2.0 $\mu$ L
Primer Reverse (5 $\mu$ M)	2.0 $\mu$ L
Sonda (2 $\mu$ M)	1.0 MI
Activador	1.3 MI
Master Mix	7.4 MI
Enhancer	1.0 $\mu$ L
RNA	5 MI
Volumen Final	20 MI

- **Protocolo PCR en tiempo real GAPDH**

<b>Condiciones</b>	<b>1X</b>
Agua	0.3 $\mu$ L
Primer Forward (5 $\mu$ M)	2.0 $\mu$ L
Primer Reverse (5 $\mu$ M)	2.0 $\mu$ L
Sonda (2 $\mu$ M)	1.0 MI
Activador	1.3 MI
Master Mix	7.4 MI
Enhancer	1.0 $\mu$ L
RNA	5 MI
Volumen Final	20 MI

### ANEXO No 3

## PROTOCOLO PCR CONVENCIONAL PARA AMPLIFICAR Y REAMPLIFICAR CBS, 18S Y GAPDH

### - Protocolo de Amplificación CBS

Condiciones Master mix	1X
Buffer	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5 µL
dNTPs (2 mM)	0.5 µL
Primer Forward (5 µM)	1.0 µL
Primer Reverse (5 µM)	1.0 µL
Taq polimerasa 5U/ µL	0.25 µL
Agua	16.25µL
DNA	2.0 µL
Volumen final	25 µL
Fragmento esperado	107 pb

Programa termociclador	Temperatura°C	Tiempo
Denaturación inicial	95	5 min
Numero de ciclos	35 ciclos	
Denaturación	95	30 seg
Anillamiento	58	30 seg
Elongacion	72	30 seg
Elongacion final	72	5 min

Condiciones electroforesis	
Gel	Agarosa 1%
Producto PCR	5 µL
Voltaje / Tiempo	150 V/ 30 min

- **Protocolo de Amplificación 18S**

<b>Condiciones Master mix</b>	<b>1X</b>
Buffer	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5 µL
dNTPs (2 mM)	0.5 µL
Primer Forward (5 µM)	1.0 µL
Primer Reverse (5 µM)	1.0 µL
Taq polimerasa 5U/ MI	0.25 µL
Agua	16.25µL
DNA	2.0 µL
Volumen final	25 µL
Fragmento esperado	145 pb

<b>Programa termociclador</b>	<b>Temperatura°C</b>	<b>Tiempo</b>
Denaturación inicial	95	5 min
Numero de ciclos	35 ciclos	
Denaturación	95	30 seg
Anillamiento	65	30 seg
Elongacion	72	30 seg
Elongacion final	72	7 min

<b>Condiciones electroforesis</b>	
Gel	Agarosa 1%
Producto PCR	5 µL
Voltaje / Tiempo	150 V/ 30 min

- **Protocolo de Amplificación GAPDH**

<b>Condiciones Master mix</b>	<b>1X</b>
Buffer	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5 µL
dNTPs (2 mM)	0.5 µL
Primer Forward (5 µM)	1.0 µL
Primer Reverse (5 µM)	1.0 µL
Taq polimerasa 5U/ MI	0.25 µL
Agua	16.25µL
DNA	2.0 µL
Volumen final	25 µL
Fragmento esperado	118 pb

<b>Programa termociclador</b>	<b>Temperatura°C</b>	<b>Tiempo</b>
Denaturación inicial	95	5 min
Numero de ciclos	35 ciclos	
Denaturación	95	30 seg
Anillamiento	58	30 seg
Elongacion	72	30 seg
Elongacion final	72	5 min

<b>Condiciones electroforesis</b>	
Gel	Agarosa 1%
Producto PCR	5 µL
Voltaje / Tiempo	150 V/ 30 min

## ANEXO No 4

### PROTOCOLO DE PURIFICACION CON EL KIT Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System DE LOS REAMPLIFICADOS DE CBS, 18S Y GAPDH

1. Colocar a una minicolumna SV un tubo de recogida (columna) para cada producto de amplificación por PCR.
2. Añadir a la minicolumna SV volúmenes iguales de solución de membrana de unión y de producto de Amplificación de PCR e incube durante 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Centrifugar el montaje de la minicolumna SV en una microcentrífuga a 16.000 xg (14000 rpm) durante 1 minuto. Retire la minicolumna SV del tubo de recogida y deseche el líquido. Colocar nuevamente el tubo a la minicolumna SV.
4. Lavar la columna añadiendo 700µl de solución de lavado de membrana, previamente diluido con 95% de etanol y centrifugar durante 1 minuto a 16.000xg (14000 rpm). Retire la minicolumna SV y vacíe el tubo de recogida y colocar nuevamente la minicolumna SV de nuevo en el tubo de recogida. Repita el lavado con 500µl de Solución de lavado de membrana y centrifugar el montaje de la minicolumna SV minicolumna a 16.000xg por 5 minutos.
5. Retire la columna de la centrífuga y vacíe la colección del tubo y centrifugar el conjunto de la columna durante 1 minuto con el microcentrífuga tapa abierta para permitir la evaporación de todo el etanol residual.
6. Transferir cuidadosamente la minicolumna SV a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml. Aplicar 50 µL de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna sin tocar la membrana con la punta de la pipeta.

Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Luego centrifugar durante 1 minuto a 16.000 xg (14.000 rpm).

7. Deseche la minicolumna SV y guarde el tubo de microcentrífuga que contiene el ADN eluido a 4 °C o -20 °C.

## **ANEXO No 5**

### **PROTOCOLO INMUNOHISTOQUIMICA PARA CBS EN PLACENTAS EMBEBIDAS EN PARAFINA UTILIZANDO EL KIT ImmunoCruz™ mouse ABC Staining System: sc-2017**

Realizar un corte de 2 a 3 micras del tejido embebido en parafina y montarlo en una lamina cargada con iones para evitar que el tejido se desprenda durante todo el procesamiento.

#### **Desparafinacion**

1. Colocar las laminas de los tejidos embebidos en parafina en el horno a 100°C por 30 minutos.
2. Sacar las laminas del horno y realizar 3 baños de xilol, cada uno de 3 minutos.
3. Luego pasar las laminas por 3 baños de alcohol al 96%, cada uno de 3 minutos.
4. Lavar las laminas con agua de chorro y dejarlas en una cubeta con agua destilada hasta empezar el procesamiento.

#### **Desenmascaramiento o recuperación del anticuerpo**

1. Precalentar 200 ml de citrato de sodio en un recipiente plastico durante 10 a 20 minutos en una vaporela a 96°C, posteriormente sumergir las laminas en el citrato de sodio y dejarlas 40 minutos en la vaporela a 96°C.
2. Completado este tiempo, sacar el recipiente plastico que contiene las laminas y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
3. Luego lavar las laminas con agua destilada.

#### **Eliminación de la peroxidasa endogena**

1. Colocar las laminas en un recipiente plastico con 100 ml de peroxido hidrogeno al 3% por 10 minutos.

2. Transcurrido este tiempo, lavar las laminas con agua destilada de 3 a 4 inmersiones
3. Lavar con PBS dos veces durante 5 minutos cada uno.
4. Secar alrededor del tejido el exceso de PBS y realizar un circulo alrededor del tejido con el marcador hidrofobico (Novopec).
5. Para bloquear aun mas la peroxidasa endogena, colocar sobre el tejido 100 ul de power blocking durante 10 minutos.
6. Lavar el tejido con PBS y escurirlo.

### **Inmunohistoquimica**

Es importante tener en cuenta que todos los pasos de la inmunohistoquimica se llevan a cabo a temperatura ambiente en una cámara húmeda y se debe evitar el secado de las muestras entre los pasos.

1. Agregar 100 ul del anticuerpo CBS (15X) en una dilucion 1:50 al tejido, e incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente. Lavar con tres cambios de PBS cada uno durante 5 minutos.
2. Adicionar 100 ul de anticuerpo secundario biotinilado (enhancer) al tejido, e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar con tres cambios de PBS cada uno durante 5 minutos.
3. Colocar 100 ul de polimero (reactivo enzimatico avidina- biotina) al tejido, e incubar durante 30 minutos. Lavar con tres cambios de PBS cada uno durante 5 minutos.
4. Incubar los tejidos con 1 a 3 gotas de cromogeno (Diaminobenzidina) durante 30 segundos a 10 minutos o hasta que se revele la intensidad de color deseada. Lavar con agua desionizada durante 5 minutos.

## **Contraste**

1. Colocar las laminas en una canastilla para tinciones especiales y sumergirlas en hematoxilina de Harris durante 10 segundos. Lavar con agua corriente
2. Realizar tres inmersiones en agua moniacal. Lavar con agua corriente.
3. Deshidratar: Sumergir las laminas en tres alcoholes de la siguiente manera,  
1. Etanol al 95% por 10 segundos, 2. Etanol al 95% por 10 segundos y 3. Etanol al 100% durante 10 segundos.
4. Aclarar: Realizar tres inmersiones de las laminas por xilol durante 10 segundos cada una. Limpiar el exceso de xilol.
5. Añadir de 1 a 2 gotas de citoresina y cubrir con un cubreobjetos de vidrio. Observar al microscopio óptico.

## ANEXO No 6

### FORMATO UTILIZADO PARA LECTURA DE LOS HALLAZGOS HISTOPATOLOGICOS EN PLACENTAS EMBEBIDAS EN PARAFINA

Tabla de lectura vellosidades coriales Proyecto Down																				
Caso	Edad G	Tamaño de la vellosidades			Bordes vellositarios		Sincitotrofoblasto		Citotrofoblasto		Cisternas		Inclusiones de trofoblasto		Trofoblasto extraveloso multinucleado		Circulación fetal		Circulación materna	
		Normales	Grandes	Pequeñas	Normales	Circinados	Normal	Proliferado	Normal	Excesivo	Ausentes	Presentes	Ausentes	Presentes	Ausente	Presente	Permeable	Obstrucción	Vena-like	ArtDec
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				