



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
CAMPO DEL CONOCIMIENTO: INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN
SALUD
CAMPO DISCIPLINARIO: BIOQUÍMICA CLÍNICA

**ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACIÓN EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE
IL24 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

PRESENTA:

IBT. JUAN CARLOS MEZA ALVARADO

TUTOR PRINCIPAL

DR. JOSÉ MANUEL RODRÍGUEZ PÉREZ.

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

COMITÉ TUTOR

DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ. INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

DRA. MARTHA ESTELA PÉREZ RODRÍGUEZ. CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tabla de contenido

Índice de Figuras	4
Índice de Tablas	4
Tabla de abreviaturas.....	5
Resumen	9
Abstract.....	9
1. Introducción.....	10
1.1 Epidemiología de la enfermedad cardiovascular	10
1.2 Enfermedad arterial coronaria	11
1.3 Organización del ADN.....	14
1.4 Epigenética	17
1.5 Metilación en genes inflamatorios asociados a aterosclerosis	22
1.6 Interleucina 24	25
1.7 Interleucina 24 en contexto cardiovascular	28
2. Justificación	31
3. Hipótesis	31
4. Objetivos	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivo específico	32
5. Metodología	32
5.1 Población.....	32
5.2 Tamaño de muestra	33
5.3 Mediciones antropométricas.....	34
5.4 Análisis de laboratorio y definición de factores de riesgo cardiovascular.....	35

6. Estrategia Experimental.....	36
6.1 Extracción de ADN	36
6.2 Cuantificación de ADN.....	37
6.3 Modificación del ADN con bisulfito sódico.....	37
6.4 Amplificación de la región promotora por MSP	38
6.5 Electroforesis	40
6.6 Análisis Estadístico	41
7. Resultados	42
7.1 Ubicación de isla CpG	42
7.2 Datos clínico demográficos	43
7.3 Estados de metilación	46
7.4 Asociación con factores de riesgo en grupo con AS	48
8. Discusión	50
9. Conclusión.....	60
10. Bibliografía.....	61
11. Anexos	74
11.1 Región analizada.....	74
11.2 Geles representativos del grupo con EAC.....	79
11.3 Geles representativos del grupo con AS	81
11.4 Geles representativos del grupo control	83

Índice de Figuras

Figura 1: Eventos clave en el desarrollo de EAC	14
Figura 2: Compactación del ADN	16
Figura 3: Tipos de modificación epigenética en el humano.....	20
Figura 4: Mecanismos involucrados en EAC	21
Figura 5: Estructura tridimensional de IL-24 y su receptor heterodimérico.....	26
Figura 6: Características principales de los grupos de estudio	33
Figura 7: Análisis de región promotora del gen de <i>IL24</i> con el software MethPrimer	42
Figura 8: Gel representativo del grupo AS.	46

Índice de Tablas

Tabla 1: Causas de mortalidad en México	11
Tabla 2: Estudios de metilación en genes inflamatorios asociados a procesos ateroscleróticos.....	23
Tabla 3: Contexto biológico de IL-24	28
Tabla 4: Primers de IL-24.....	39
Tabla 5: Condiciones de ciclaje de MSP	40
Tabla 6: Características demográficas de la población estudiada	43
Tabla 7: Comparación de parámetros bioquímicos en la población de estudio .	44
Tabla 8: Comparación de frecuencias de metilación entre grupos de estudio	47
Tabla 9: Comparación de características demográficas en grupo AS	48
Tabla 10: Comparación de parámetros bioquímicos en grupo AS	49

Tabla de abreviaturas

ABCG1:	cassette de unión a ATP subfamilia G miembro 1
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AGTRAP:	receptor de angiotensinógeno
ANOVA:	análisis de varianza
ApoA:	apolipoproteína A
ApoB:	apolipoproteína B
AS:	aterosclerosis subclínica
BMP-2:	proteína morfogénica ósea-2
BS:	secuenciación por bisulfito
CAC:	Calcio Arterial Coronario
CCL5:	quimiocina de ligando 5 con motivo C-C
CCR5:	quimiocina receptora 5 con motivo C-C
CDC:	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
CE:	Células endoteliales
CEBPA:	proteína alfa potenciadora de unión a CCAAT
CHD:	enfermedad de corazón coronario
COBRA:	Análisis combinado de restricción con bisulfito
CpG:	citosina-fosfato-guanina
CRP:	proteína C reactiva
CX3CL1:	quimiocina ligando 1 con motivo C-X3-X
CXCL10:	quimiocina 10 con motivo C-X-C
DNMT:	ADN metiltransferasas
EAC:	Enfermedad Arterial Coronaria
EC-SOD:	Superóxido dismutasa extracelular
ECV:	Enfermedades Cardiovasculares
EGF:	factor de crecimiento epidérmico

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ER- α : Receptor de estrógeno alfa

ER- β : Receptor de estrógeno beta

FOXP3: factor de transcripción caja forkhead P3

FVII: factor de coagulación VII

GALNT2: polipéptido N acetilgalactosaminiltransferasa 2

GATA3: factor de transcripción de unión a GATA 3 (GATA3).

GEA: Genoma de la Enfermedad Aterosclerosa

GGT: gamma glutamil transpeptidasa

HDAC: Histona desacetilasa

HMGCR: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa

HOXA9: Proteína homeobox A9

HRM: High Resolution Melting

ICAM1: molécula de adhesión intercelular 1

iCpG: isla citosina-fosfato-guanina

IFN- β : interferón beta

IFN- γ : Interferón gamma

IL-1: interleucina 1

IL-10: interleucina 10

IL-12: interleucina 12

IL-19: interleucina 19

IL-22: interleucina 22

IL-24: interleucina 24

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IMC: índice de masa corporal

INCICH: Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

INS: insulina

LDL: lipoproteínas de baja densidad

LPS: lipopolisacáridos

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

MDA-7: melanoma asociado a la diferenciación celular 7

MEF2A: factor potenciador específico de miocito 2A

MI: infarto al miocardio

MITF: factor de transcripción asociado con microftalmia

MMP: metaloproteínasa de matriz

MOVAS: células de músculo liso aórtico vascular de ratón

MS: espectrometría de masas

MSP: PCR específica de metilación

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

NHLBI: Instituto Nacional de Corazón, Pulmón y Sangre

NR1F1: receptor nuclear de la subfamilia 1, grupo F, miembro 1

NR2F2 receptor nuclear de la subfamilia 2, grupo F, miembro 2

OMS: Organización Mundial de la Salud

Ox-LDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PKC: proteína quinasa C

RBL2: proteína del retinoblastoma tipo 2

ROS: especies reactivas de oxígeno

SAH: S-adenosil homocisteína

SAM: S-adenosil metionina

SICA: síndrome coronario agudo

SMARCA4: regulador dependiente de actina asociado a matriz, relacionado con SWI/SNF, miembro 4, subfamilia A

SMC: células de músculo liso

STAT: transductor de señales y activadores de transcripción

TG: triglicéridos

Th1: linfocitos T colaboradores 1

Th2: linfocitos T colaboradores 2

TLR: receptores tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TSS: sitio de inicio de la transcripción

VLDL lipoproteínas de muy baja densidad

vSMCs: células de músculo liso vasculares

β -GP: β -glicerofosfato

Resumen

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es un desorden multifactorial y poligénico que surge a raíz de una respuesta inflamatoria excesiva y desencadena alteraciones en el metabolismo de lípidos. El objetivo del presente estudio es determinar si existen diferencias en torno al patrón de metilación en una isla CpG (iCpG) dentro de la región promotora del gen de interleucina 24 (*IL24*) empleando tres grupos de estudio: pacientes con EAC, individuos con aterosclerosis subclínica (AS) y controles. Para ello se empleó la técnica de PCR específica de metilación (MSP) en conjunto con muestras de sangre periférica. El grupo con EAC y el grupo AS presentan niveles de variables bioquímicas que concuerdan con la literatura reportada referente a ambas entidades clínicas. Se observó una diferencia significativa entre las frecuencias de metilación del grupo con EAC y el grupo con AS ($P < 0.05$). Se realizó una consulta de bases bioinformáticas con el fin de ahondar en el posible efecto biológico de la metilación dentro de la región analizada. Los resultados sugieren que la metilación puede ser uno de diversos factores que tengan un efecto en la *IL24* y EAC.

Abstract

Coronary artery disease (CAD) is a multifactorial and polygenic disorder that arises from an excessive inflammatory response triggering alterations in lipid metabolism. The aim of this study is to determine if there are differences in the methylation pattern of a CpG island (iCpG) within the promoter region of the interleukin 24 gene (*IL24*) using three study groups: patients with CAD, individuals with subclinical atherosclerosis (SA) and a control group. Methylation-specific PCR (MSP) was used along with peripheral blood samples. The group with CAD and the AS group had biochemical variable levels similar to those reported regarding the two clinical entities. A significant difference was observed between the methylation frequencies of the group with EAC and the group with AS ($P < 0.05$). Bioinformatic databases were consulted in order to look into the possible biological effects of methylation in the analyzed region. The results suggest that methylation can be one of several factors that have an effect on *IL24* and CAD.

1. Introducción

1.1 Epidemiología de la enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se definen como el conjunto de patologías que afectan el corazón, los vasos sanguíneos o el pericardio. Dentro de las patologías que comprenden las ECV se incluye la enfermedad arterial coronaria (EAC), enfermedad vascular periférica, dilataciones aneurismáticas, evento vascular cerebral, enfermedad valvular, pericarditis, entre otras (Kumar & Cannon, 2009).

Los factores de riesgo modificables entre los que se encuentran la hipertensión, tabaquismo, obesidad abdominal, dislipidemia, diabetes mellitus, estrés, factores ambientales y falta de ejercicio regular, son los principales causantes de la morbilidad y mortalidad cardiovascular; en conjunto explican más del 90% de los infartos al miocardio (Yusuf et al., 2004; Mcqueen et al., 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que la población de países de bajo y mediano ingreso está más propensa a padecer enfermedades cardiovasculares debido a que están más expuestos a los factores de riesgo. Se cree que el 80% de los infartos al miocardio son prevenibles, ya que una dieta sana, actividad física y la abstinencia del uso de tabaco son fundamentales (OMS 2013). Particularmente en México, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad, generando aproximadamente 100,000 decesos cada año. Los datos más recientes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) recopilados en 2016, mostrados en la Tabla 1, permiten observar que las enfermedades cardíacas en conjunto son la primera causa de mortalidad nacional con 128,731 defunciones.

Tabla 1.- Causas de mortalidad en México (INEGI 2016)

Lugar	Causas	No. defunciones
1	Enfermedades del corazón	128,731
	<u>Enfermedades isquémicas del corazón</u>	<u>88,144</u>
2	Diabetes mellitus	98,521
3	Tumores malignos	79,514
4	Accidentes	37,184
5	Enfermedades del hígado	35,718
6	Enfermedades cerebrovasculares	34,106
7	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	21,057
8	Agresiones	20,762
9	Influenza y neumonía	18,889
10	Insuficiencia renal	13,300

Dentro de los datos mostrados en la Tabla 1, las enfermedades isquémicas del corazón generan alrededor del 68% de defunciones en territorio nacional. Este tipo de enfermedades se caracteriza por presentar estrés celular causado por cualquier disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno, de nutrientes y la eliminación de productos del metabolismo de un tejido biológico (Eltzschig & Eckle, 2011).

1.2 Enfermedad arterial coronaria

La EAC constituye alrededor del 68% de las ECV y el proceso subyacente de esta manifestación clínica es la aterosclerosis; una enfermedad crónica de progresión lenta que afecta a las arterias de tamaño medio o grande y se manifiesta clínicamente cuando provoca trombosis (Hansson, 2005). La concepción de la aterosclerosis ha cambiado de ser un proceso pasivo de acumulación de colesterol en la pared del vaso, a ser definida y considerada como una enfermedad inflamatoria crónica (Libby, 2009).

La enfermedad comienza con la disfunción del endotelio vascular, producida como una respuesta a una agresión ejercida en la pared vascular. Esta ocurre cuando el endotelio arterial entra en contacto con ciertos productos bacterianos o factores de riesgo que incluyen desde una alteración en el metabolismo de lípidos, la presencia de hormonas vasoconstrictoras (asociadas a hipertensión), productos de glucoxidación (asociados a altos niveles de glucosa en sangre), compuestos dañinos derivados del tabaquismo o citocinas proinflamatorias derivadas de tejido adiposo cercano (Libby, Bornfeldt, & Tall, 2016). El detrimento de las condiciones normales del endotelio promueve la expresión de citocinas y quimiocinas, un aumento de la permeabilidad de la capa de células endoteliales (CE) y un incremento en la expresión de moléculas de adhesión (Aziz & Yadav, 2016).

Desde hace aproximadamente dos décadas se ha descrito el proceso de infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) al espacio subendotelial, en donde, al existir un ambiente de estrés oxidativo, ocurre la peroxidación de los lípidos contenidos en las LDL (Garcia, 2000). Las LDL oxidadas (ox-LDL) son factores quimiotácticos para leucocitos mononucleares (monocitos y células T) circulantes, que atraviesan el endotelio vascular y se transforman en macrófagos, los cuales son capaces de fagocitar dicho tipo de lipoproteínas a través de receptores “scavenger” iniciando el fenómeno inflamatorio (Greaves & Gordon, 2001). Las ox-LDL activan a las CE y macrófagos, lo que resulta en la producción de moléculas de adhesión como E-selectina y la molécula de adhesión vascular celular 1 (VCAM-1, por sus siglas en inglés) y quimiocinas, tales como proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1, por sus siglas en inglés), quimiocina de ligando 5 con motivo C-C (CCL5, por sus siglas en inglés), quimiocina 10 con motivo C-X-C (CXCL10, por sus siglas en inglés) y quimiocina ligando 1 con motivo C-X3-X (CX3CL1, por sus siglas en inglés) que atraen monocitos, células dendríticas y células T a la íntima (Zernecke, Shagdarsuren, & Weber, 2008). En la íntima, mediante el factor estimulador de colonias, los macrófagos estimulan la diferenciación de monocitos a macrófagos, proceso necesario para el desarrollo de la aterosclerosis (Hartman & Frishman, 2014). Los macrófagos regulan a la alta los receptores tipo scavenger para fagocitar las LDL oxidadas. Estos receptores

carecen de regulación a la baja, lo que conduce a una captación continua en grandes cantidades de LDL oxidadas, favoreciéndose la acumulación de lípidos en su interior así como su conversión a células espumosas (Libby et al., 2016). La acumulación de estas últimas genera la estría grasa, considerada como la lesión inicial de la aterosclerosis.

Por su parte, las células espumosas inician una cascada de señalización que conduce a la liberación de mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas, proteasas y radicales libres (Libby, Ridker, & Hansson, 2011). Las citocinas secretadas estimulan la expresión de las moléculas de adhesión en CE, lo que promueve el reclutamiento de más monocitos, amplificando y perpetuando la reacción inflamatoria (Hartman & Frishman, 2014). Las citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) e interferón gamma (IFNG) son liberadas por células T activadas que fueron reclutadas a la pared vascular (Tall & Yvan, 2015). El papel de estas citocinas proinflamatorias en la enfermedad se ha visto en modelos de ratón aterosclerótico observándose que estas promueven la formación de lesiones. De igual manera se ha visto que al inhibir la transcripción de genes que codifican para citocinas como interleucina 4 (*IL4*), interleucina 6 (*IL6*), interleucina 12 (*IL12*), *IFNG* y *TNF* da pie a un desarrollo reducido de aterosclerosis (Buono et al., 2003; Davenport & Tipping, 2003). Con esto, se destaca que hay una gran gama de moléculas inflamatorias involucradas en la formación, mantenimiento y proliferación de las lesiones ateroscleróticas.

Conforme se va avanzado en la gravedad de lesiones hay un involucramiento secuencial de las capas arteriales (íntima, media y adventicia). Los ateromas son lesiones en la pared arterial que tienen un núcleo lipídico rico en colesterol rodeado por una respuesta inflamatoria (Aziz & Yadav, 2016). El ateroma está conformado por cantidades variables de células musculares lisas, macrófagos, linfocitos T, ésteres de colesterol, moléculas inflamatorias, tejido conectivo y cuenta con aproximadamente un 20% de calcio (Rojers et al., 2011). La placa continúa su crecimiento paulatino hasta causar manifestaciones clínicas derivadas de alteraciones en el flujo sanguíneo como la disminución del flujo sanguíneo a un tejido (isquemia de tejido), generar trombos,

estancación del flujo en las arterias distales u ocasionar infartos (Douglas & Channon, 2014). En la figura 1 se muestran resumidos los eventos clave en el desarrollo de la EAC.

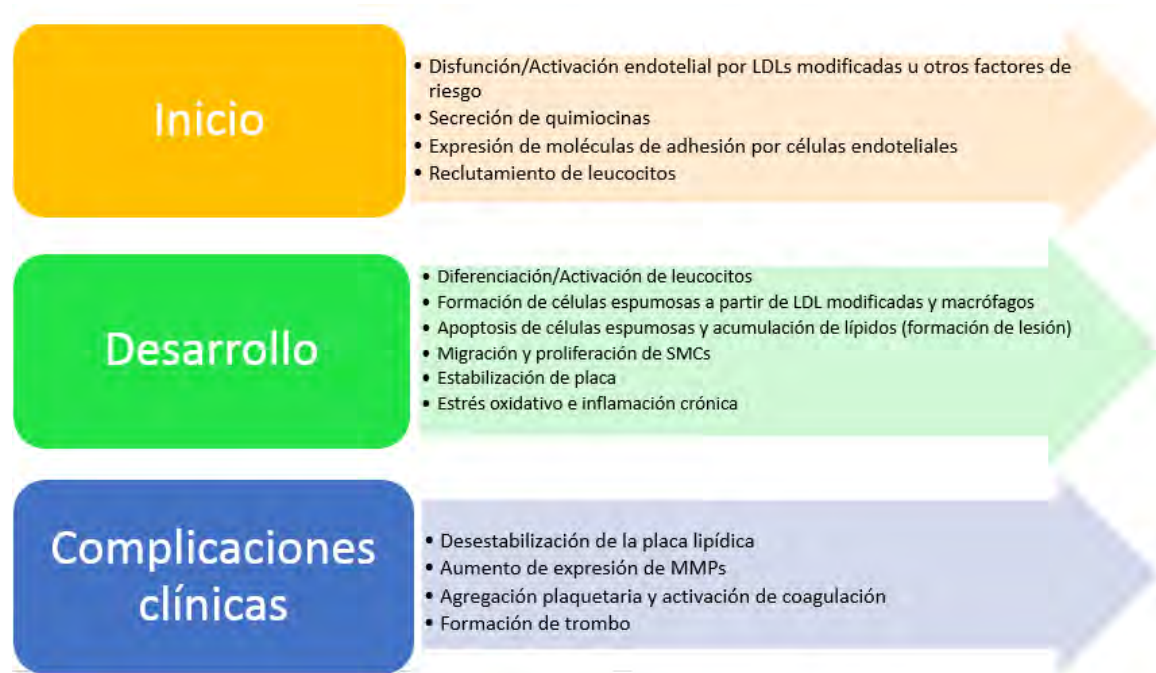


Figura 1.- Eventos clave en el desarrollo de EAC (Modificada de Ramji & Davies, 2015)

En todos los procesos biológicos (Figura 1) que contribuyen a la formación y desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, particularmente en el ámbito inflamatorio, se requieren distintos niveles de regulación en respuesta a los factores ambientales, siendo uno de ellos la organización del ADN.

1.3 Organización del ADN

Como tal, en las células eucarióticas las moléculas largas de ADN se compactan en estructuras llamadas cromosomas, los cuales no sólo caben perfectamente dentro del núcleo sino que también pueden repartirse con facilidad entre las dos células hijas durante cada división. Cada cromosoma consiste en una sola molécula de ADN lineal muy larga, asociada con proteínas que pliegan y condensan el delgado filamento de

ADN en una estructura más compacta, de esta manera es empacado en un complejo de ADN, histonas, un número de proteínas no histonas, el cual recibe el nombre de cromatina (Recillas, 2002).

Esta actividad de compactación del ADN es mediada por proteínas especializadas que se unen al ADN y lo pliegan, generando así una serie de espirales y asas que proveen niveles de organización cada vez más elevados e impiden que el ADN se encuentre desorganizado (Felsenfeld & Groudine, 2003). Este proceso no sólo compacta el genoma para abarcar el espacio del volumen nuclear, también tiene un efecto en la regulación de la expresión de génica (Vasanthi & Mishra, 2008). Básicamente, el empaquetamiento limita la accesibilidad de muchos elementos reguladores de secuencia de ADN, siendo funcionalmente importante en el control de la transcripción, replicación, reparación y recombinación (Groth, Rocha, Verreault, & Almouzni, 2007).

El primer nivel de organización de un genoma eucariótico consiste en un complejo de nucleoproteína multifacético dinámico conocido como el nucleosoma, la unidad básica de la cromatina (Szerlong & Hansen, 2011). Esta estructura consiste de alrededor de 147 pb de ADN envueltos alrededor de un octámero que consta de dos ejemplares de cada una de las histonas H2A, H2B, y un tetrámero H3-H4 (Margueron & Reinberg, 2010).

Para lograr un mayor grado de compactación, se ha visto involucrada la asociación de una quinta proteína, la histona H1 (histona "linker") a la región internucleosomal para constituir la estructura cromatínica conocida como solenoide o fibra de 30 nm (Zhang & Pugh, 2011). En la figura 2 se muestran los estados de compactación del ADN.

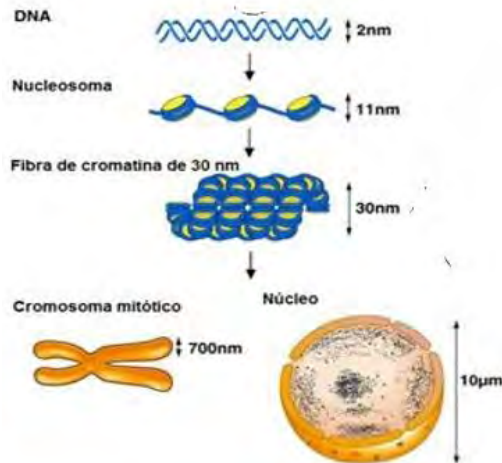


Figura 2. Compactación del ADN. Modificada de Maeshima, Hihara, & Eltsov, 2010

Las histonas tienen un dominio básico N-terminal llamado cola N-terminal de las histonas, las cuales emergen de dichas histonas en todas direcciones y no están implicadas en el mantenimiento de la integridad estructural del nucleosoma, sin embargo son esenciales para la condensación de la cromatina (Spencer & Davie, 1999). Estos dominios de las histonas N-terminales contienen una gran cantidad de modificaciones postraduccionales, que juegan papeles claves en la regulación de la replicación del ADN, recombinación, reparación y transcripción. Estas modificaciones incluyen la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y la ADP ribosilación (Munshi, Shafi, Aliya, & Jyothy, 2009). Las modificaciones pueden alterar la estructura del nucleosoma y también servir como una plataforma para el ensamblaje de múltiples complejos de proteínas que modifican la cromatina (Zhang & Pugh, 2011).

Todos estos niveles de empaquetamiento del genoma eucarionte confieren un impedimento físico para la expresión de los genes. Dicho impedimento interfiere directamente con el proceso de transcripción de los genes, desde la dificultad para el reconocimiento de los factores de transcripción de sus secuencias blanco en el ADN, así como para la elongación de la ARN polimerasa II en la generación del ARN mensajero. Por tal motivo, se ha descrito a la cromatina como un entorno represivo para la expresión de los genes. Para que exista la expresión de los genes es necesario

estructurar la cromatina a un nivel permisible para la transcripción, así como para otros procesos asociados al genoma como la replicación del ADN, la reparación del ADN y su recombinación, entre otros (Groth et al., 2007).

Cabe destacar, que la cromatina presente a lo largo del genoma no es homogénea en términos de su organización y estructura. En un núcleo celular típicamente pueden ser identificadas regiones de mayor densidad óptica. Estas se sabe que corresponden a cromatina de alto grado de compactación donde no existe expresión génica, denominándose a esta conformación de cromatina como heterocromatina (Beisel & Paro, 2011). De manera contraria, existen regiones de menor densidad óptica donde se ha distinguido la mayor parte de la actividad transcripcional: a esta cromatina se le denomina eucromatina (Beisel & Paro, 2011). Este tipo de dinamismo es lo que ha permitido a los organismos eucariontes la capacidad de desarrollar diferentes grados de complejidad funcional y regulatorio.

1.4 Epigenética

La manera en que los genes son regulados en tiempo y espacio definen diferentes programas de expresión con los cuales se obtienen los diversos tipos y estructuras celulares de los organismos eucariontes a partir de un mismo genoma. En el ser humano se han descrito alrededor de 200 diferentes tipos celulares que van desde el momento de la fecundación hasta la constitución de una persona adulta. La manera en que se obtienen estas diferencias depende de los diversos programas de regulación específicos y la expresión de genes característicos de cada tipo celular (Splinter & De Laat, 2011).

Con la finalidad de que los genes puedan ser transcritos o reprimidos en un tipo y momento celular dado, la cromatina puede relajarse (activación) o compactarse (represión). Como una consecuencia de esto, el genoma de cada tipo celular estará estructurado en un entorno cromatínico distinto y específico a cada tipo celular, y esto debido a que los programas de expresión génica, difieren entre cada una de ellas. De

esta forma, la cromatina participa en el proceso de conferir identidad a cada tipo celular, una característica que es heredable a cada célula durante la mitosis y meiosis. A lo largo de la diferenciación celular y del desarrollo es cuando estos distintos patrones de regulación establecen los cambios en la estructura de la cromatina y el grado expresión génica. Sin embargo, todas las células, poseen en todo momento el mismo genoma en términos de la secuencia del ADN. Derivado de estas observaciones, se acuñó que la epigenética se refiere al estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en el desarrollo de un organismo, desde el óvulo fertilizado hasta su senescencia, pasando por la forma adulta (Deichmann, 2016).

En la actualidad, gracias a una mejor comprensión del papel que ejerce la cromatina con respecto a la expresión génica en cada tipo celular se ha redefinido el concepto de epigenética considerándose ahora como procesos de regulación epigenética todos aquellos que influyen en la expresión heredable de los genes sin que ocurran cambios en la secuencia del ADN (Deichmann, 2016).

Se pueden distinguir varios procesos involucrados en la regulación epigenética: 1) la metilación del ADN; 2) las modificaciones post-traduccionales de las histonas; 3) los complejos remodeladores de la cromatina ATP dependientes; 4) los complejos de proteínas represoras Polycomb y activadoras Trithorax; 5) mecanismos de regulación mediados por ARN no codificante (Golbabapour, Abdulla, & Hajrezaei, 2011). En conjunto, estos procesos modulan la estructura de la cromatina permitiendo el establecimiento de los diferentes programas de expresión génica que dan identidad a cada tipo celular.

En sí, las marcas epigenéticas son modificaciones químicas del ADN y de sus proteínas asociadas a la cromatina mediadas por enzimas. A pesar de que no alteran la secuencia primaria del ADN, también contienen información heredable y participan en la regulación de la función del genoma. Las modificaciones como la metilación de la citosina, modificaciones postraduccionales de los residuos N-terminal de las histonas, y el posicionamiento de los nucleosomas, influyen en el estado

transcripcional y otros aspectos funcionales de la cromatina, y pueden alterar la expresión génica en respuesta a señales ambientales y de desarrollo (Hunter, Hollister, & Bomblies, 2012). Por ejemplo, la metilación del ADN y en determinados residuos N-terminal de la histona H3, que conllevan a cambios en la conformación de la cromatina, son importantes para el silenciamiento transcripcional de genes y la función de la cromatina (Swygert & Peterson, 2014). Dado que la cromatina está estabilizada por las uniones covalentes entre el ADN y las histonas y otras proteínas básicas del núcleo celular, las modificaciones postraduccionales de las histonas dan lugar a cambios de afinidad en su unión con el ADN, generando una conformación cerrada o abierta de la cromatina (hetero o eucromatina respectivamente) (Swygert & Peterson, 2014). Tales marcas son esenciales para la regulación de la estructura de la cromatina y la expresión de genes implicados en procesos tales como la inactivación del cromosoma X, impronta génica, embriogénesis, gametogénesis y el silenciamiento de secuencias no génicas que podrían ser perjudiciales para las células si se expresan y por lo tanto se activan.

En la figura 3 se destacan los mecanismos epigenéticos que tienen impacto en el ser humano: la metilación del ADN, modificación de histonas, y silenciamiento de genes mediado por RNA.

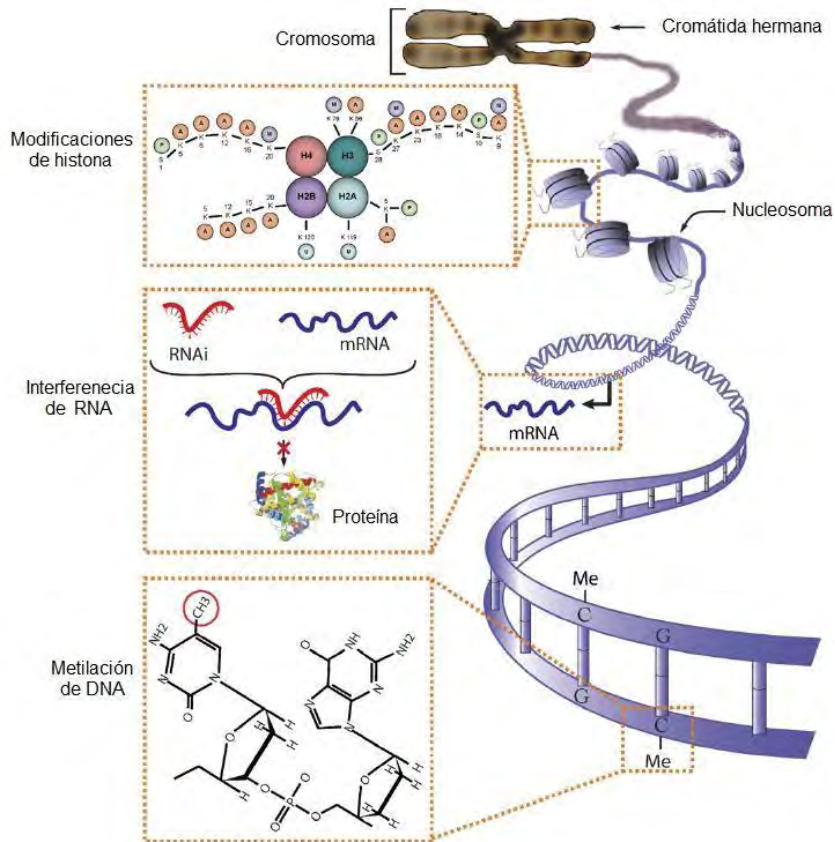


Figura 3. Tipos de modificación epigenética en el humano. Modificada de Sawan, Vaissière, Murr, & Herceg, 2008.

Dentro de los mecanismos que se han identificado en el proceso de aterosclerosis, resumidos en la figura 4, se encuentra el enfoque epigenético (Ordovás & Smith, 2010). Esta área se refiere a modificaciones en el ADN sin cambios en la secuencia de bases modulando la accesibilidad de activadores o de represores a las secuencias reguladoras del ADN y que son capaces de inducir expresión o represión de genes. Esta compleja regulación lleva a la célula a mantener de forma estable y heredable diversas características, independientemente de las contenidas en el material genómico; tiene un papel esencial en el desarrollo y la diferenciación celular normal (García, Ayala, & Perdomo, 2012).

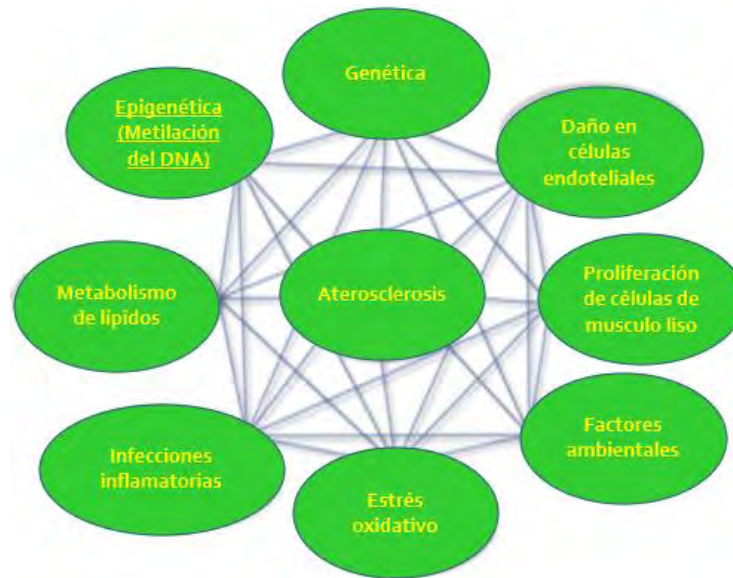


Figura 4.- Mecanismos involucrados en EAC. Modificada de Hai & Zuo, 2016.

La metilación del ADN es una de las modificaciones epigenéticas más importantes, desempeñando papeles clave en la regulación de la expresión génica, genómica, la inactivación del cromosoma X, y la tumorigénesis (Jeltsch & Jurkowska, 2014). Esta marca epigenética involucra la modificación covalente del quinto carbono en la citosina y la suele presentarse en dinucleótidos citosina-fosfato-guanina (CpG) a lo largo del genoma (Illingworth et al., 2010). Los dinucleótidos CpG parecen estar distribuidos heterogéneamente en el genoma humano, pero están concentrados en sitios llamados islas CpG (iCpG), que son regiones de ADN genómico con una frecuencia elevada de dinucleótidos CpG (Deaton & Bird, 2011). Típicamente una iCpG tiene al menos una longitud de 200 pares de base (pb) con más de 50% de contenido de guaninas y citosinas y una razón observada/esperada de CG mayor de 60% (Deaton & Bird, 2011). Estas regiones se solapan con regiones promotoras en 50-60% de los genes en humanos. También se ha podido identificar la distribución de las iCpGs en otros tejidos, estimando que están presente en 6 al 8% del ADN genómico del cerebro, de la sangre, del músculo y del bazo (Branco, Ficz, & Reik, 2012; Ehrlich et al., 1982). Aunado a esto, se ha observado que hay metilación de iCpG tejido específica para genes importantes en el desarrollo, lo que sugiere un mecanismo programado de metilación del ADN.

Desde una perspectiva funcional, la metilación puede ocasionar uno de tres desenlaces: cambiar la afinidad de un factor de transcripción al gen metilado, atraer otros factores de transcripción al sitio metilado pudiéndose activar o inactivar cascadas de señalización y propiciar alteraciones en el estado endógeno de la cromatina generando cambios en la maquinaria celular (Zhang & Pradhan, 2014).

Para llevar a cabo este proceso de metilación del ADN, existen una serie de proteínas con actividad enzimática denominadas ADN metiltransferasas (DNMT por sus siglas en inglés), las cuales, catalizan la transferencia de grupos metilo desde la S-adenosil metionina (SAM), que es un aminoácido donador de grupos metilo y juega un rol en la vía metabólica de la homocisteína (Škovierová et al., 2016). Dentro de las DNMT que regulan el proceso de metilación se han identificado tres enzimas clave: DNMT1 que regula el mantenimiento de patrones de metilación, DNMT3A y DNMT3B encargadas de la metilación *de novo*. Estas proteínas están altamente conservadas entre especies y tienen secuencias de aminoácidos similares. La región terminal contiene un dominio regulador que permite a las DNMTs anclar en el núcleo y reconocer ácidos nucleicos o nucleoproteínas, en tanto que el extremo C-terminal posee un dominio catalítico, que es responsable de la actividad enzimática (Chen & Li, 2004; Hamidi, Singh, & Chen, 2015).

1.5 Metilación en genes inflamatorios asociados a aterosclerosis

El involucramiento de la metilación del ADN en la región promotora de genes inflamatorios asociados a la patogénesis de la aterosclerosis representa un territorio poco explorado. Esto puede deberse a la complejidad para la obtención de tejido específico en enfermedades multifactoriales como lo es la EAC. Existen estudios de genes inflamatorios que impactan en procesos ateroscleróticos, detallándose sus metodologías y resultados en la Tabla 2, mostrándose que la metilación en la región promotora de varios genes tiene un efecto regulador considerando que se estudiaron una variedad de fuentes celulares y patologías cardiovasculares.

Tabla 2.- Estudios de metilación en genes inflamatorios asociados a procesos ateroscleróticos

Gen	Rol en EAC	Fuente biológica	Método empleado	Patología del estudio	Resultados del estudio	Referencia
<i>HOXA9</i>	Regula expresión de genes involucrados en adhesión de leucocitos	Biopsias de aortas con y sin aterosclerosis	Análisis de expresión génica	EAC	Metilación diferencial en sitios CpG en cuerpo génico (exón e intrones).	Trivedi, Patel, & Patel, 2007
<i>IL4</i>	Promueve ambiente inflamatorio (secreción moléculas de adhesión, citocinas), participa en disfunción endotelial.	Leucocitos de sangre periférica	Secuenciación de Sanger	asma bronquial	5 sitios CpG de -80 a +118 en promotor; sitios desmetilados antes y después de presentar el alérgeno.	Kwon, Kim, Lee, Oh, & Choi, 2008
<i>FOXP3</i>	Regula células T reguladoras (inhibidoras de aterosclerosis).	Leucocitos de sangre periférica	Secuenciación de Sanger	SICA	Región no metilada en células T reguladoras, supresión epigenética aumenta riesgo de SICA.	Jia et al., 2013
<i>MCP1 (CCL2)</i>	Aumenta migración de monocitos a capa íntima.	Monocitos Th1 de ratón con aterosclerosis	PCR específica de metilación anidada	EAC	Región promotora hipometilada en ratones con aterosclerosis.	Wang et al., 2013
<i>CCR5</i>	Reclutamiento y migración a íntima de leucocitos circulantes.	Células T, monocitos, línea celular Jurkat	Análisis de expresión	N/A	Células T activadas presentan bajos niveles de metilación en promotor.	Bot et al., 2014

<i>TNF</i>	Induce expresión de moléculas de adhesión y citocinas proinflamatorias. Participa en la disfunción endotelial, aumenta generación de ox-LDL.	Leucocitos de sangre periférica	Secuenciación de Sanger y corte enzimático	Accidente cerebrovascular	19 sitios CpG de -186 a +349; bajos niveles de metilación en pacientes	Gómez et al., 2014
<i>IFNG</i>	Formación de especies reactivas de oxígeno, promueve expresión de moléculas de adhesión, participa en la disfunción endotelial	Leucocitos de sangre periférica	Análisis de curvas de disociación de alta resolución	Alergia a leche de vaca	Los pacientes presentan alta metilación de ADN en región promotora. A mayor metilación se observó menor concentración de interleucinas en suero	Berni et al., 2015
<i>IL6</i>	Aumenta expresión de ICAM1, coordina flujo de moléculas inflamatorias	Leucocitos de sangre periférica	Pirosecuenciación	Enfermedad de corazón isquémico	2 sitios CpG hipometilados en promotor	Zuo, Guo, Che, & Wu, 2016

ADN: ácido desoxirribonucleico, CCL2: ligando de quimiocinas 2, CCR5: C-C quimiocina receptora de tipo 5, CpG: citosina-fosfato-guanina, EAC: Enfermedad Arterial Coronaria, FOXP3: factor de transcripción caja forkhead P3, HOXA9: Proteína homeobox A9, ICAM1: molécula de adhesión intercelular 1, IFNG: Interferón gamma, IL-4: interleucina 4, IL-6: interleucina 6, LDL: lipoproteínas de baja densidad, MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1, Ox-LDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas, PCR: reacción en cadena de la polimerasa, SICA: síndrome isquémico coronario agudo, Th1: linfocitos T colaboradores 1, TNF: Factor de necrosis tumoral alfa,

Dentro de los genes inflamatorios cuya metilación ha sido estudiada (Tabla 2) se pueden destacar conocimientos recientes en torno a citocinas inflamatorias desde la perspectiva epigenética. Adicionalmente, existen estudios sobre interleucinas donde se ve su impacto a la asociación del proceso aterosclerótico como la IL-15 (Angeles et al., 2017), IL-17 (Vargas et al., 2015), IL-35 (Posadas, et al., 2017), IL-27 (Hirase et al., 2013; Posadas, et al., 2017) e IL-20 (Chen, et al., 2006). La IL-24 es una citocina de la cual existe poca información genética o funcional en un contexto cardiovascular. En la búsqueda realizada para efectos de esta tesis no se logró identificar reportes enfocados a la metilación de una iCpG, en población mestizo-mexicana, dentro de la región promotora del gen de *IL24*.

1.6 Interleucina 24

La molécula de interleucina 24 (IL-24) fue caracterizada en melanocitos, observándose sus propiedades antiproliferativas que dentro del contexto del melanoma podría contribuir a la diferenciación terminal de las células (Jiang, Lin, Su, Goldstein, & Fisher, 1995).

El gen de *IL24* es miembro de la familia de citocinas de IL-10 dentro de las que se incluye a la interleucina 10, interleucina 19, interleucina 20 e interleucina 24 (Huang et al., 2001). El gen consiste de 7 exones y 6 intrones ubicados en el cromosoma 1 brazo corto (1q32.1). También, presenta una homología de aminoácidos con la IL-10 del 30% y se logró identificar un sitio predictivo para la conformación de las cuatro interleucinas en forma de hélice. Otra característica que presenta el gen de *IL24* en su secuencia es que cuenta con un péptido señal de 49 aminoácidos en el extremo N terminal que está presente en moléculas secretas y cuya ubicación concuerda con el agrupamiento de las interleucinas mencionadas por lo que indica que están vinculadas entre sí (Caudell et al., 2002).

IL-24 lleva a cabo su proceso de señalización a través de dos receptores heterodiméricos: IL-20R1/IL-20R2 y IL-22R1/IL-20R2 (Figura 5). Al unirse a estos receptores se induce la activación de los factores de transcripción conocidos como transductor de señales y activadores de transcripción 1 y 3 (STAT-1 y STAT-3 por sus siglas en inglés) los cuales están involucrados en procesos de supervivencia y proliferación celular (Wang & Liang, 2005).



Figura 5.- Estructura tridimensional de IL-24 y su receptor heterodimérico (Modificado de Cruz, Nguyen, Sauane, & López, 2016)

La molécula de IL24 es producida principalmente por las células del sistema inmune, como las células mieloides y las células linfoides. A partir de experimentos *in vitro* con líneas celulares establecidas y cultivos primarios de pacientes, así como estudios en animales, se ha observado que las células epiteliales secretan IL-24 en respuesta a la estimulación de citocinas (Caudell et al., 2002). Las células mieloides también generan IL-24 en respuesta a productos microbianos, como los lipopolisacáridos (LPS, por sus siglas en inglés), a través de la activación de los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) (Buzas & Megyeri, 2006). En monocitos, la expresión de IL-24 es inducida

por LPS, concanavalina A o citocinas (Wang, Tan, Zhang, Kotenko, & Liang, 2002). Para prevenir respuestas de células T no controladas, se ha demostrado que la IL-24 actúa directamente sobre las células T para posiblemente amortiguar las primeras rondas de expansión de células CD8 (Wahl et al., 2009). Adicionalmente, los linfocitos B inducen la expresión de IL-24 después de ser estimulados por una combinación de anti-IgM y CD40-L (Maarof, Bouchet, & Dalloul, 2010). La estimulación con IL-1 β también aumenta la expresión de IL-24 en queratinocitos y miofibroblastos subepiteliales colónicos humanos (Andoh et al., 2009). Aunado a esto, se ha descrito la asociación de IL-24 en la vía inflamatoria en la que participa TNF- α , IL-6 e IFN- γ (Caudell et al., 2002).

A partir del perfil de expresión de *IL24* los factores de transcripción que dirigen la expresión de otras citocinas asociadas a células Th2 como STAT6 y la proteína de unión a GATA3 se han visto implicados en la regulación de IL-24 (Persaud et al., 2016). Esto se demostró cuando células T deficientes para proteína quinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) producen niveles reducidos de citocinas asociadas a células Th2, siendo estas la IL-4, IL-5 e IL-24 (Stevens et al., 2006). Otro aspecto clave de la expresión de IL24 es que su promotor proximal contiene sitios de unión para STAT6 y JUN, y se cree que estos factores de transcripción funcionan sinérgicamente para regular la producción de IL-24 por las células Th2 particularmente en procesos inflamatorios (Sahoo & Im, 2012). Se resume la información previamente mencionada de IL-24 en la Tabla 3 donde se resaltan sus fuentes celulares, inductores de expresión, quimiocinas y factores de transcripción asociados.

Tabla 3.- Contexto biológico de IL-24

Fuentes celulares	Inductores de expresión	Factores de transcripción	Citocinas Asociadas	Receptores
Monocitos	IL-1 β	JAK 1	TNF- α	IL-20R1/IL-20R2
Melanocitos	IL-17	Tirosin Cinasa 2	IFN- γ	IL-22R1/IL-20R2
Linfocitos Th2	IL-22	STAT 1	IL-6	
Fibroblastos	LPS	STAT 3		

Desde una perspectiva funcional, a pesar de que IL-24 es una citocina con funciones inmunes activas, tiene un efecto diferente dependiente de las líneas celulares estudiadas y del contexto biológico en el que se encuentre. En humanos, IL-24 tiene funciones antiproliferativas, ya que puede suprimir la proliferación de queratinocitos durante el proceso de regeneración celular que ocurre en la cicatrización de heridas (Poindexter et al., 2010); sin embargo, la IL-24 también presenta un rol inflamatorio en otros escenarios, particularmente trastornos autoinmunes. La evidencia de este papel inflamatorio se ha analizado más a fondo en experimentos en los que se han encontrado niveles elevados de IL-24 en el líquido sinovial y plasma sanguíneo de pacientes con psoriasis y otros trastornos autoinmunes, incluida la artritis reumatoide y la espondiloartropatía (Kragstrup et al., 2008). Otra instancia en la que se ha observado el papel inflamatorio de IL-24 es en la enfermedad inflamatoria intestinal donde su expresión aumenta en los pacientes afectados y está directamente involucrada en la reacción inflamatoria asociada a la vía JAK/STAT (Andoh et al., 2009).

1.7 Interleucina 24 en contexto cardiovascular

Como tal, varios reportes han descrito la actividad inflamatoria de la IL-24, sin embargo, hay poca literatura disponible de dicha molécula en contextos cardiovasculares

particularmente su participación en los procesos biológicos relacionados con la aterosclerosis.

Una característica distintiva de la enfermedad cardiovascular es la calcificación vascular, que es el proceso regulado de la biomineralización de las células del músculo liso vascular (VSMCs, por sus siglas en inglés) similar a la mineralización ósea en la osteogénesis. En sí, la presencia de calcio en las lesiones ateroscleróticas sirve como un indicador clínico de la aterosclerosis y se correlaciona en gran medida con la mortalidad de la EAC. Lee et al. realizó un estudio para examinar el papel de IL-24 en la enfermedad cardiovascular, específicamente la calcificación VMSC (Lee et al., 2012). En un modelo de calcificación murino empleando VSMCs inducidas por β -glicerofosfato (β -GP), se demostró que la IL-24 humana recombinante inhibe la calcificación de VSMC inducida por β -GP. Los autores demostraron que IL-24 suprimía la apoptosis inducida por β -GP de VSMCs e inhibe la expresión de marcadores específicos de calcificación y osteoblastos al regular negativamente la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) y la vía Wnt/ β -catenina, siendo esta segunda importante en la patogénesis de la aterosclerosis.

Un segundo experimento mostró que la administración exógena de IL-24 atenuó la expresión de la inflamación vascular y los genes relacionados con la hipertensión en células de músculo liso aórtico vascular de ratón (MOVAS, por sus siglas en inglés) (Kang, 2012). Al igual que la calcificación vascular, la hipertensión también es un indicador distintivo de la enfermedad cardiovascular. En ratas espontáneamente hipertensas, se identificaron 16 genes regulados diferencialmente, incluyendo la IL-24, que previamente no estaban implicados en la enfermedad cardiovascular. Dentro de este estudio se observó que IL-24 también regula la expresión de genes relacionados con la inflamación y la hipertensión, tales como angiotensinógeno, endotelina-1, proteína asociada al receptor de angiotensinógeno (AGTRAP, por sus siglas en inglés) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés); esto en células tratadas con peróxido de hidrogeno (Kang, 2012).

Otro estudio reciente presenta resultados que sugieren que algunos polimorfismos ubicados en el gen de *IL-24* están asociados con factores de riesgo metabólicos y cardiovasculares (Vargas et al., 2014). El estudio analizó factores genéticos de pacientes con EAC, individuos con aterosclerosis subclínica (AS) e individuos control; siendo todos los participantes individuos con ancestría mexicana mestiza. Los hallazgos revelaron una asociación de cuatro polimorfismos de *IL24* (rs1150253, rs1150256, rs1150258, rs3762344) con diversos factores de riesgo cardiovascular en los tres grupos del estudio. En el caso del grupo control se observó que los polimorfismos están asociados con la presencia hipertensión, niveles elevados de presión sistólica y presión diastólica. Para los individuos del grupo de AS se observó una asociación con la presencia de diabetes mellitus tipo 2 y los niveles sanguíneos de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) así como, los niveles de fosfatasa alcalina. Por último, en los pacientes diagnosticados con EAC se observó una asociación a hipertrigliceridemia, niveles de LDL mayores a 100 mg/dL y a niveles en sangre de apolipoproteína A (apoA), LDLs, GGT y el cociente apoB/apoA. Aunado a esto, el estudio reportó que los polimorfismos rs1150253 y rs1150258 presentan efectos funcionales, esto basado en análisis in silico. El alelo T del primer polimorfismo genera un sitio de unión a tres factores de transcripción pertenecientes a la familia GATA mientras que el segundo polimorfismo produce un cambio de aminoácido de histidina a tirosina lo cual altera la estructura proteica de IL-24.

En resumen, los estudios mencionados denotan la participación de IL-24 en la patogénesis de la aterosclerosis al suprimir la expresión de marcadores de calcificación y de osteoblastos promoviendo, en este último caso, el crecimiento de células de músculo liso vascular. Aunado a esto, un estudio de asociación de casos-contróles demostró la asociación de polimorfismos en el gen de *IL24* con factores metabólicos y de riesgo cardiovascular en individuos con EAC. Considerado estos hallazgos, la IL-24 es una molécula inflamatoria que contribuye en la patogénesis o progresión de la aterosclerosis.

2. Justificación

La aterosclerosis es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía, en México, registran que ocurren alrededor de 128 mil muertes al año por algún evento cardiovascular a causa de la aterosclerosis. Este padecimiento es de origen multifactorial, es decir, en su inicio y progresión participan tanto factores genéticos como ambientales y epigenéticos. Evidencia reciente señala que la inflamación e inmunidad, interaccionan con factores de riesgo metabólico, clínicos y ambientales, para mediar todas las etapas de la EAC, desde la acumulación de las LDL dentro del espacio subendotelial y la progresión de la placa aterosclerosa, hasta la ruptura y la trombosis (Libby et al., 2016). Estudios de epigenética enfocados a aquellas citocinas con rol en el proceso inflamatorio de la EAC (Tabla 2) son mínimos por lo que se requieren estudios adicionales para definir su participación y asociación con los factores de riesgo de dicho padecimiento. La literatura ha demostrado asociación de variantes genéticas de *IL24* al proceso inflamatorio, sin embargo no hay estudios que hayan evaluado la asociación de la EAC prematura con la metilación de la región promotora del gen de *IL24*. Estas consideraciones sustentan el interés y la importancia de investigar el estado de metilación de dicho gen en el desarrollo de la EAC en nuestra población. Los resultados de este estudio contribuyen al panorama existente de la IL-24 desde una perspectiva epigenética.

3. Hipótesis

Existe un patrón diferencial de la metilación en el gen de *IL24* que se asocia con la aterosclerosis y/o aterosclerosis subclínica.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar si existen diferencias en el patrón de metilación en el gen de *IL24* en individuos con EAC, individuos con aterosclerosis subclínica (AS) e individuos control.

4.2 Objetivo específico

Identificar si existen asociaciones del patrón de metilación relacionadas con características bioquímicas propias del padecimiento.

5. Metodología

5.1 Población

Se diseñó un estudio de casos y controles, anidado al proyecto Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA), el cual fue diseñado para investigar las bases genéticas de la EAC y evaluar la relación entre los factores de riesgo tanto tradicionales como emergentes en la enfermedad aterosclerosa clínica y subclínica en población adulta mexicana. La fase transversal del proyecto GEA se realizó de junio de 2008 a febrero de 2013, con especial cuidado en la amplia caracterización de los participantes con y sin EAC. El muestreo se realizó a conveniencia y se incluyeron 1,200 pacientes con EAC y 1,500 sujetos control con edad de 35-75 años, residentes de la Ciudad de México. Adicionalmente, se evaluó el calcio arterial coronario (CAC) a través de tomografía axial computada con multidetector para su estratificación en tres grupos de estudio. En la Figura 6 se detallan las características que presenta cada uno de los grupos, generándose un grupo de individuos con EAC claramente diagnosticada, individuos con AS e individuos control. Cabe destacar, que todos los participantes son

mestizos mexicanos no relacionados, con por lo menos tres generaciones de nacidos en México. El estudio GEA fue aprobado por el Comité de Investigación y Bioética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y realizado con base a los lineamientos de la Declaración de Helsinki. A todos los participantes se les aplicaron cuestionarios estandarizados para obtener información demográfica, antecedentes familiares y personales de factores de riesgo cardiovascular, hábitos de alimentación, actividad física, consumo de alcohol, uso de medicamentos y la firma de un consentimiento informado.

EAC	AS	Control	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> • CAC > 0 U.A • Individuos sometidos a angioplastia, historia de infarto, cirugía de revascularización • Diagnosticados por angiografía 	<ul style="list-style-type: none"> • CAC > 0 U.A • Sin evento cardiovascular en los tres meses previos a toma de muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> • CAC = 0 U.A • Voluntarios de banco de sangre • Sin historia familiar ni manifestaciones clínicas de EAC prematura. 	<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia cardíaca congestiva • Enfermedad hepática, renal u oncológica • Tratamiento con corticosteroides

Figura 6.- Características principales de los grupos de estudio

5.2 Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó considerando los datos de metilación en la región promotora del gen *ABCG1* asociado con la EAC (Peng et al., 2014). Dicho estudio fue considerado al ser uno de los reportes más recientes de metilación en región promotora donde se empleó la técnica de PCR específica de metilación (MSP, por sus siglas en inglés) con material genético proveniente de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés). En dicho trabajo se observó que un 82% de individuos con EAC presentaban metilación en la región promotora de *ABCG1* mientras que solo 17% controles presentaban dicha modificación epigenética. Con estos datos

y considerando un nivel de significancia de 0.01 se empleó el Software GPower Versión 3.1.9.2 (Faul, Erdfelder, Lang, & Buchner, 2007) obteniéndose que con 18 sujetos por grupo se tendría un poder estadístico del 90 por ciento para las comparaciones entre los tres grupos de estudio empleados.

Aun cuando con 18 individuos se obtiene un poder alto y un nivel de significancia adecuado, se logró extender la muestra arriba de los 18 sujetos mínimos requeridos por grupo; pudiéndose seleccionar 68 individuos con EAC, 75 individuos con AS y 26 sujetos control. Con el tamaño de muestra seleccionado se calculó por medio del Software GPower Versión 3.1.9.2 (Faul et al., 2007) que el poder estadístico para las comparaciones entre los tres grupos de estudio es de 99 por ciento. Adicionalmente se calculó el poder estadístico, por medio del Software GPower Version 3.1.9.2 (Faul et al., 2007), para las comparaciones EAC-AS, EAC-controles y AS-controles obteniéndose poderes estadísticos de 94.5%, 73% y 74%, respectivamente.

5.3 Mediciones antropométricas

El peso se midió en kilogramos (kg) y la talla en centímetros (cm), utilizando una báscula calibrada y un estadímetro de pared. El índice de masa corporal (IMC) fue calculado con la fórmula $\text{peso (kg)} / \text{talla (m)}^2$. La circunferencia de cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio, en el punto medio de la distancia entre la parte inferior de la última costilla y la cresta iliaca. La tensión arterial se midió en posición sedente después de por lo menos 10 minutos de reposo empleando un esfigmomanómetro digital Welch Allyn, series 5200 (Shaneateies Falls, N.Y., E.U.A.), y el promedio de las dos últimas de tres mediciones consecutivas se utilizó para el análisis. Se consideró sobrepeso con un IMC de 25 a 29.9 kg/m² y obesidad con un IMC ≥ 30 kg/m². La obesidad abdominal se definió con los valores de circunferencia de cintura de ≥ 80 cm en mujeres y ≥ 90 cm en hombres (Sánchez et al., 2003). La presencia de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se definió de acuerdo a los criterios de la Asociación Americana de Diabetes. El síndrome metabólico (SM) se definió cuando se presentaron tres o más de los siguientes

componentes: obesidad abdominal, tensión arterial $\geq 130/85$ mmHg, glucosa de ayuno ≥ 100 mg/dl, triglicéridos ≥ 150 mg/dl y colesterol de la lipoproteína de alta densidad (C-HDL) < 40 en hombres y < 50 en mujeres (Alberti et al., 2009). Los puntos de corte para definir hiperuricemia fueron valores de ácido úrico sérico > 6.0 mg/dl en mujeres y > 7.0 mg/dl en hombres (Ogbera & Azenabor, 2010). Las dislipidemias se definieron de acuerdo a los siguientes puntos de corte: hipercolesterolemia: colesterol total > 200 mg/dL o C-LDL ≥ 130 mg/dL; hipertrigliceridemia: triglicéridos ≥ 150 mg/dL; hipoalfalipoproteinemia: C-HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres. La hipertensión arterial se definió con cifras de tensión arterial sistólica y diastólica $\geq 140/90$ mmHg y/o uso de medicamentos antihipertensivos.

5.4 Análisis de laboratorio y definición de factores de riesgo cardiovascular

En ayuno de 12 horas, se obtuvieron muestras de sangre venosa. Las concentraciones de glucosa, colesterol total (CT), triglicéridos (Tg) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) fueron medidas en muestras frescas, mediante procedimientos enzimático-colorimétricos estandarizados (Roche/Hitachi, Alemania) en un autoanalizador Hitachi 902 (Hitachi LTD, Tokio, Japón). El C-LDL fue calculado con la fórmula de Friedewald modificada por De Long (Kurschinski, Dennen, Garcia, & Scanu, 1989). En el laboratorio de Endocrinología, la precisión y la exactitud de las determinaciones de lípidos son evaluadas periódicamente por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, EE. UU. La apolipoproteína B se cuantificó por inmunonefelometría (BN Pro Spec Nephelometer, Dade Behring Marburg GmbH, Alemania). El coeficiente de variación fue $< 6\%$ en todos los ensayos. La insulina en suero se determinó por radioinmunoanálisis (Millipore Cat. No. HI-14K, MO, EE. UU) con coeficientes de variación intraensayo e interensayo de 2.1 y 6.8%, respectivamente. La resistencia a la insulina se estimó por medio del modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés) (Wallace, Levy, & Matthews, 2004). La concentración de adiponectina se determinó por inmunoensayo (Quantikine ELISA,

R&D MN, EE. UU.). La diabetes mellitus fue definida de acuerdo con los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association, 2009), o cuando los participantes manifestaron utilizar medicamentos para el control de la glucosa y en aquellos con diagnóstico previo de diabetes realizado por un médico. Las dislipidemias se definieron de acuerdo con los siguientes puntos de corte: hipercolesterolemia, CT > 200 mg/dl o C-LDL > 130 mg/dl; hipertrigliceridemia, Tg > 150 mg/dl; C-HDL bajo, < 40 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres.

La tomografía computada es un método validado para cuantificar el CAC. Las mediciones se realizaron utilizando un tomógrafo multidetector de 64 cortes (Somaton Sensation, Siemens, Malvern, PA, EE. UU) o 256 cortes (Somaton Definition Flash, Siemens, Erlangen, Alemania), antes y después de febrero de 2009, respectivamente. El estudio se obtuvo con sincronización cardíaca mediante protocolo prospectivo con los siguientes parámetros: 120 kV, 120 mA y grosor de corte de 3 mm. El CAC se cuantificó de acuerdo con el método de Agatston (Mautner et al., 1994). Las imágenes fueron interpretadas por un radiólogo experto, en una estación de trabajo (Leonardo Workstation, Siemens Forcheim, Alemania) provista de un programa específico para el análisis del índice de calcio CaScoring (Siemens, Forcheim, Alemania). El test-retest para el puntaje de Agatston utilizado para evaluar la fiabilidad intraobservador mostró un coeficiente de correlación intraclase muy alto (0.99).

6. Estrategia Experimental

6.1 Extracción de ADN

Se tomaron 15 ml de sangre periférica de cada individuo en tubos con EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer, México). A partir de esta muestra se extrajo el ADN genómico por medio de la técnica de expulsión salina (Miller, 1998). La integridad del ADN fue verificada en geles de agarosa al 1% teñidos con Midori green (agente intercalante de ADN).

Para la preparación del gel se empleó agarosa con grado biología molecular (Bioline, EE. UU) y buffer Tris, Borato, EDTA (Buffer TBE, Thermo Fisher Scientific, Lituania) en una concentración del 0.5% para obtener un gel con una concentración de 1% p/v adicionando 0.3 μ l de bromuro de etidio como agente intercalante. Se empleó marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific, Lituania) y buffer de carga 6X (Thermo Fisher Scientific, Lituania). Para el pozo de marcador de peso molecular de 100 pb se utilizó un volumen de 0.5 a 1 μ l. En el caso de los pozos, se tomó de cada muestra un volumen de 2 μ l en conjunto con 1 μ l de buffer de carga. Finalmente, se le proporcionó al gel una corriente con un voltaje de 75 mV para que en un intervalo de 0.5 a 1 horas se visualizara con luz ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm.

6.2 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó con el equipo automatizado nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), la longitud de onda con la que se leyó el ADN fue de 280 nm.

6.3 Modificación del ADN con bisulfito sódico

El tratamiento con bisulfito permite discriminar entre secuencias metiladas y no metiladas ya que convierte las citosinas no metiladas a uracilos, mientras que las citosinas metiladas son resistentes a la reacción por lo que permanecen sin cambios. A partir de 1000 ng de ADN, por muestra, fueron tratados con bisulfito usando el kit EpiTect Bisulfite (Qiagen, Valencia, CA; Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el ADN modificado fue purificado a través de las columnas EpiTect spin column (Qiagen, Valencia, CA) utilizándose un buffer para unión a la columna y un buffer para desulfonación para que tras varios pasos de centrifugación, el ADN tratado se sometiera a lavados con el objetivo de remover todas

las trazas de bisulfito de sodio. Posteriormente se agregó 30 µl de buffer de elusión al ADN para su recuperación. Como paso final se realizó la cuantificación de este ADN convertido con el equipo automatizado nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Una vez finalizado el proceso de conversión, se almacenaron los ADN convertidos en ultracongelador (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) a -80 °C.

6.4 Amplificación de la región promotora por MSP

El estado de metilación del promotor será determinado por PCR específica de metilación (MSP, por sus siglas en inglés). Esta técnica requiere el uso de ADN tratado con bisulfito de sodio y dos sets de primers: un set para la secuencia con estado metilado y otro para la secuencia con estado no metilado. Para el diseño del set de primers dirigido a la región metilada se incorpora en su secuencia guaninas que son complementarias a las citosinas metiladas que no fueron modificadas por el tratamiento con bisulfito. Por su parte, el set de primers dirigido a la secuencia no metilada debe incorporar en su secuencia timinas que sean complementarias a los uracilos derivados de citosinas que fueran modificadas por el tratamiento con bisulfito. Posteriormente, se realizan dos reacciones de PCR, una por cada set de primers, y se determina la presencia de una región metilada o no metilada a partir de observar que set de primers presento amplificación (Herman, et al, 1996; Sasaki et al., 2003).

Para el presente estudio se analizó una región de 10,000 pb en el promotor del gen de *IL24*, con el software MethPrimer (Li & Dahiya, 2002), para localizar posibles iCpG. Una vez determinada la presencia de una iCpG se diseñaron dos sets de primers específicos para esta región de interés: uno para la secuencia metilada y otro para la secuencia no metilada. Para validar el diseño de estos primers y como control de la eficiencia del tratamiento con bisulfito se empleó en cada reacción de MSP un ADN humano metilado y un ADN humano no metilado (EpiTec PCR Control DNA set, Qiagen, Valencia, CA)

como controles positivos y negativos; respectivamente. A continuación, se muestra la secuencia de los cebadores empleados para cada caso, así como el tamaño del fragmento obtenido.

Tabla 4.- Primers de IL-24

IL-24	Primer (5´-3´)	Amplicón (pb)
Región metilada	5'-GGGGAGATTAATATTGTTTAGAAATTC-3' 5'-TTATATTATAACAATCGAATACGCT-3'	324
Región no metilada	5'-GGGGAGATTAATATTGTTTAGAAATTTG-3' 5'ACTATTATATTATAACAATCAAATACACT-3'	326

La conversión de bisulfito de sodio y la recuperación de ADN, por muestra, se realizó utilizando el kit EpiTect Bisulfite (Qiagen, Valencia, CA) de la siguiente manera: se diluyó el ADN extraído de sangre periférica para tener una concentración final de 1000 ng en un volumen total de 140 µl; se agregó 85 µl de Bisulfite Mix y 35 µl de buffer DNA Protect en un tubo el cual fue sometido al proceso de conversión usando un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EE.UU). El ADN se desnaturalizó a 95 °C durante 5 minutos, se incubó a 60 °C durante 25 minutos, desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, incubación a 60 °C durante 85 minutos, desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, incubación a 60 °C durante 175 minutos, y finalmente se mantuvo a 20 °C indefinidamente. Después del tratamiento con bisulfito, al ADN recuperado se le agregaron 560 µl de Buffer BL para promover la unión del material genético a las columnas EpiTect spin column (Qiagen, Valencia, CA). El volumen al momento (700 µl) se centrifugó a 12,000 rpm por un minuto y se procedió con un lavado de 500 µl de Buffer BW para remover el bisulfito residual, seguido por una centrifugación a 12,000 rpm por un minuto. Inmediatamente se realizó la reacción de desulfonación mediante la adición de 500 µl de Buffer BD incubándose el ADN con este buffer por 20 minutos a temperatura ambiente. En seguida se realizaron dos lavados empleando 500 µl de Buffer BW seguidos por una centrifugación a 12000 rpm

por un minuto. Finalmente, se eluyó el ADN convertido incubando la columna con agua estéril a 55°C por 5 minutos y centrifugando a 12,000 rpm por un minuto. El ADN convertido fue cuantificado con un nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer) y almacenado a -20 °C.

Cada mezcla de reacción de PCR se utilizó con un volumen total de 10 µl la cual estuvo conformada por: 5 µl de PyroMark PCR Master Mix (Qiagen; 1.5 mM MgCl₂, ADN polimerasa HotStarTaq, dNTPs), 1.5 µl de primer forward de región metilada o no metilada, 1.5 µl de primer reverse de región metilada o no metilada (Tabla 4), 1 µl de agua libre de RNAsas (Qiagen) y 1 µl de material genético con una concentración mínima de 10 ng. Las condiciones de ciclaje empleadas para la MSP se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5.- Condiciones de ciclaje de MSP

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1) Desnaturalización_inicial	94	5
2) Desnaturalización*	94	0.5
3) Alineamiento de primers*	55	0.5
4) Elongación*	72	0.5
5) Elongación Final	72	7
6) Enfriamiento	72	Indefinido

*Paso realizado por 40 ciclos

6.5 Electroforesis

Considerando los parámetros previamente descritos se llevó a cabo, por muestra, dos reacciones de PCR, una con primers para la región metilación y otra para la región no metilada. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% empleando agarosa con grado biología molecular (Bioline, EE. UU) y buffer TBE en una concentración del 0.5% adicionando 0.5 a 1 µl de bromuro de etidio como agente intercalante. Se emplearon los reactivos de marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific, Lituania) y buffer de carga 6X (Thermo Scientific, Lituania). Para el

pozo de marcador de peso molecular de 100 pb se empleó un volumen de 0.5 a 1 μ l. En el caso de los pozos para muestras se empleó un volumen de 2 μ l en conjunto con 1 μ l de buffer de carga. Finalmente, se le proporcionó al gel una corriente con un voltaje de 75-91 mV para que en un intervalo de 0.5 a 1 horas se visualizara el amplicón con luz ultravioleta en un transiluminador Benchtop 3UV Transilluminator (UVP, EE.UU).

6.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el programa SPSS V.22. Para determinar las diferencias de las variables continuas se realizó un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de un factor para comparar una variable entre los tres grupos. Adicionalmente, se empleó la prueba post hoc de ANOVA, específicamente la prueba de Bonferroni, para variables continuas con el objetivo de observar la existencia de diferencias significativas de una variable entre dos grupos así como la prueba t de Student; para estas pruebas se compararon los datos del grupo pacientes contra el grupo subclínico, grupo pacientes contra grupo controles y grupo subclínicos contra grupo controles. Para las variables categóricas se realizó la prueba de Ji-cuadrada (χ^2) comparando los tres grupos entre sí y las comparaciones entre dos grupos considerando las combinaciones mencionadas. Para la prueba ANOVA y χ^2 se utilizó un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ para considerarse como estadísticamente significativo. Para la prueba t de Student se utilizó un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ y para la prueba post hoc de Bonferroni se utilizó un nivel de significancia de $\alpha = 0.01667$.

Para la comparación de las frecuencias de metilación entre grupos se consideró comparar los datos del grupo pacientes contra el grupo subclínico, grupo pacientes contra grupo controles y grupo subclínicos contra grupo controles. Debido al tamaño de muestra y datos de frecuencia obtenidos se empleó la prueba exacta de Fisher con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

7. Resultados

7.1 Ubicación de isla CpG

A partir de analizar 10,000 pb rio arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de *IL24* se observó la presencia de una iCpG, con 100 pb de longitud, en un intervalo de -6,359 a -6,458 pb rio arriba del sitio de inicio de la transcripción. La secuencia, proveniente del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), fue introducida al programa MethPrimer (Li & Dahiya, 2002) mostrándose las imágenes obtenidas en la Figura 7.

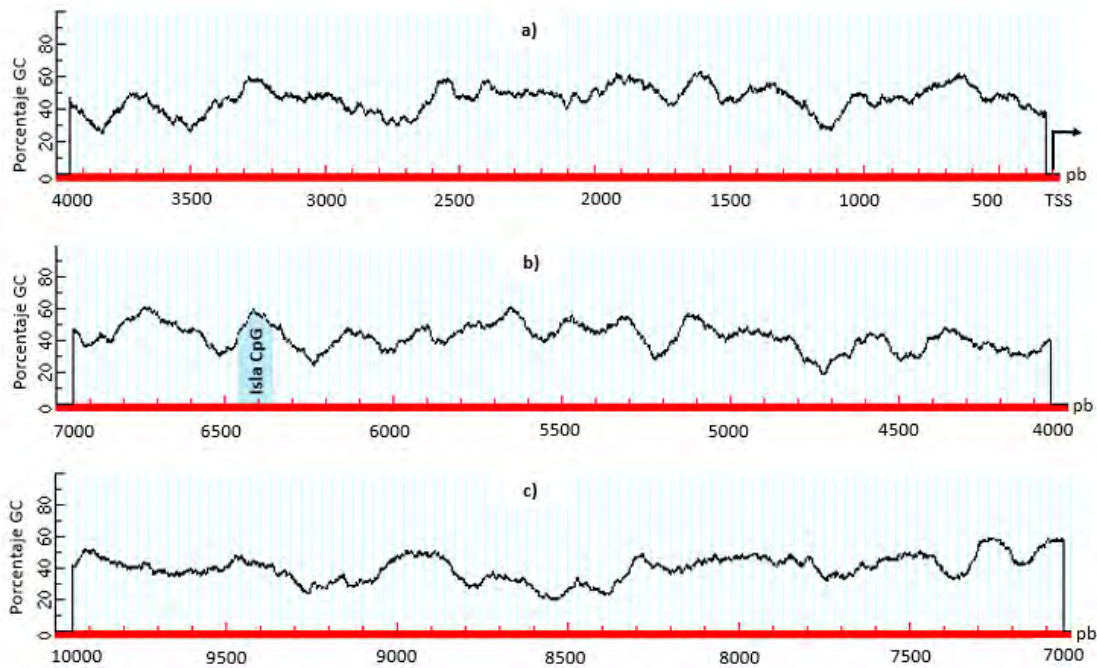


Figura 7.- Región promotora del gen de *IL24* analizada con el software MethPrimer (Li, 2002) **a)** Región del sitio de Inicio de Transcripción (TSS) a -4,000 pb **b)** Región de -4,000 a -7,000 pb con iCpG de 100 pb a -6458 **c)** Región de -7,000 a -10,000 pb

7.2 Datos clínico demográficos

En la Tabla 6 se muestran las características demográficas de la población estudiada separada en los tres grupos de estudio. Se llevó a cabo el análisis estadístico con la prueba ANOVA (análisis de una variable continua entre los tres grupos), la prueba t de Student y la prueba post hoc de Bonferroni (análisis de una variable continua entre dos grupos) así como la χ^2 (análisis de una variable categórica entre dos grupos) tal como se describe en el apartado de Análisis Estadístico.

Tabla 6.- Características demográficas de la población estudiada

Variables	EAC (n = 69)	AS (n = 75)	Controles (n = 26)	P ^a
Edad (años)	56 ± 7 ^s	62 ± 7 ^{p, c}	51 ± 13 ^s	<0.0001*
Sexo (% hombres)	89.71	58.67	26.92	<0.0001**
Índice de masa corporal (kg/m ²)	28.64 ± 3.94 ^c	29.28 ± 3.89 ^c	24 ± 5.74 ^{p, s}	<0.0001*
Circunferencia de cintura (cm)	99.04 ± 9.81 ^c	97.22 ± 9.86 ^c	85.58 ± 9.21 ^{p, s}	<0.0001*
Obesidad (%)	33.82	41.33	0	<0.0001**
Fumadores (%)	14.71	16.00	11.54	<0.0001**
Hipertensión (%)	66.18	46.67	0	<0.001**

Los datos están expresados como media ± desviación estándar o porcentaje

P^a valores de p calculados, entre los tres grupos, con la prueba ANOVA para las variables continuas y prueba de χ^2 para variables categóricas

** La prueba ANOVA (p<0.05), las pruebas post hoc de Bonferroni y t de Student (p<0.0167) para los tres grupos son estadísticamente significativo entre los tres grupos

* La prueba ANOVA fue estadísticamente significativa (<0.05)

^p empleando la prueba post hoc de Bonferroni y la prueba t de Student el dato presenta una diferencia estadísticamente significativa (<0.0167) con respecto al grupo pacientes

^s empleando la prueba post hoc de Bonferroni y la prueba t de Student el dato presenta una diferencia estadísticamente significativa (<0.0167) con respecto al grupo subclínicos

^c empleando la prueba post hoc de Bonferroni y la prueba t de Student el dato presenta una diferencia estadísticamente significativa (<0.0167) con respecto al grupo controles

A partir de la Tabla 6 podemos observar que entre los tres grupos estudiados (EAC, AS y Controles) al menos uno de ellos presentó una diferencia con otro en todas las variables analizadas. Adicionalmente, se identificó que hubo diferencia entre todos los grupos en los parámetros de sexo, obesidad, fumar y presentar hipertensión.

Se observó que hubo diferencia entre el grupo de controles con el grupo EAC y AS para las variables de índice de masa corporal y circunferencia de cintura. Dichas variables mostraron un comportamiento similar en el grupo con EAC y el grupo con AS. Para la variable de edad se observó diferencia entre el grupo con AS contra los grupos control y el grupo con EAC pero estos últimos dos presentaron comportamiento similar (Tabla 6).

En la Tabla 7 se muestran las comparaciones de parámetros bioquímicos medidos en la población de estudio. Se llevó a cabo el análisis estadístico con la prueba ANOVA (análisis de una variable continua entre los tres grupos), la prueba t de Student y la prueba post hoc de Bonferroni (análisis de una variable continua entre dos grupos) así como la χ^2 (análisis de una variable categórica entre dos grupos) tal como se describe en el apartado de Análisis Estadístico.

Tabla 7.- Comparación de parámetros bioquímicos en la población de estudio

Variables	EAC (n = 69)	AS (n = 75)	Controles (n = 26)	P ^a
Colesterol Total (mg/dL)	159.2 [129.8-176.3] ^{s,c}	196.5 [168.5-220.2] ^p	195 [163.7-223.15] ^p	<0.0001*
Triglicéridos (mg/dL)	159.1 [123.1-217] ^c	149 [117.7-209] ^c	90 [77-106] ^{p, s}	<0.0001*
Hipertrigliceridemia (%)	60.29	48.00	0.00	<0.013**
HDL (mg/dL)	37.08 ± 8.38	45.58 ± 14.58	61.52 ± 19.05	<0.0001**
LDL (mg/dL)	87.1 [66.9-110] ^{s,c}	115 [99.6-146.44] ^p	121.88 [89.7-127.5] ^p	0.007*
LDL > 100 mg/dL (%)	14.71	40.00	19.23	<0.017**

apoA (mg/dL)	114.3 [96.1-132.8]	130.7 [113.1-153.7]	159.6 [134.2-190.8]	<0.0001**
apoB (mg/dL)	70 [58-95] ^s	96 [80-115] ^{p,c}	80 [54.5-97] ^s	0.0001*
Lipoproteína A (mg/dL)	3.83 [2.37-14.6]	5.09 [2.72-13.75]	10 [2.34-21.38]	0.88
Adiponectina	5.7 [3-9.08] ^{s,c}	8.85 [4.98-13.73] ^p	15.2 [8.25-19.25] ^p	<0.0001*
Glucosa (mg/dL)	92 [85-108] ^c	95 [87-106] ^c	86 [80.5-90.5] ^{p,s}	0.028*
HOMA-IR	4.93 [3.37-6.52] ^c	4.68 [3.03-7.63] ^c	2.19 [3.37-6.52] ^{p,s}	0.0003*
Síndrome Metabólico (%)	52.94	50.67	0.00	<0.0001**
Diabéticos (%)	30.88 ^c	25.33 ^c	0.00 ^{p,s}	0.006*
Ácido úrico (mg/dL)	6.62 ± 1.65 ^{s,c}	5.75 ± 1.44 ^p	4.89 ± 1.88 ^p	<0.0006*

Los datos están expresados como media ± desviación estándar o porcentaje o mediana con intervalo intercuartílico

P^a valores de p calculados, entre los tres grupos, con la prueba ANOVA para las variables continuas y prueba de χ^2 para variables categóricas

** La prueba ANOVA (p<0.05), las pruebas post hoc de Bonferroni y t de Student (p<0.0167) para los tres grupos son estadísticamente significativo entre los tres grupos

* La prueba ANOVA fue estadísticamente significativa (<0.05)

^p empleando la prueba post hoc de Bonferroni y la prueba t de Student el dato presenta una diferencia estadísticamente significativa (<0.0167) con respecto al grupo pacientes

^s empleando la prueba post hoc de Bonferroni y la prueba t de Student el dato presenta una diferencia estadísticamente significativa (<0.0167) con respecto al grupo subclínicos

^c empleando la prueba post hoc de Bonferroni y la prueba t de Student el dato presenta una diferencia estadísticamente significativa (<0.0167) con respecto al grupo controles

A partir de la Tabla 7 podemos observar que entre los tres grupos estudiados (EAC, AS y Controles) al menos uno de ellos presentó una diferencia con otro en todas las variables analizadas excepto en los niveles de lipoproteína A. Adicionalmente, se identificó que hubo diferencia entre todos los grupos en las mediciones de HDL, niveles de apoA y los parámetros de presentar hipertrigliceridemia, tener un nivel de LDL>100 mg/dL y presentar síndrome metabólico.

Se observó que hubo diferencia entre el grupo de controles con el grupo EAC y AS para las variables de nivel de triglicéridos, niveles de glucosa, HOMA-IR y la presencia de diabetes. Dichas variables mostraron un comportamiento similar en el grupo con EAC

y el grupo con AS. Para los niveles de ApoB se observaron diferencias entre el grupo con AS contra los grupos control y el grupo con EAC pero estos últimos dos presentaron comportamiento similar (Tabla 7).

Finalmente, se observó que hubo diferencia del grupo con EAC contra los grupos con AS y el grupo control en lo que concierne a los niveles de colesterol total, niveles de LDL, niveles de adiponectina y niveles de ácido úrico en sangre (Tabla 6).

7.3 Estados de metilación

Para determinar los estados de metilación en las muestras analizadas se realizaron los procesos de modificación de ADN con bisulfito sódico, amplificación por MSP y electroforesis acorde a lo especificado en el apartado de Estrategia Experimental. A continuación se muestra un gel demostrativo correspondiente a ocho muestras del grupo con AS.

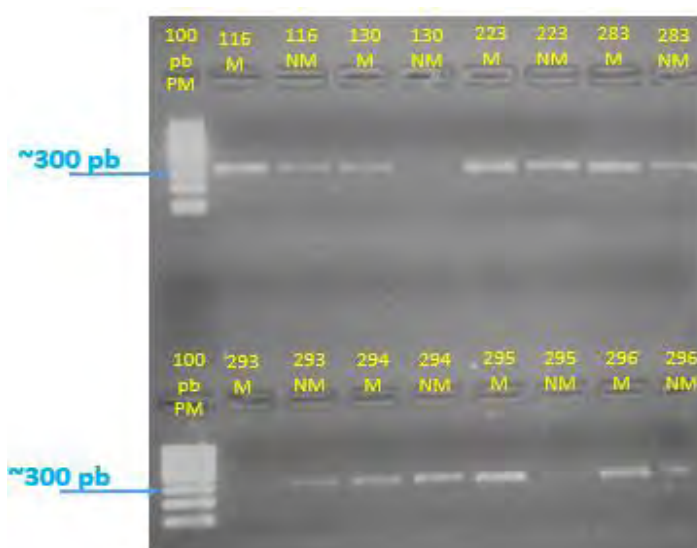


Figura 8.- Gel representativo del grupo AS.

En la figura 8 se presenta el número de muestra encima de cada carril seguido por la abreviatura para la reacción metilada (M) o la abreviación para la reacción no metilada (NM). Se observa un carril con marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb PM).

Para la interpretación de los estados de metilación del gel de electroforesis resultante se consideró que la muestra analizada presenta un estado metilado si se observaba un amplicón cercano a 300 pb en el carril para la reacción M o un amplicón del mismo peso en los dos carriles (M y NM). Si se observa un amplicón cercano a 300 pb exclusivamente en el carril para la reacción NM se considera que la muestra presenta un estado no metilado. En la Figura 8 se observa que las muestras 116, 130, 223, 283, 294, 295 y 296 presentan un estado metilado, mientras que la muestra 293 presenta un estado no metilado. Los gels pertenecientes al resto de muestras analizadas se presentan en la sección de Anexos. Partiendo de este análisis de los gels se reporta en la Tabla 8 los resultados de frecuencias de metilación observados.

Tabla 8.- Comparación de frecuencias de metilación entre grupos de estudio

Grupos	Metilado n (%)	No metilado n (%)	P ^a
EAC ^s	68 (100%)	0 (0%)	0.0291*
AS ^c	69 (92%)	6 (8%)	>0.05
Controles ^p	24 (92%)	2 (8%)	>0.05

P^a valores de p calculados con la prueba exacta de Fisher

*La prueba exacta de Fisher fue estadísticamente significativa (<0.05)

^p comparado contra el grupo de pacientes diagnosticados con EAC

^s comparado contra el grupo de individuos con aterosclerosis subclínica (AS)

^c comparado contra el grupo de controles

Se observó una distribución similar en la frecuencia de metilación en los tres grupos del estudio y al realizarse el análisis estadístico se observa que hay diferencia significativa entre las frecuencias de metilación del grupo de pacientes diagnosticados con EAC y el grupo de individuos con aterosclerosis subclínica.

7.4 Asociación con factores de riesgo en grupo con AS

Considerando que solamente en el grupo de aterosclerosis subclínica (AS) hubo presencia de ambos patrones de metilación y que dicho grupo mostró diferencia significativa en la frecuencia de sus patrones de metilación al compararlo con el grupo de pacientes con EAC, se procedió a hacer un análisis estadístico para determinar si existe alguna asociación del patrón de metilación con las características demográficas (Tabla 9) y parámetros bioquímicos (Tabla 10).

Tabla 9.- Comparación de características demográficas en grupo AS

Variables	Metilado (n = 69)	No metilado (n = 6)	P ^a
Edad (años)	62 ± 6	62 ± 12	0.7596
Sexo (% hombres)	56.52	83.33	0.2
Índice de masa corporal (kg/m ²)	28.98 ± 3.73	32.73 ± 4.4	0.0891
Circunferencia de cintura (cm)	96.49 ± 9.33	105.6 ± 12.79	0.1488
Obesidad (%)	39.13	66.66	0.1889
Fumadores (%)	15.94	16.66	0.9629
Hipertensión (%)	46.37	50	0.8645

Los datos están expresados como media ± desviación estándar o porcentaje

P^a valores de p calculados con la prueba t de Student para las variables continuas y prueba de χ^2 para variables categóricas

* La prueba t de Student o χ^2 ($p < 0.05$) es estadísticamente significativa entre los grupos

A partir de la Tabla 9 podemos observar que al comparar entre los dos estados de metilación dentro del grupo con AS no hubo diferencia estadísticamente significativa en las variables analizadas. La variable más cercana al punto de corte estadístico es el índice de masa corporal ($p = 0.0891$).

Tabla 10.- Comparación de parámetros bioquímicos en grupo AS

Variables	Metilado (n = 69)	No metilado (n = 6)	P ^a
Colesterol Total (mg/dL)	196.5 [165.55-1220.3]	200.45 [167.88-224]	0.9742
Triglicéridos (mg/dL)	145.8 [117.35—204.85]	211.9 [152.83-277.3]	0.3548
Hipertrigliceridemia (%)	44.92	83.33	0.0709
HDL (mg/dL)	45.45 ± 13.62	47.1 ± 24.85	0.8787
LDL (mg/dL)	118.4 [99.19-146.31]	107.72 [90.7-154.53]	0.7308
LDL > 100 mg/dL (%)	40.57	33.33	0.7281
apoA (mg/dL)	130.8 [114.6-154.3]	114 [99.18-151.7]	0.4751
apoB (mg/dL)	95 [80.5-120]	102 [60-109]	0.4518
Lipoproteína A (mg/dL)	4.66 [2.73-13.7]	5.48 [2.67-17.4]	0.4593
Adiponectina	8.9 [5.6-14.9]	4.7 [3.15-12.45]	0.1313
Glucosa (mg/dL)	95 [87-107]	90 [86.3-118]	0.5511
HOMA-IR	4.68 [2.95-7.19]	4.21 [2.71-10.86]	0.7961
Síndrome Metabólico (%)	50.72	50	0.9728
Diabéticos (%)	24.63	33.33	0.6385
Ácido úrico (mg/dL)	5.83 ± 1.43	5.47 ± 1.52	0.6475

Los datos están expresados como media ± desviación estándar o porcentaje

P^a valores de p calculados con la prueba t de Student para las variables continuas y prueba de χ^2 para variables categóricas

* La prueba t de Student o χ^2 ($p < 0.05$) es estadísticamente significativa entre los grupo

A partir de la Tabla 10 podemos observar que al comparar entre los dos estados de metilación dentro del grupo con AS no hubo diferencia estadísticamente significativa en las variables analizadas. La variable más cercana al punto de corte estadístico es la presencia de hipertrigliceridemia ($p = 0.0709$).

8. Discusión

Para este trabajo, se consideraron tres grupos de estudio: individuos con EAC, individuos con AS y un grupo control. Para lograr esta estratificación se emplearon mediciones del calcio arterial coronario en conjunto con una amplia historia clínica para determinar que los individuos del grupo subclínico no hubieran presentado algún evento cardiovascular (López et al., 2017). Previo a este estudio no se había explorado la existencia de un patrón diferencial de metilación en la región promotora del gen de *IL24* asociada con el inicio o progresión de la EAC.

Se realizaron las comparaciones necesarias, detalladas en las Tablas 6 y 7, para determinar las diferencias existentes entre los grupos para las variables analizadas; siendo posible identificar varios puntos de interés. En primer lugar, se observó un comportamiento similar de factores de riesgo cardiovascular, ya identificados en la literatura, con la progresión de la enfermedad; estos son la predisposición masculina a presentar EAC (Laaksonen et al., 2004; Vague, 1956), obesidad (García et al., 2014; Rocha & Libby, 2009; Weisberg et al., 2003), fumar, ser hipertensos, hipertrigliceridemia, bajos niveles de HDL, niveles de LDL > 100 mg/dL, apolipoproteína A (Ingelsson et al., 2007; Mcqueen et al., 2008; Yusuf et al., 2004) y síndrome metabólico (Lakka et al., 2002; Mottillo et al., 2010; Schram & Stehouwer, 2005; Wilson et al., 2005). Adicionalmente, al comparar las variables que fueron diferentes para los tres grupos del presente estudio (HDL y apoA) con otros reportes, con diseño similar y anidados al proyecto GEA, se identificó que las mismas variables presentaban diferencia entre tres grupos de estudio (controles, AS y EAC) (Vargas et al., 2014; Villarreal et al., 2012). El haber observado diferencias entre los grupos de estudio denota la efectividad de la estratificación empleada en este trabajo para distinguir entre la entidad de aterosclerosis subclínica y EAC.

A pesar de esto, hubo seis variables (IMC, circunferencia de cintura, nivel de triglicéridos, nivel de glucosa, HOMA-IR y presencia de diabetes) donde no se hallaron diferencias entre individuos con AS y EAC (Tabla 6 y 7). Por su parte, las mismas variables si mostraron ser diferentes en aquellos reportes anidados al proyecto GEA que compararon entre tres grupos de estudio (Vargas et al., 2014; Villarreal et al., 2012). Adicionalmente, estas variables han sido ampliamente asociadas con la presencia de AS (Angeles et al., 2017; Posadas et al., 2017) o EAC (Angeles et al., 2015; López et al., 2017; López et al., 2014; Posadas et al., 2017; Posadas et al., 2017; Vargas et al., 2015) en otros trabajos anidados al grupo GEA.

Aunado a esto, la semejanza en las seis variables mencionadas destaca la existencia de alteraciones similares del metabolismo energético tanto en el grupo de individuos con AS y EAC; siendo de particular interés el hecho que estas variables son factores de riesgo cardiovascular claramente identificados y que en el caso de los individuos con AS no se haya presentado algún evento cardiovascular agudo. Esto impacta en el presente estudio al plantear la posibilidad que este conjunto particular de variables no sean las causantes de un evento cardiovascular. Sin duda, la alteración de las seis variables debe impactar en otras moléculas del metabolismo que de manera conjunta desencadenan un evento cardiovascular pero con las variables y datos mostrados (Tablas 6 y 7) no se puede elucidar algún grupo de variables que sean determinantes para ocasionar un evento cardiovascular o nuevos factores de riesgo asociados con la progresión de la enfermedad. Inclusive, se pueden plantear acercamientos desde una perspectiva de expresión génica dirigida a genes de metabolismo energético para observar su cambio a lo largo de la progresión de la enfermedad para complementar las presentes asociaciones y no asociaciones epigenéticas observadas en el presente estudio. Con esto en mente, el no hallar diferencias en las seis variables mencionadas sugiere llevar a cabo un ajuste metodológico en futuros ensayos considerando la inclusión de factores de riesgo y variables metabólicas adicionales para observar más detalladamente que variables presentan mayor impacto o alteración en la progresión

de la EAC así como plantear más preguntas de investigación relacionadas a la identificación de variables y otros mecanismos que tengan alto impacto en las manifestaciones clínicas de la EAC.

Por último, se presentó una asociación de los individuos con EAC con niveles bajos de colesterol total, niveles bajos de LDL, niveles bajos de adiponectina y niveles altos de ácido úrico. Estos resultados concuerdan con reportes existentes donde los niveles bajos de colesterol total y LDLs han sido asociados con riesgo de presentar EAC (Ingelsson et al., 2007; Mcqueen et al., 2008; Yusuf et al., 2004); estudios internacionales donde se observan niveles elevados de uricemia en EAC (Borghi et al., 2015; Desideri, Viridis, Casiglia, & Borghi, 2018; Kim et al., 2010), un estudio nacional donde se vincula hiperuricemia con hígado graso empleando la cohorte GEA (Martínez et al., 2014) y un estudio en pacientes mexicanos donde se presentan bajos niveles de adiponectina en pacientes determinados por medición del grosor de las capas íntima-media en la arteria carótida (Juárez et al., 2017). Básicamente, se puede observar que los grupos mostrados en la Tabla 6 y Tabla 7 son independientes entre sí y su comportamiento es el esperado al concordar con reportes previos.

Con los datos analizados se observó que el patrón de metilación en la región estudiada fue similar entre los tres grupos analizados. En el presente estudio, se analizó el estado de metilación de una región de 100 pb en una iCpG ubicada en un intervalo de 6,359 a 6,458 pb río arriba del sitio de transcripción del gen de *IL24*. De manera inicial, las frecuencias de metilación observadas (Tabla 8) mostraron una distribución aparentemente similar entre los tres grupos observándose que la iCpG se hallaba metilada en el 92% controles, 92% de individuos del grupo AS y 100% de los individuos del grupo con EAC (Tabla 8). En otros estudios de metilación enfocados a genes con impacto sobre procesos ateroscleróticos de la EAC y, que al igual que este estudio, emplearon material genético proveniente de células mononucleares de sangre periférica en conjunto con la técnica de MSP, se observaron los siguientes porcentajes:

a) en una población compuesta por el grupo étnico chino Han se observó que el gen *ABCG1*, involucrado en el transporte de colesterol, contaba con 90.5% de sus pacientes metilados y el 29.6% de sus controles estaban metilados (Peng et al., 2014) b) un estudio con individuos de la india se estudió la superóxido dismutasa extracelular, involucrada en el ambiente de estrés oxidativo, mostro que el 62% de sus pacientes presentaban metilación mientras que solo 32% de sus controles presentaban este estado de metilación (Lakshmi et al., 2013) y c) un tercer estudio con individuos rumanos mostró que solo 16% de jóvenes sanos presentaban metilación en el promotor del gen *ESR α* , asociado a disfunción endotelial, mientras que el 89% de sus pacientes presentaban la metilación, cabe destacar que este grupo de pacientes estaba constituido por individuos mayores de 57 años (Huica et al., 2011). Al comparar los resultados de la Tabla 8 con estos grupos que emplearon una metodología similar a la expuesta (MSP y sangre periférica) se puede observar que hay mayor número de individuos diagnosticados con EAC que presentan metilación promotora en genes relacionados con el desarrollo de la EAC. En sí, estas similitudes indican la existencia de un patrón de metilación compartido, regulado por mecanismos desconocidos, entre algunos genes involucrados en la progresión de la patología considerando que estos genes estudiados participan en el proceso inflamatorio de la EAC.

Al realizar el análisis estadístico comparando las frecuencias entre los grupos de estudio (Tabla 8) fue posible observar una diferencia significativa en la frecuencia de metilación entre el grupo con EAC y el grupo con AS. Esta diferencia denota que si hay cierto grado de diferencia en el patrón de metilación de la iCpG en el promotor del gen de *IL-24* dentro de individuos con AS, particularmente aquellos que presentan un estado exclusivamente no metilado. Esto conlleva a la posible existencia de un cambio regulatorio derivado de la falta de metilación que pudiera impactar en las variables estudiadas. Esto acoplado a que la AS es una entidad en la cual no se han presentado eventos cardiovasculares agudos, que presenta calcio arterial coronario y otras alteraciones metabólicas, da pauta para llevar a cabo un análisis comparando los

patrones de metilación con las variables analizadas. Al comparar las variables demográficas (Tabla 9) y parámetros bioquímicos (Tabla 10) entre los dos estados de metilación presentes en el grupo con AS no fue posible identificar alguna variable que presente asociación con algún estado de metilación. Sin embargo, se presentaron dos variables cercanas al punto de corte estadístico: el IMC y la presencia de hipertrigliceridemia. Los individuos no metilados presentan un ligero aumento en ambas variables en comparación con los individuos con la región del promotor metilada.

Existen reportes de la cohorte Multiétnica para el Estudio de la Aterosclerosis (MESA), compuesta por cuatro etnias (caucásica, china, hispánica y afroamericana) con AS diagnosticada por medición del grosor de la íntima media, donde se ha observado una asociación entre altos niveles de moléculas lipídicas con la presencia de calcio arterial coronario particularmente bajos niveles de HDL, hiperlipidemia e hipercolesterolemia (Abd almir et al., 2018; Paramsothy et al., 2010). Dentro de estos trabajos, se destacó que por sí sola la hipertrigliceridemia no es un marcador específico asociado a la presencia de CAC u otro factor de riesgo patogénico para la AS. Sin embargo, el grupo de Paramsothy (2010) observó que la hipertrigliceridemia puede ser un marcador para otros factores de riesgo de presentar una ECV como el alcoholismo o tabaquismo. Otro estudio que empleó la misma cohorte MESA identificó que la presencia de CAC está asociada con algunos niveles de marcadores inflamatorios como IL-6, PCR y fibrinógeno (Jenny et al., 2010),

Adicionalmente, en población de los Países Bajos se realizó un diagnóstico de AS mediante el uso de electrocardiogramas donde se observaron que los individuos con AS presentaban mediciones elevadas en parámetros relacionados a grasa corporal particularmente en índice de masa corporal, circunferencia de cintura y tejido adiposo visceral entre otros (Elffers et al., 2018). También, en otro estudio transversal se empleó una cohorte con Individuos sin historia cardiovascular de Europa y Asia donde se identificó una asociación de la presencia simultánea de circunferencia de cintura

elevada y triglicéridos elevados (denominado como el fenotipo de cintura hipertriglicéridémica) con la presencia de AS (Gasevic et al, 2014). La presencia del fenotipo de cintura hipertriglicéridémica mostró una asociación de riesgo para presentar EAC en individuos con niveles normales de glucosa en sangre y en individuos con resistencia a la insulina, destacándose el uso del fenotipo como marcador para la identificación de AS. Considerando estos estudios, se puede observar que la entidad de la AS presenta una gran variabilidad de mediciones entorno a moléculas del metabolismo energético lo cual complica la identificación de variables causantes de un evento cardiovascular. A pesar de esto, el presente estudio concuerda con estas fuentes en cuanto al comportamiento metabólico del grupo AS y se destaca la posibilidad de observarse una relación entre la no metilación de la iCpG en el promotor de IL-24 con las variables de hipertriglicéridemia e índice de masa corporal que han sido ampliamente asociadas a la entidad de AS.

Desde una perspectiva enfocada a la metilación existen reportes donde se observa una relación entre niveles de metilación de ADN proveniente de sangre periférica con el índice de masa corporal e hipertriglicéridemia. En un estudio con una cohorte Australiana orientada al estudio de enfermedades crónicas comunes se logró identificar la asociación de aproximadamente 310 sitios CpG con el parámetro de IMC; dentro de estos sitios hubo 34 que de manera consistente con el paso del tiempo presentaban cambios en su porcentaje de metilación a la par de cambios en el índice de masa corporal (Geurts et al., 2018). Adicionalmente, este estudio observó que los individuos con mayor IMC presentaban mayor grado de metilación y el 71% de las CpG consistentes presentaban tendencias hacia un estado de baja metilación en individuos de peso elevado (Geurts et al., 2018). Cabe destacar, que varios de los sitios CpG identificados se localizan cerca o dentro de genes relacionados con procesos de transportadores mediados por ATP, señalización de TNF, resistencia a la insulina y metabolismo lipídico (Geurts et al., 2018).

Otro estudio empleo una cohorte caucásica, con síndrome metabólico y obesidad, de origen canadiense analizó 13 sitios CpG en el locus del gen *ARPC3* relacionado con la adipogénesis y acumulación de lípidos (De Toro-Martín et al., 2016). Hubo 7 sitios CpG que se encontraron en la región promotora de dicho gen pero hubo un sitio donde se identificó la presencia del polimorfismo rs3759384 que representa un cambio de citosina a timina (De Toro-Martín et al., 2016). Se determinó una asociación de este SNP con niveles elevados de triglicéridos y se observó que la presencia del alelo T promovía una baja tasa de metilación en el sitio CpG. Esto ocasionaba alteraciones en un factor de transcripción del gen *ARPC3* generando cambios en la tasa de expresión (De Toro-Martín et al., 2016).

Los estudios mencionados, ejemplifican como la metilación de uno o varios sitios CpG puede tener una asociación con parámetros clínicos como lo es el IMC o variables bioquímicas como los niveles de triglicéridos, entre otras moléculas. Esto plantea la posibilidad de que la iCpG estudiada pueda presentar una asociación con parámetros clínicos si se cuenta con una mayor cantidad de individuos dentro del grupo AS o bien si se utiliza una metodología cuantitativa que permita medir con mayor especificidad y selectividad los sitios CpG individuales de la iCpG. Cabe destacar, que hay factores adicionales a la iCpG que pueden estar propiciando las alteraciones metabólicas por lo que con los datos obtenidos (Tablas 9 y 10) solo se da un acercamiento a un posible efecto del patrón de metilación sobre las variables cardiometabólicas. Por esto mismo es que hay que considerar que la metilación es solo un parámetro que afecta hasta cierto punto las alteraciones metabólicas pero se requiere de considerar otros aspectos desde condiciones ambientales adicionales hasta mecanismos biológicos distintos como alteraciones en la cromatina o alteración en la unión de factores de transcripción.

Con esto en mente, se buscó ahondar en el posible efecto biológico de la metilación en la iCpG analizada mediante análisis bioinformáticos empleando las bases de datos

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>) y la base UCSC Genome Browser de la Universidad de California (<https://genome.ucsc.edu>).

Se logró identificar dentro del amplicón generado, con longitud de 326 pb, varios sitios de unión de factores de transcripción correspondientes al factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF), el transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1), el factor potenciador específico de miocito 2A (MEF2A) y la proteína del retinoblastoma tipo 2 (RBL2). Por su parte el factor de transcripción MITF ha sido identificado como el principal regulador del desarrollo de melanocitos y juega un rol en la transcripción de genes asociados con la melanogénesis, proceso en el cual se ha visto que MITF está sobre expresado (Levy, Khaled, & Fisher, 2006), entidad en la que IL-24 fue descrita inicialmente.

El factor STAT1 es un transductor de señal que se activa en respuesta a la presencia de citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-6 y factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). En sí, STAT1 se transloca al núcleo donde funge como activador de la transcripción participando en la vía de las citocinas y tiene un rol en la diferenciación de células Th1 y Th2 (Lakota, 2016); productoras descritas de IL-24.

Como su nombre lo indica, MEF2A tiene un rol que ha sido evolutivamente conservado dentro del marco regulatorio de genes involucrados en el desarrollo cardíaco siendo esto comprobado a partir de análisis de delección del gen que dan pauta a un fenotipo de EAC autosómico dominante con alta posibilidad de infarto al miocardio (Desjardins & Naya, 2016). Por su parte RBL2 es un gen que tiene una función clave en la regulación del ciclo celular puesto que está involucrado directamente en el mantenimiento de la cromatina particularmente la heterocromatina constitutiva mediada por histonas metiladas que la estabilizan (Fiorentino, Symonds, MacAluso, & Giordano,

2009); siendo esto un mecanismo donde dos marcas epigenéticas participan para controlar la represión de la transcripción en lo que concierne al ciclo celular.

Considerando la ubicación de estos factores de transcripción se pueden plantear alternativas para analizar el efecto que puede tener la metilación de la iCpG sobre los procesos relacionados. Esto puede incluir analizar si la metilación en la iCpG tiene un impacto en niveles séricos de las citocinas directamente asociadas con IL-24. Aunado a esto, existe la posibilidad de que atracciones de factores al sitio metilado o alteraciones en la cromatina puedan ocasionar cambios en su efecto ya sea alterando la homeostasis de células cardíacas o una desregulación de la cromatina cercana lo cual afectaría mecanismos del ciclo celular pudiendo afectar moléculas con efecto directo en EAC como el endotelio vascular o monocitos (Libby et al., 2016).

Dado que todos estos factores tienen asociación con diversos procesos celulares; ya sea con la fuente celular de IL-24, el desarrollo de la inflamación de EAC y factores de riesgo cardiovasculares se pueden utilizar como genes adicionales en un análisis comparativo entre grupos. Uno de los beneficios de esto es que permitirá contar con genes que de estar regulados al alta en individuos subclínicos podrán servir como un panel de identificación molecular que en conjunto con la caracterización clínica hará más eficiente la generación de grupos subclínico en el contexto de ECVs. Aunado a esto, será posible realizar análisis de expresión orientados a estos genes en células específicas de la enfermedad lo cual al combinar con estudios de expresión o metilación de la región promotora de *IL24* permitirá conocer más a detalle la vía de señalización de IL-24 para llevar a cabo una vinculación más a fondo con patologías cardiovasculares. De igual manera, se podrán generar más preguntas de investigación con respecto a que sitios de transcripción de la región promotora pueden ser influenciados por el estado de metilación de IL-24 considerando la interacción que existe entre los factores ambientales.

A pesar de esto, el proyecto cuenta con varias áreas de oportunidad como lo es el contar con una cantidad comparablemente baja de individuos dentro del grupo control. También, al considerarse en los análisis estadísticos variables clásicas se pudo hacer un buen acercamiento inicial pero la limitante de esto es el contar con variables confusoras por lo que se necesitaría estandarizar los parámetros clásicos empleados e incluir variables de la dieta, por dar un ejemplo, que pueden promover el hallazgo de más asociaciones novedosas en el terreno de la IL-24. Aunado a esto, es pertinente el llevar a cabo replicas con más individuos para verificar el estado de metilación.

Otro aspecto a mejorar es utilizar un proceso metodológico más específico particularmente orientado a la muestra biológica. Esto se debe a que la identificación de factores influenciados por la metilación de la iCpG sea complicada dada la heterogeneidad celular en la sangre periférica por lo que es probable que se deba modificar el presente estudio mediante el uso de células purificadas productoras de IL-24 como los monocitos, melanocitos o linfocitos Th2. De esta forma, se podrá evitar caer en un sesgo producto del material biológico empleado y que el resultado se deba a que haya un porcentaje entre 0 y 99 por ciento de metilación. También, se puede llegar a emplear metodologías cuantitativas que permitan conocer de manera más específica el porcentaje de metilación.

9. Conclusión

El estudio de marcadores epigenéticos está emergiendo como una de las estrategias moleculares para la identificación del riesgo para enfermedades complejas, incluidas las ECV.

A diferencia de otros estudios epigenéticos, en este estudio se incorporaron sujetos con aterosclerosis subclínica para evaluar la progresión de la enfermedad entre un grupo control y un grupo claramente diagnosticado con EAC. Fue posible observar que la estratificación de la población por calcio arterial coronario y el comportamiento del grupo con aterosclerosis subclínica concuerdan con la información bibliográfica consultada.

Cabe destacar que nuestros resultados de metilación deben ser interpretados cuidadosamente puesto que solo se estudió un tipo de marcador epigenético (metilación del ADN). Se debe considerar que otros mecanismos epigenéticos están involucrados en la regulación de expresión génica afectando los niveles proteicos de la IL-24. Por último, se requieren de réplicas para verificar el comportamiento de las frecuencias de metilación obtenidas con el fin de que a largo plazo ampliar el número de muestras a estudiar para posiblemente identificar variables de riesgo asociadas al patrón de metilación en cada grupo de estudio o modificar la estrategia experimental empleada.

10. Bibliografía

- Abd almir, M., Goyfman, M., Chaus, A., Dabbous, F., Tamura, L., Sandfort, V., ... Budoff, M. (2018). The Correlation of Dyslipidemia with the Extent of Coronary Artery Disease in the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of Lipids*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/5607349>
- Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., ... Smith, S. C. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
- American Diabetes Association. (2009). Standards of medical care in diabetes-2009. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc09-S013>
- Andoh, A., Shioya, M., Nishida, A., Bamba, S., Tsujikawa, T., Kim-Mitsuyama, S., & Fujiyama, Y. (2009). Expression of IL-24, an Activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 Cascade, Is Enhanced in Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Immunology*, 183(1), 687–695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804169>
- Angeles-Martínez, J., Posadas-Sánchez, R., Álvarez-León, E., Villarreal-Molina, T., Cardoso-Saldaña, G., Fragoso, J. M., ... Vargas-Alarcón, G. (2015). Monocyte chemoattractant protein-1 gene (MCP-1) polymorphisms are associated with risk of premature coronary artery disease in Mexican patients from the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) study. *Immunology Letters*, 167(2), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.08.003>
- Angeles-Martínez, J., Posadas-Sánchez, R., Pérez-Hernández, N., Rodríguez-Pérez, J. M., Fragoso, J. M., Bravo-Flores, E., ... Vargas-Alarcón, G. (2017). IL-15 polymorphisms are associated with subclinical atherosclerosis and cardiovascular risk factors. The Genetics of Atherosclerosis Disease (GEA) Mexican Study. *Cytokine*, 99(September), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.09.006>
- Aziz, M., & Yadav, K. S. (2016). Pathogenesis of atherosclerosis. *Medical & Clinical Reviews*, 2(3), 1–6. <https://doi.org/10.21767/2471-299X.100031>
- Beisel, C., & Paro, R. (2011). Silencing chromatin: Comparing modes and mechanisms. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 123–135. <https://doi.org/10.1038/nrg2932>
- Berni Canani, R., Paparo, L., Nocerino, R., Cosenza, L., Pezzella, V., Di Costanzo, M., ... Salvatore, F. (2015). Differences in DNA methylation profile of Th1 and Th2 cytokine genes are associated with tolerance acquisition in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0070-8>

- Borghini, C., Rosei, E. A., Bardin, T., Dawson, J., Dominiczak, A., Kielstein, J. T., ... Mancina, G. (2015). Serum uric acid and the risk of cardiovascular and renal disease. *Journal of Hypertension*, 33(9), 1729–1741. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000701>
- Bot, I., Daissormont, I. T. M. N., Zerneck, A., van Puijvelde, G. H. M., Kramp, B., de Jager, S. C. A., ... Biessen, E. A. L. (2014). CXCR4 blockade induces atherosclerosis by affecting neutrophil function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 74, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.021>
- Branco, M. R., Ficuz, G., & Reik, W. (2012). Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nature Reviews Genetics*, 13(1), 7–13. <https://doi.org/10.1038/nrg3080>
- Buono, C., Come, C. E., Stavrakis, G., Maguire, G. F., Connelly, P. W., & Lichtman, A. H. (2003). Influence of interferon- γ on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 454–460. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000059419.11002.6E>
- Buzas, K., & Megyeri, K. (2006). Staphylococci induce the production of melanoma differentiation-associated protein-7/IL-24. *Acta Microbiol Immunol Hung*. <https://doi.org/10.1556/AMicr.53.2006.4.2>
- Caudell, E. G., Mumm, J. B., Poindexter, N., Ekmekcioglu, S., Mhashilkar, A. M., Yang, X. H., ... Grimm, E. A. (2002). The Protein Product of the Tumor Suppressor Gene, Melanoma Differentiation-Associated Gene 7, Exhibits Immunostimulatory Activity and Is Designated IL-24. *The Journal of Immunology*, 168(12), 6041–6046. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6041>
- Chen, T., & Li, E. (2004). Structure and Function of Eukaryotic DNA Methyltransferases. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 60, pp. 55–89). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)60003-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)60003-2)
- Chen, W. Y., Cheng, B. C., Jiang, M. J., Hsieh, M. Y., & Chang, M. S. (2006). IL-20 is expressed in atherosclerosis plaques and promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000232502.88144.6f>
- Cruz, A., Nguyen, B., Sauane, M., & Lopez, G. E. (2016). Structural and Functional Characterization of Interleukin-24 based on Atomistic Molecular Modeling. *Chemistry Letters*, 45(3), 327–329. <https://doi.org/10.1246/cl.151028>
- Davenport, P., & Tipping, P. G. (2003). The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Pathology*, 163(3), 1117–1125. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63471-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63471-2)
- De Toro-Martín, J., Guénard, F., Tchernof, A., Deshaies, Y., Pérusse, L., Biron, S., ...

- Vohl, M. C. (2016). A CpG-SNP Located within the ARPC3 Gene Promoter is Associated with Hypertriglyceridemia in Severely Obese Patients. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 68(3), 203–212. <https://doi.org/10.1159/000445358>
- Deaton, A., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010–1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511.1010>
- Deichmann, U. (2016). Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Developmental Biology*, 416(1), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.005>
- Desideri, G., Viridis, A., Casiglia, E., & Borghi, C. (2018). Exploration into Uric and Cardiovascular Disease: Uric Acid Right for heArt Health (URRAH) Project, A Study Protocol for a Retrospective Observational Study. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*. <https://doi.org/10.1007/s40292-018-0250-7>
- Desjardins, C., & Naya, F. (2016). The Function of the MEF2 Family of Transcription Factors in Cardiac Development, Cardiogenomics, and Direct Reprogramming. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 3(3), 26. <https://doi.org/10.3390/jcdd3030026>
- Douglas, G., & Channon, K. M. (2014). The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine (United Kingdom)*, 42(9), 480–484. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.06.011>
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., Mccune, R. A., & Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/10.8.2709>
- Elfers, T. W., Trompet, S., de Mutsert, R., Maan, A. C., Lamb, H. J., Macfarlane, P. W., ... Jukema, J. W. (2018). Borderline Q-waves in individuals without overt cardiovascular disease: Relations with adiposity, subclinical atherosclerosis and vascular stiffness. *International Journal of Cardiology*, (xxxx), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.08.088>
- Eltzschig, H. K., & Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*, 17(11), 1391–1401. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39(2), 175–191. <https://doi.org/10.3758/BF03193146>
- Felsenfeld, G., & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448–453. <https://doi.org/10.1038/nature01411>
- Fiorentino, F. P., Symonds, C. E., MacAluso, M., & Giordano, A. (2009). Senescence and p130/Rb12: A new beginning to the end. *Cell Research*, 19(9), 1044–1051. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.96>

- García-Cardona, M. C., Huang, F., García-Vivas, J. M., López-Camarillo, C., del Río Navarro, B. E., Navarro Olivos, E., ... Marchat, L. A. (2014). DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin resistance. *International Journal of Obesity*, 38(11), 1457–1465. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.30>
- García-Moll, X., Kaski, J. (2000). Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Revista Cubana de Medicina*, 39(2).
- García, R., Ayala, P., & Perdomo, P. (2012). Epigenetics: definition, molecular bases and implications in human health and evolution. *Revista Ciencias de La Salud*, 10(1), 59–71. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/recis/v10n1/v10n1a06.pdf>
- Gasevic, D., Carlsson, A. C., Lesser, I. A., Mancini, G. B. J., & Lear, S. A. (2014). The association between «hypertriglyceridemic waist» and sub-clinical atherosclerosis in a multiethnic population: A cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-38>
- Geurts, Y. M., Dugué, P. A., Joo, J. E., Makalic, E., Jung, C. H., Guan, W., ... Milne, R. L. (2018). Novel associations between blood DNA methylation and body mass index in middle-Aged and older adults. *International Journal of Obesity*, 42(4), 887–896. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.269>
- Golbabapour, S., Abdulla, M. A., & Hajrezaei, M. (2011). *A concise review on epigenetic regulation: Insight into molecular mechanisms. International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3390/ijms12128661>
- Gómez-Uriz, A. M., Goyenechea, E., Campión, J., De Arce, A., Martínez, M. T., Puchau, B., ... Lopez De Munain, A. (2014). Epigenetic patterns of two gene promoters (TNF- α and PON) in stroke considering obesity condition and dietary intake. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 70(2), 603–614. <https://doi.org/10.1007/s13105-014-0316-5>
- Greaves, D. R., & Gordon, S. (2001). Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *Trends Immunol*, 22(4), 180–181. [https://doi.org/S1471-4906\(00\)01848-2](https://doi.org/S1471-4906(00)01848-2) [pii]
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., & Almouzni, G. (2007). Chromatin Challenges during DNA Replication and Repair. *Cell*, 128(4), 721–733. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.030>
- Hai, Z., & Zuo, W. (2016). Aberrant DNA methylation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 456, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.02.026>
- Hamidi, T., Singh, A. K., & Chen, T. (2015). Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics*, 7(2), 247–265.

<https://doi.org/10.2217/epi.14.80>

- Hansson, G. (2005). Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *The New England Journal of Medicine*, 352, 1685–1695. <https://doi.org/10.1056/NEJM200507283530425>
- Hartman, J., & Frishman, W. H. (2014). Inflammation and Atherosclerosis. *Cardiology in Review*, 22(3), 147–151. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000021>
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9821–9826. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821>
- Hirase, T., Hara, H., Miyazaki, Y., Ide, N., Nishimoto-Hazuku, A., Fujimoto, H., ... Node, K. (2013). Interleukin 27 inhibits atherosclerosis via immunoregulation of macrophages in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 305, H420-9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00198.2013>
- Huang, E. Y., Madireddi, M. T., Gopalkrishnan, R. V., Leszczyniecka, M., Su, Z. Z., Lebedeva, I. V., ... Fisher, P. B. (2001). Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties. *Oncogene*, 20(48), 7051–7063. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204897>
- Huica, I., Botezatu, A., Iancu, I. V., Lupeanu, E., Anton, M., Rusanu, C. D. G., & Anton, G. (2011). Genetic and epigenetic aspects in cardio-vascular disease and ageing. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(5), 6488–6496. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.03.062>
- Hunter, B., Hollister, J. D., & Bomblies, K. (2012). Epigenetic inheritance: What news for evolution? *Current Biology*, 22(2), R54–R56. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.054>
- Illingworth, R. S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A. R. W., James, K. D., Turner, D. J., ... Bird, A. P. (2010). Orphan CpG Islands Identify Numerous Conserved Promoters in the Mammalian Genome. *PLoS Genetics*, 6(9), e1001134. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001134>
- Ingelsson, E., Schaefer, E. J., Contois, J. H., McNamara, J. R., Sullivan, L., Keyes, M. J., ... Vasan, R. S. (2007). Clinical Utility of Different Lipid Measures for Prediction of Coronary Heart Disease in Men and Women. *JAMA*. <https://doi.org/10.1001/jama.298.7.776>
- Jeltsch, A., & Jurkowska, R. Z. (2014). New concepts in DNA methylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(7), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.05.002>
- Jenny, N. S., Brown, E. R., Detrano, R., Folsom, A. R., Saad, M. F., Shea, S., ... Jacobs,

- D. R. (2010). Associations of inflammatory markers with coronary artery calcification: Results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 209(1), 226–229. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.037>
- Jia, L., Zhu, L., Wang, J. Z., Wang, X. J., Chen, J. Z., Song, L., ... Hui, R. (2013). Methylation of FOXP3 in regulatory T cells is related to the severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 228(2), 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.027>
- Jiang, H., Lin, J. J., Su, Z. Z., Goldstein, N. I., & Fisher, P. B. (1995). Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene*.
- Juárez-Rojas, J. G., Posadas-Sánchez, R., Martínez-Alvarado, M. del R., Torres-Tamayo, M., Jorge-Galarza, E., Mancilla-Valenzuela, E. Y., ... Medina-Urrutia, A. X. (2017). Association of Adiponectin with Subclinical Atherosclerosis in a Mexican-Mestizo Population. *Archives of Medical Research*, 48(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.01.003>
- Kang, H.-S. (2012). Differential gene expression profiles in spontaneously hypertensive rats induced by administration of enalapril and nifedipine. *International Journal of Molecular Medicine*, 179–187. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1183>
- Kim, S. Y., Guevara, J. P., Kim, K. M., Choi, H. K., Heitjan, D. F., & Albert, D. A. (2010). Hyperuricemia and coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care & Research*. <https://doi.org/10.1002/acr.20065>
- Kragstrup, T. W., Otkjaer, K., Holm, C., Jørgensen, A., Hokland, M., Iversen, L., & Deleuran, B. (2008). The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Cytokine*, 41(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.10.004>
- Kumar, A., & Cannon, C. P. (2009). Acute Coronary Syndromes: Diagnosis and Management, Part I, 84(October), 917–938.
- Kurschinski, D. T., Dennen, D. A., Garcia, M., & Scanu, A. M. (1989). Plasma lipoprotein(a) and the Friedewald formula. *Clinical Chemistry*.
- Kwon, N.-H., Kim, J.-S., Lee, J.-Y., Oh, M.-J., & Choi, D.-C. (2008). DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. *Journal of Clinical Immunology*, 28(2), 139–46. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9148-1>
- Laaksonen, D. E., Niskanen, L., Punnonen, K., Nyyssönen, K., Tuomainen, T. P., Valkonen, V. P., ... Salonen, J. T. (2004). Testosterone and Sex Hormone-Binding Globulin Predict the Metabolic Syndrome and Diabetes in Middle-Aged Men.

Diabetes Care. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.5.1036>

- Lakka, H.-M., Laaksonen, D. E., Lakka, T. a, Niskanen, L. K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., & Salonen, J. T. (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.288.21.2709>
- Lakota, J. (2016). Molecular mechanism of ischemia — Reperfusion injury after myocardial infarction and its possible targeted treatment. *International Journal of Cardiology*, 220, 571–572. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.309>
- Lakshmi, S. V. V., Naushad, S. M., Reddy, C. A., Saumya, K., Rao, D. S., Kotamraju, S., & Kutala, V. K. (2013). Oxidative stress in coronary artery disease: Epigenetic perspective. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 374(1–2), 203–211. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1520-7>
- Lee, K. M., Kang, H. S. H. A., Park, M., Lee, H. Y., Choi, H. R., Yun, C. H., ... Kang, H. S. H. A. (2012). Interleukin-24 attenuates ??-glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by inhibiting apoptosis, the expression of calcification and osteoblastic markers, and the Wnt/??-catenin pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 428(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.09.145>
- Levy, C., Khaled, M., & Fisher, D. E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.008>
- Li, L.-C., & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18(11), 1427–1431. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427>
- Libby, P. (2009). Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S352–S357. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800099-JLR200>
- Libby, P., Bornfeldt, K. E., & Tall, A. R. (2016). Atherosclerosis: Successes, Surprises, and Future Challenges. *Circulation Research*, 118(4), 531–534. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308334>
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317–325. <https://doi.org/10.1038/nature10146>
- López-Bautista, F., Posadas-Romero, C., Cardoso-Saldaña, G., Juárez-Rojas, J. G., Medina-Urrutia, A., Pérez-Hernández, N., ... Posadas-Sánchez, R. (2017). Deficiencia de vitamina D y su asociación con enfermedad arterial coronaria en población mexicana: estudio Genético de la Enfermedad Aterosclerosa. *Gaceta Medica de Mexico*, 153(5), 566–574. <https://doi.org/10.24875/GMM.17002930>

- López-Reyes, A., Rodríguez-Pérez, J. M., Fernández-Torres, J., Martínez-Rodríguez, N., Pérez-Hernández, N., Fuentes-Gómez, A. J., ... Vargas-Alarcón, G. (2014). The HIF1A rs2057482 polymorphism is associated with risk of developing premature coronary artery disease and with some metabolic and cardiovascular risk factors. The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican Study. *Experimental and Molecular Pathology*, 96(3), 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.04.010>
- Maarof, G., Bouchet-delbos, L., & Dalloul, A. (2010). Interleukin-24 inhibits the plasma cell differentiation program in human germinal center B cells. *Blood*, 115(9), 1718–1726. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-220251>.
- Maeshima, K., Hihara, S., & Eltsov, M. (2010). Chromatin structure: Does the 30-nm fibre exist in vivo? *Current Opinion in Cell Biology*, 22(3), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.03.001>
- Margueron, R., & Reinberg, D. (2010). Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature Reviews Genetics*, 11(4), 285–296. <https://doi.org/10.1038/nrg2752>
- Martínez-Alvarado, M. D. R., Juárez-Rojas, J. G., Medina-Urrutia, A. X., Cardoso-Saldaña, G. C., González-Salazar, M. D. C., Posadas-Sánchez, R., ... Posadas-Romero, C. (2014). Association of fatty liver with cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis in a Mexican population. *Revista de Investigacion Clinica; Organo Del Hospital de Enfermedades de La Nutricion*, 66(5), 407–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25695383>
- Mautner, G. C., Mautner, S. L., Froehlich, J., Feuerstein, I. M., Proschan, M. A., Roberts, W. C., & Doppman, J. L. (1994). Coronary artery calcification: assessment with electron beam CT and histomorphometric correlation. *Radiology*. <https://doi.org/10.1148/radiology.192.3.8058924>
- Mcqueen, M. J., Hawken, S., Wang, X., Ounpuu, S., Sniderman, A., Steyn, K., & Sanderson, J. E. (2008). Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study, 372.
- Mottillo, S., Filion, K. B., Genest, J., Joseph, L., Pilote, L., Poirier, P., ... Eisenberg, M. J. (2010). The metabolic syndrome and cardiovascular risk: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.05.034>
- Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., & Jyothy, A. (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *Journal of Genetics and Genomics*, 36(2), 75–88. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60094-6](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60094-6)
- Ogbera, A. O., & Azenabor, A. O. (2010). Hyperuricaemia and the metabolic syndrome in type 2 DM. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. <https://doi.org/10.1186/1758->

- Ordovás, J. M., & Smith, C. E. (2010). Epigenetics and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 7(9), 510–519. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.104>
- Paramsothy, P., Knopp, R. H., Bertoni, A. G., Blumenthal, R. S., Wasserman, B. A., Tsai, M. Y., ... Heckbert, S. R. (2010). Association of combinations of lipid parameters with carotid intima-media thickness and coronary artery calcium in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *Journal of the American College of Cardiology*, 56(13), 1034–1041. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.01.073>
- Peng, P., Wang, L., Yang, X., Huang, X., Ba, Y., Chen, X., ... Zhou, J. (2014). A preliminary study of the relationship between promoter methylation of the ABCG1, GALNT2 and HMGCR genes and coronary heart disease. *PLoS ONE*, 9(8), 8–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102265>
- Persaud, L., De Jesus, D., Brannigan, O., Richiez-Paredes, M., Huaman, J., Alvarado, G., ... Sauane, M. (2016). Mechanism of action and applications of interleukin 24 in immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060869>
- Poindexter, N. J., Williams, R. R., Powis, G., Jen, E., Caudle, A. S., Chada, S., & Grimm, E. A. (2010). IL-24 is expressed during wound repair and inhibits TGF β -induced migration and proliferation of keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 19(8), 714–722. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01077.x>
- Posadas-Sánchez, R., Ángeles-Martínez, J., Pérez-Hernández, N., Rodríguez-Pérez, J. M., López-Bautista, F., Villarreal-Molina, T., ... Vargas-Alarcón, G. (2017). Receptor-interacting protein 2 (RIP2) gene polymorphisms are associated with increased risk of subclinical atherosclerosis and clinical and metabolic parameters. The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican study. *Experimental and Molecular Pathology*, 102(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2016.12.003>
- Posadas-Sánchez, R., Pérez-Hernández, N., Angeles-Martínez, J., López-Bautista, F., Villarreal-Molina, T., Rodríguez-Pérez, J. M., ... Vargas-Alarcón, G. (2017). Interleukin 35 Polymorphisms Are Associated with Decreased Risk of Premature Coronary Artery Disease, Metabolic Parameters, and IL-35 Levels: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Study. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/6012795>
- Posadas-Sánchez, R., Pérez-Hernández, N., Rodríguez-Pérez, J. M., Coral-Vázquez, R. M., Roque-Ramírez, B., Llorente, L., ... Vargas-Alarcón, G. (2017). Interleukin-27 polymorphisms are associated with premature coronary artery disease and metabolic parameters in the Mexican population: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) Mexican study. *Oncotarget*, 8(38), 64459–64470. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16223>

- Ramji, D. P., & Davies, T. S. (2015). Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26, 673–685. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.04.003>
- Recillas-Targa, F. (2002). DNA methylation, chromatin boundaries, and mechanisms of genomic imprinting. *Archives of Medical Research*. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00366-1](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00366-1)
- Rocha, V. Z., & Libby, P. (2009). Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, 6(6), 399–409. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.55>
- Roijers, R. B., Debernardi, N., Cleutjens, J. P. M., Schurgers, L. J., Mutsaers, P. H. A., & Van Der Vusse, G. J. (2011). Microcalcifications in early intimal lesions of atherosclerotic human coronary arteries. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.004>
- Sahoo, A., & Im, S.-H. (2012). Molecular Mechanisms Governing IL-24 Gene Expression. *Immune Network*, 1212(11), 1–7. <https://doi.org/10.4110/in.2012.12.1.1>
- Sánchez-Castillo, C. P., Velázquez-Monroy, O., Berber, A., Lara-Esqueda, A., Tapia-Conyer, R., & James, W. P. T. (2003). Anthropometric cutoff points for predicting chronic diseases in the Mexican National Health Survey 2000. *Obesity Research*. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.60>
- Sasaki, M., Anast, J., Bassett, W., Kawakami, T., Sakuragi, N., & Dahiya, R. (2003). Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: A sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(2), 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.005>
- Sawan, C., Vaissière, T., Murr, R., & Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 642(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.03.002>
- Schram, M. T., & Stehouwer, C. D. A. (2005). Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome. In *Hormone and Metabolic Research*. <https://doi.org/10.1055/s-2005-861363>
- Škovieroviã, H., Vidomanoviã, E., Mahmood, S., Sopkova, J., Drgova, A., Červeňova, T., ... Lehotskiy, J. (2016). The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms17101733>
- Spencer, V. A., & Davie, J. R. (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, 240(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00405-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00405-9)

- Splinter, E., & De Laat, W. (2011). The complex transcription regulatory landscape of our genome: Control in three dimensions. *EMBO Journal*, 30(21), 4345–4355. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.344>
- Stevens, L., Htut, T. M., White, D., Li, X., Hanidu, A., Stearns, C., ... Yang, J. (2006). Involvement of GATA3 in protein kinase c θ -Induced Th2 cytokine expression. *European Journal of Immunology*, 36(12), 3305–3314. <https://doi.org/10.1002/eji.200636400>
- Swygert, S. G., & Peterson, C. L. (2014). Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(8), 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.013>
- Szerlong, H. J., & Hansen, J. C. (2011). Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure This paper is one of a selection of papers published in a Special Issue entitled 31st Annual International Asilomar Chromatin and Chromosomes Conference, and. *Biochemistry and Cell Biology*, 89(1), 24–34. <https://doi.org/10.1139/O10-139>
- Tall, A. R., & Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 104–116. <https://doi.org/10.1038/nri3793>
- Trivedi, C. M., Patel, R. C., & Patel, C. V. (2007). Homeobox gene HOXA9 inhibits nuclear factor-kappa B dependent activation of endothelium. *Atherosclerosis*, 195(2), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.055>
- Vague, J. (1956). Masculine of Obesities: Differentiation the. *American Journal of Clinical Nutrition*, 4(1), 20–34. Retrieved from <http://www.ajcn.org/content/4/1/20.abstract>
- Vargas-Alarcón, G., Angeles-Martínez, J., Villarreal-Molina, T., Alvarez-León, E., Posadas-Sánchez, R., Cardoso-Saldaña, G., ... Posadas-Romero, C. (2015). Interleukin-17A gene haplotypes are associated with risk of premature coronary artery disease in Mexican patients from the genetics of atherosclerotic disease (GEA) study. *PLoS ONE*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114943>
- Vargas-Alarcón, G., Posadas-Romero, C., Villarreal-Molina, T., Alvarez-León, E., Angeles-Martínez, J., Posadas-Sánchez, R., ... Kimura-Hayama, E. (2014). IL-24 Gene Polymorphisms Are Associated with Cardiometabolic Parameters and Cardiovascular Risk Factors But Not with Premature Coronary Artery Disease: The Genetics of Atherosclerotic Disease Mexican Study. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(9), 659–666. <https://doi.org/10.1089/jir.2013.0081>
- Vasanthi, D., & Mishra, R. K. (2008). Epigenetic regulation of genes during development: A conserved theme from flies to mammals. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(7), 413–429. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60059-4](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60059-4)

- Villarreal-Molina, T., Posadas-Romero, C., Romero-Hidalgo, S., Antúnez-Argüelles, E., Bautista-Grande, A., Vargas-Alarcón, G., ... Carnevale, A. (2012). The ABCA1 Gene R230C Variant Is Associated with Decreased Risk of Premature Coronary Artery Disease: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Study. *PLoS ONE*, 7(11), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049285>
- Wahl, C., Muller, W., Leithauser, F., Adler, G., Oswald, F., Reimann, J., ... Wegenka, U. M. (2009). IL-20 receptor 2 signaling down-regulates antigen-specific T cell responses. *J Immunol*, 182(2), 802–810. <https://doi.org/10.1093/immk/182/2/802> [pii]
- Wallace, T. M., Levy, J. C., & Matthews, D. R. (2004). Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.6.1487>
- Wang, J., Jiang, Y., Yang, A., Sun, W., Ma, C., Ma, S., ... Wei, J. (2013). Hyperhomocysteinemia-Induced Monocyte Chemoattractant Protein-1 Promoter DNA Methylation by Nuclear Factor- κ B/DNA Methyltransferase 1 in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *BioResearch Open Access*, 2(2), 118–27. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0300>
- Wang, M., & Liang, P. (2005). Interleukin-24 and its receptors. *Immunology*, 114(2), 166–170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02094.x>
- Wang, M., Tan, Z., Zhang, R., Kotenko, S. V., & Liang, P. (2002). Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7341–7347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106043200>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200319246>
- Wilson, P. W. F., D'Agostino, R. B., Parise, H., Sullivan, L., & Meigs, J. B. (2005). Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.539528>
- Yusuf, P. S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., ... Lisheng, L. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): Case-control study. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17018-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17018-9)
- Zernecke, A., Shagdarsuren, E., & Weber, C. (2008). Chemokines in atherosclerosis an update. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161174>
- Zhang, G., & Pradhan, S. (2014). Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life*, 66(4), 240–256. <https://doi.org/10.1002/iub.1264>
- Zhang, Z., & Pugh, B. F. (2011). High-resolution genome-wide mapping of the primary

structure of chromatin. *Cell*, 144(2), 175–186.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.003>

Zuo, H.-P., Guo, Y.-Y., Che, L., & Wu, X.-Z. (2016). Hypomethylation of Interleukin-6 Promoter is Associated with the Risk of Coronary Heart Disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, (389), 131–136. <https://doi.org/10.5935/abc.20160124>

11. Anexos

11.1 Región analizada

Se presenta la secuencia genica empleada para el análisis de 10,000 pb rio arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de *IL24*. En mayuscula y cursiva se encuentra la secuencia del amplicon (326 pb). En negritas se destaca isla CpG identificada

```
1 gttatctctc acttatttta tatatggaat agatgtagc atggggactc tcctcatcat
61 gggactcag ggacaggctg caggaaatgc tatcatcctg taataatgct gccatctcaa
121 catggcaggg gatgagagag tgtggacgat tgtgtgctgg ctcttaaagc cttccttcaa
181 gcatgacatg tgtttctttc acttatatct cactggctca aacagccaca tggccacgctc
241 taacttcaat ggaacagtga agtgcaatct tcctgtgttc caagaagtgg aagactataa
301 atgtgagcga acaactgtaa tgtctatcat acctttaagt ggatatccag ccttgaatac
361 cttcaggctt aaaagtcttt attcttgctg tgatattaac ctgccaaatg cagatttcaa
421 gtcacccctg acacttctga cagcaagtat cttactcacg atttgtttgt ttatttaaca
481 agctgctaca ctgtgctgag cagtgtgagc aaaagagaag aacataagat ctgttccttt
541 gcggtcccat gatcttagcc caggagagaa agagagagaa gactaagtgc caccaaagaa
601 gttcaaattg ctacattggt tagaggtgac agaaattcct tgcagctttt gggaatggct
661 tcaaggaatt ggccttgaag tactgctaaa aaatttttaa tgtaagtctc aacctctctt
721 tctaaattgg tgtttgtaga attcttttat tctttgtttt gcaaatacaa aatagcttaa
781 agatgaaaat aaaagcctgc caagcctgta atcttattcc ttcaaaaata gattcttaa
841 aaagggtgtg gtgtgtatta cacatatgta cacacacatg cttgtatatg catatatgta
901 tatgtataca tacatataca tgtaatctgc ttttgacagt cagcaacata tgccatgttt
961 ctatgttgaa gcaataaagg gtggctagtg tttggctggg ggcaagaaca tttcagatcc
1021 agcctaacag aggcataagag gcacgaggtg aagatgaaac gctcagtttt gctggtacca
1081 tgggtgtgtg aagtgtagaa gagagaaaagc tgggaagggtg aatggattgg gtctcagaga
1141 atgtgcagtg ccaggtaggg gaatttcaac aattttcagt gggcaatagt gaaactaaag
1201 atttatttaa atttacaaca acttttctaa aagccttgca ttttgtataa cttggagact
1261 acagttaagc tatagagaag gaaaactccc atgatctcac cactcaaaga taatcttgtt
1321 aacatctcag catttatatt tctagctcat tttcaacact tttgccatt ttatctttta
1381 caaaagtggg atcctactgc atatgtcatc tgtaacctga tttttttaa tctaaaattt
1441 tataaaagtt tttttaagaa tgtaaataa aattattttg agtgggtggaa tagcattcta
1501 ttacatggac ttttaccat agaaataacc aattaaagat cacacaaaag gaaaaagcaa
1561 ttgaattatc ctctcctta aatacatttc atttacctgg ttttgaaatt aaaaattgat
1621 tcatgaacat ttaatgaaca ttaatttcat gaacatatac attctataaa cccctccac
```

1681 ccaccagca tactggtttg caaaagtaga acaaaagagc aatgggttgt ggggagagga
1741 gggaggaact ttccttatca gaaacaaaa atgatttggg ggctgaggaa taatatgatc
1801 agacttgtgc atttagaaga atctcctaga tgagggacag ggattttaa ggggaatgaa
1861 actggaagag agtctataag atagacggga tagggatcat tttccttctt ggacagaatg
1921 aggcacgtgg cacagagaaa gtaagtggct tgttcaagggt agcaggatat ggctgctcta
1981 aggataagac tatgatatcc tcatccacag atccagaact ctctcctgtg ctggccta
2041 cgcagattct gttccctgg ctttctatgt ccagacaggt ggtcatagca tcactttttg
2101 ggtttttact cttacgctgg gaacacgtgc aaagcagatc agtatttaaat aatgccattg
2161 gatgcaggcc acatctcagc ctgtggccat tgcctgagca aaaatgagaa atatttggca
2221 aagatccttg ggcaaatagc ctgggagaca atttgacctt gtacataatt agatttgtga
2281 accagtctaa ttacatagta gtaattatac gactagactc acaccagtac tttccaccac
2341 caaatgtgtg agattttttc tcacactaac caattcttca ttctcgggtg acaccaa
2401 gatggctaca actcaattaa agtccgacac tatttaccag gggatagcat cagatcccac
2461 gggtaaggg ttcaatctca caagactgct cccatttcag acagcaatga caagtcccag
2521 ttatcacctg tgcttctgac cgaacagcca taaatcggag gttcccatga caccgtcttc
2581 tggtttgatc atacgctaaa atggctcaca gaaaccagga aaataattta cttatcagat
2641 taccatttat tatgaaagga tacaactcac gaacagctag atggaagaga tgcattggg
2701 aaggtatgtg gaaaggggca cagagcctcc ttgactctc tggggcacc cctcccagt
2761 acctgcatgt gttaccaac ccagaagctc tccaaacctc ttcttttagg gttttgtg
2821 aggtttcatt acagaggcat gactgattaa atcatgaggc attgatcatt gactcagcct
2881 tactctccc tcctcttctt ggaggtggga tggggtggg tggggtggag tgagtaggg
2941 tgaaagctcc aaccctcta tctcatggtt gattccctgg caaacagctc ccatccctag
3001 gctatccagg aacccccagc tgtcagtcac gcgtagcat aaaaaagaca ctatcattg
3061 tgagattcca agggttttaa agctgcca gaaagggaga gggttatgtc acaccagtca
3121 aataaaattc actatttcaa caaatgctta ctaagctcct gtctgtgcc agcttctgag
3181 ggaattctg acatggataa tactcagttc tagtgcccag ggagttcaca gcctggtgaa
3241 ggagacacia ccagggtgca ggaaggatc gcctgggtgc catcaaagg ggactagcag
3301 cactcctagg agcacaggag aggggagaTT **AACACTGTCC AGAAATCCGA AAATCTCTTT**
3361 **GTAGGTGTGG AGAGTGGACC TGGATAGGAG GAAAGGGAGG GTGCTATTTT AGGAGTACAG**
3421 **TAGTCTCCCT TTATCTGTGG TTCACTTCC TGTGATTTCA GTTACTGACG TCAACAGTGG**
3481 **TTTGAAAATA TTTATTACAT GGAAAATTCC GGAAATAAAC AATTCATAAG TTTAAATCGC**
3541 **GTGCTACTCT GAGCAGCGTG ATAAAGTCTC GTGCCATCCC GCTCCGTCCT GCCTGGAACG**
3601 **TCAGTCCTCC CTTTGTCCAG CGCATCCGAC TGTCACAATA CAACAGTGCT** CATGttcaag
3661 tcacccttat ttcacttagt aacagccca cagcacaaga gtagtgacgc tggcatattg
3721 ttataattgt tctatttcac tatttggat tcttggtaat ctctttgtgt ttaaacttca
3781 tcacagatat gtagtatag gaaaagaaaa gacatcggat acatgggggtt tggtagtatt

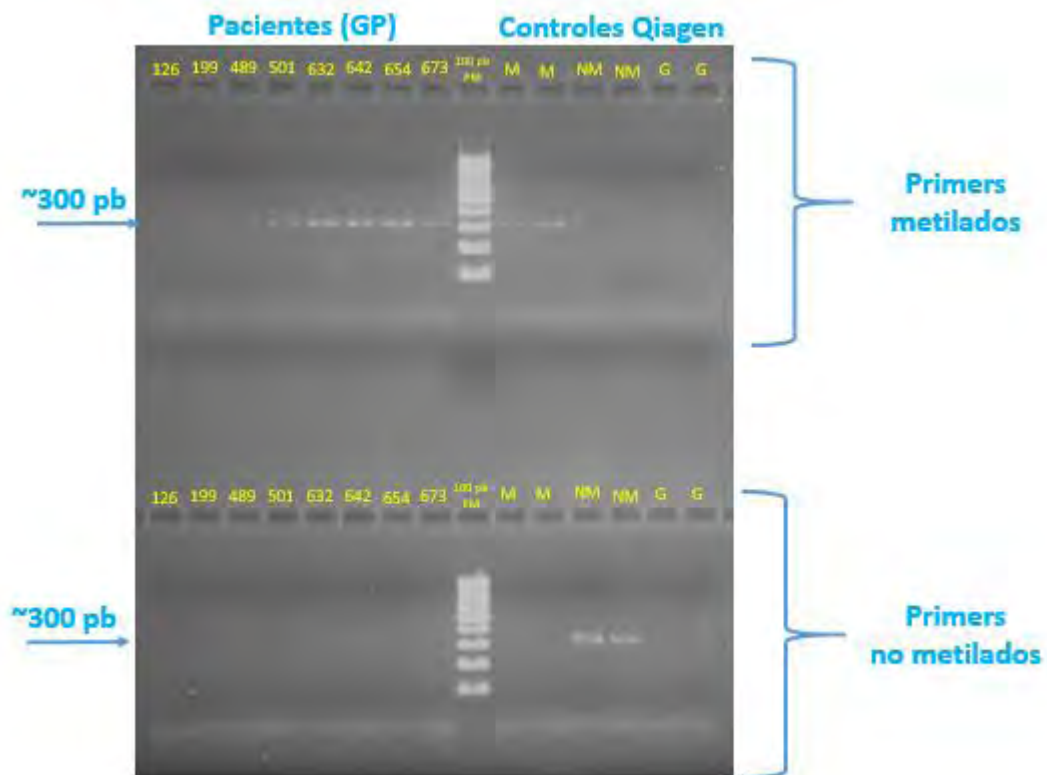
3841 tgcagtttta ggcacttact gggcatgatc cactgatcaa tggctcttggg acgtgtctgc
3901 catggataag gggagtctac tgtattgatt ctgattaatg cctgagaatg ggatgttatt
3961 tcattcacac ggaagccttt ttcctttctt ccattctttc ttccttttta aaaaaatctc
4021 cttcagaaaa aaaagcaacc ctggatatac gagacagggg gcaggggtgac acaggggaaa
4081 taaaccacag tcctttacct ggatctactc agaagactct gtagctacta tttccccaac
4141 atgtaccatg ccatgtattht atttgaatac tcatgtcctt gtgactcaaa gttgatgttc
4201 tacaggtcgt gggaggtcca ggatcctgac tcttgggagg cagttgcagt tcagaactgg
4261 ctttctcttg tggttctttt tcctgcaatt gtacaggagg cttggccttag aaagtgagac
4321 cctggccctt cttctctccc cccattcctt gtctgcagcc ctgtgggatc agtagcacc
4381 taggtcccct tgggagccct gaagttgtat ttacatagct tgttcccatt gatttgcagt
4441 aattattaca cgaaagaaca atcagtggtc ctctttcttc tagcggcttc cagaaccacc
4501 tgctctttgg tctgtccag taactatgtg gatgccgaat gtggaggcta ccagggctc
4561 catcaatcac ctctcccggc tttatthttg ctgggtgaatt cctagtcagg cttcaaattt
4621 cagatcgaat gtcacttcca atggaaagcc tccccgatc ttccagcact gtgccagcac
4681 tgagggatg tctgcctcat cttgctgttg ccacaggctc catccttctg ctaatagcac
4741 ctgtcttagt ttgcttttgg tttcttataa cagaatacct gaaattcggg aatttataaa
4801 gaaaaggaat ttatttctta tagttatgga ggctgggaag tccaagggtca agaagccaca
4861 tctggtgagg gctctcttgt tgggtggagac tctgcagagt cccgagggtg cacagagcat
4921 catatggaaa gggggctgag tatgatagct cagctttgtc ttcttcttgt tttaaagcca
4981 ccagttccat tcccatgata acccgtgaat ccatgaatag atgagtcaat ctgtaagggc
5041 agaaccctca agaccattc gccttttaaa ggtcccacct ctcaatactg ccacactgag
5101 gattaagttt caacatgagt tttggaggga atgttcaaac catagtggta cccatgacac
5161 agtggtgcca tttatctgtht tgcaagtgta tctccactct actgagtcac taaagcacia
5221 ggactgtgtc ttaatttatt ttaaaatagc tttttaaata tataatttac ataccatagg
5281 ttatctgttht aaagtgcaca gttcaatttht ttttttaaat atagacacag agttgtgcaa
5341 ccatcaccgt atctaatttht aaaacattct gttactctcc aaagaaacat tgtattcctt
5401 agtagtcact cttttctctc caccaccctt attcttaact ctgagccctg ggcaaccatt
5461 catctatatt ctgtgtctat aaatttgcct tttctggaca ttgacataa atgttttcat
5521 agtaatttat tttttgtaca ctctattctg ccattcagta ggtgcttagg aaatgtttgt
5581 tcgatgaatg aatgaatgta ctaaagattg agaaactgct tgggaagcatg gcaccgggga
5641 aagaacactg gacccaaaagc cagaagacct gcactctagg cctggttatg tcatttattt
5701 atgtgactta gagaaaatca cttgaccttht ctgactctca gctttctagt ctgtaaagga
5761 gggataataa tatctgccct cttattthtca aaagtccaca gtaagtgtca gatgaaaaaa
5821 atcacttggg aatattthtgt atagctctaa gcaggctgta cagatgtaag aataatttat
5881 gtttgtgttht actctcatcc cttgaaatgc ctataaaaaat aaatcactta ttacacgaat
5941 gacacagggg gaaggaagaa cgacagaatg ccagtctaag gagatcaacc agtgggatat

6001 gggctcctgg aatgactgca gttaactcag ggaaaagagc taacaaatgc cctggttatc
6061 ccatatccat taccacatgc atttcccagc caaatgggaa gataaaaatc tgttctcgag
6121 tgaaaattaa actcaattca ctggaagaaa aatgatcata taatttcctc ttatcttttt
6181 gctcttagga aattctagtt aatatgctaa ttactttctg ttttgcaggg cctttgcatc
6241 catcgcaaag aggggagatt caggtttaag agtgagctct ttattgcctc acacagaagt
6301 ggaagtggag aaggaactct ggtccatggt ggctcagtct ctttctctcc ctttaggttt
6361 agaggacttt gtagggggaa tgtgagtata tttatttctc aaatgtgaaa ttcaggctct
6421 gcagagagat atacaggaca gagataggat aagattatta gaataaaacc tctgaatcta
6481 ataaggagta gtttgaggga aaaaaaaca gtcttgtatg tgaagattta tctttagata
6541 aacttttctt ccaccaaca tttgtaaac tccccagtt ccatcctttc gtagaggtta
6601 gcagagcctc agaccttggc ctgatccagg agagtttggg taaaaatata tgaatctgga
6661 caaaagggcc agccccactt cttcaacct cttaaagtct gagacttggg gctttcccag
6721 aggtggggcca gtgagccagg tctccccact gtttccacct ggcttttggg cactgccttc
6781 caacttgtca ccttgttttt cccattcccc tgatcatctg atcagcctac tgctccttt
6841 cccaataagg tcatgttctt ctcttcctct gctcctattc cagctatttc cccatagacc
6901 actgcttctt tctaaccag ggtttcttac cctcagcact attgacctta ggtcatatag
6961 ttctttgtga tgaggggctg tcctgtggcc cataggatgt ttagcagcat tcccagcca
7021 ttccactaga taccaatagc acctcccagt tatgacaacc aaaaatatct ccagacattg
7081 cccagtacag atgggcatga agtatgaagt atgaagtatg aagtatgaag tcaccttatt
7141 tagatcccct aaaccagtcc ttctccctt catctggagc tcttgtttat taaacattta
7201 ccatggagaa gacactgaat taaatctttc atgctgttta tgctgatggt tctcaaaatt
7261 taatgaacat aagcatcacc ttggaaggtt cttaaactac atattctaatt tcagtcattt
7321 tttcggggaa gggcttgaga ttctacttta cttttattta ttttttctga gacagggctt
7381 tgctctgtca cccaggggtg aatgcagtgg caagatcatg gctcactgca gccttgacct
7441 cccaggtctc aatgatcctc ctgcctcagc ttcccagagta gctgggacca caggcatgtg
7501 ccatcacaac gaactaattt ttatttattt ttgcagacag ggtcttgcca tgttgcttag
7561 gaggacctca aactcctggg ctcaagcaat cctcccacct tggcctccca aagtgtctggg
7621 attacagacg tgagccactg taccagccc aagattgtac atttctaaca aggtcccaga
7681 taatgctatc actgctggct catgggccac acttggtgag caaagctgca ggtcatcaca
7741 tcctcatggt cttatgagga ctctatttca caagtgagga aggtgagcct cagagggctc
7801 atatgtggct cgatcacctt ttgaaccag gtctgcctgc ctccaaagct tgtactcata
7861 actagattct caactgatgt tgggccaagg ttccctagggt ctctccttga ccttccttct
7921 gaagtaataa tgctatgata agctcatcgg aggtgaggc ccaggacat gtttgctga
7981 actatccatg ttatatgatt ctttctcag acagagtgag ctactcacga tcccaggtgt
8041 accctgaggc cagccaaggt gtatccatga cctcatgcct ctgttccagc ctgcccttta
8101 acagctcatc ccacctgcct gccctccccg cctatctgca gacagtagtc taggatttca

8161 gctgccctgg gggctcattt tccctctcag cttcctgctt tagctgtctc ctgccctcca
8221 ctcacctatt actccagcac tctcacctgg tcttcttttc tgtctcatca ctgccctctg
8281 acatctttat ctcatagtag ttagttaggg gttcttggta atgccctaaa tccacatggt
8341 ggggaaggggg gagtggggga agagagtgcg ctgtggggct gtgcctactt ctggagggta
8401 agactcgggc cctccaggaa caaaggattc aggctgggtg cagctatagc caagcagact
8461 gctggccagg gattgcaaag gagtattttg tttgcttaag aaaataaaca aactgagta
8521 tgagatggag ggaggggggtg ttggtgccag agagattggg aagagtctgc caaggggtg
8581 ttctactcac tctcctcttt tctttcatct cactgagct ggaggcagtt atcctgtccc
8641 ccacgtcaca ttctactcc cgtttcccat gcctggacc aggttgggca aactcttct
8701 gtaaagaacc agacaggaac tatttttaggc tctgtgtgcc atatggtctc agtcacaact
8761 actcatctct gcctctgtag cacgaaagca attagcaaca atatgtcaac aaacatatgt
8821 gaccccatga aaactttatt tattatggat acggaaacct gaaaataatg tctttctttt
8881 gattttttcc ccaatcatta aaaaacgtaa aaactactct taggtcgcaa ggttaagcca
8941 ttctcagctt agcagtggca ggctggattt ggcttgtgac ctacagttgg ccaatccctg
9001 attcccaaaa tgtattcctc agggatgtgg gcaaatactt atgggaaatg ctggattaa
9061 cagagttaag aagcatcaga catttccagg acgggctagc acatgccagg gctctctaac
9121 tgacctcatt aggattcatc tgtttcatgg aggatcttgc aagacaagaa ttctctaaac
9181 ctagagtctg aggactgtgc tttgggaaac actgctctgc ttgatgccct cactgggcac
9241 atggtagaat ctagagctga gtgccttgc agctggagat agggtcagag ctcttgactg
9301 ccctggcagt cttgacacat cacgctgtct gtgtcccctg agtggttcag agccacacag
9361 gccaaagacta gccaccaga gcaccaggcc tcccagcttt ctgggcttgt ccatgctac
9421 atttccttat tcttcttggg ttccagaacc taaggagagg cacatthtgg ttgagtgatt
9481 ataaccctag ggacctggg tagctgcatg tcaggaaaca ctctcaact tcttggcct
9541 gatggattaa aggagaggta cttacaggtt atttcttgc tgtggactac tgtcccagca
9601 tgaatagggc atcattattg aattattttg acaggaagga gactggtgta tgctgcacag
9661 taataatgta tttacatgtg tacagagttt accaagcacc tctgtgttgt ttttgcctct
9721 gccaaagacta gccaccaga gcaccaggcc tcccagcttt ctgggcttgt ccatgctac
9781 atttccttat tcttcttggg ttccagaacc taaggagagg cacatthtgg ttgagtgatt
9841 ataaccctag ggacctggg tagctgcatg tcaggaaaca ctctcaact tcttggcct
9901 gatggattaa aggagaggta cttacaggtt atttcttgc tgtggactac tgtcccagca
9961 tgaatagggc atcattattg aattattttg acaggaagga

11.2 Geles representativos del grupo con EAC

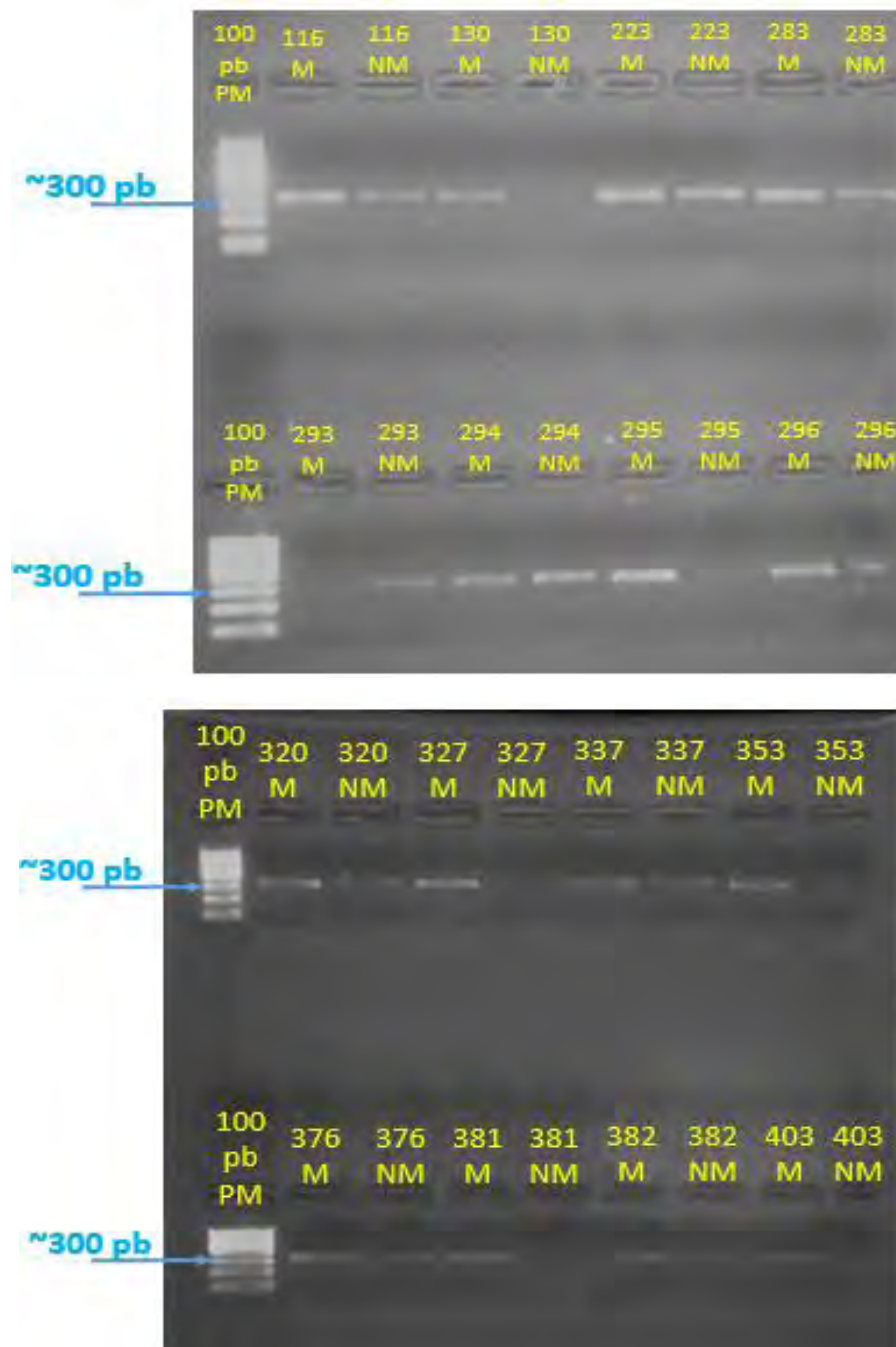
Se presenta el número de muestra encima de cada carril seguido por la letra M para la reacción metilada o la letra NM para la reacción no metilada. PM: marcador de peso molecular de 100 pb. M: control de ADN metilado, NM: control de ADN no metilado, G: control de ADN genómico

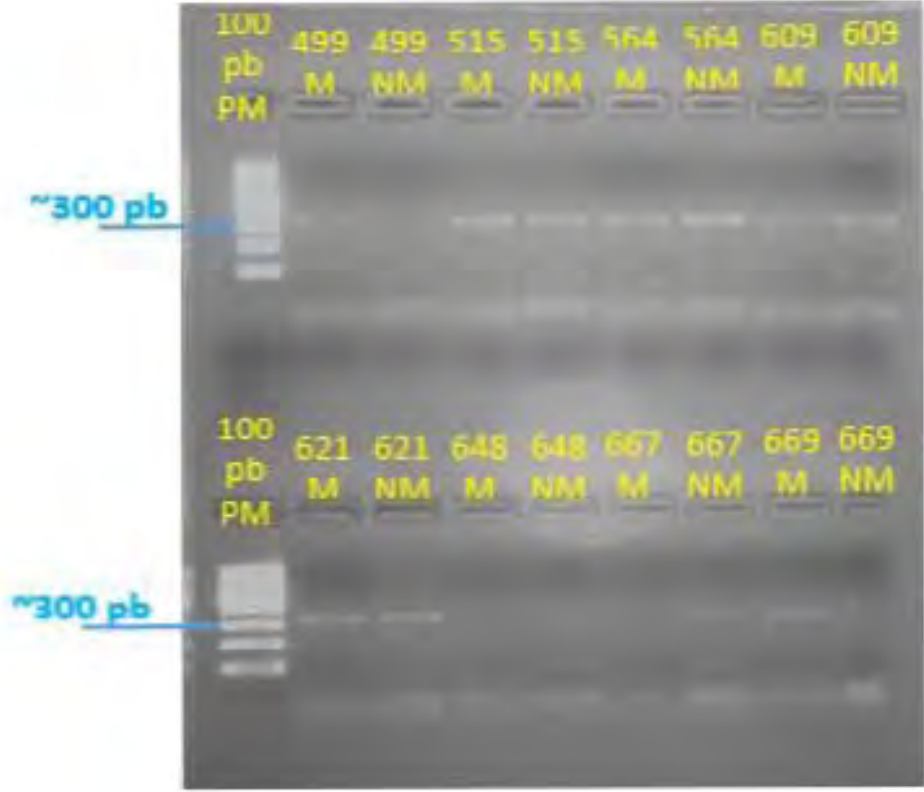
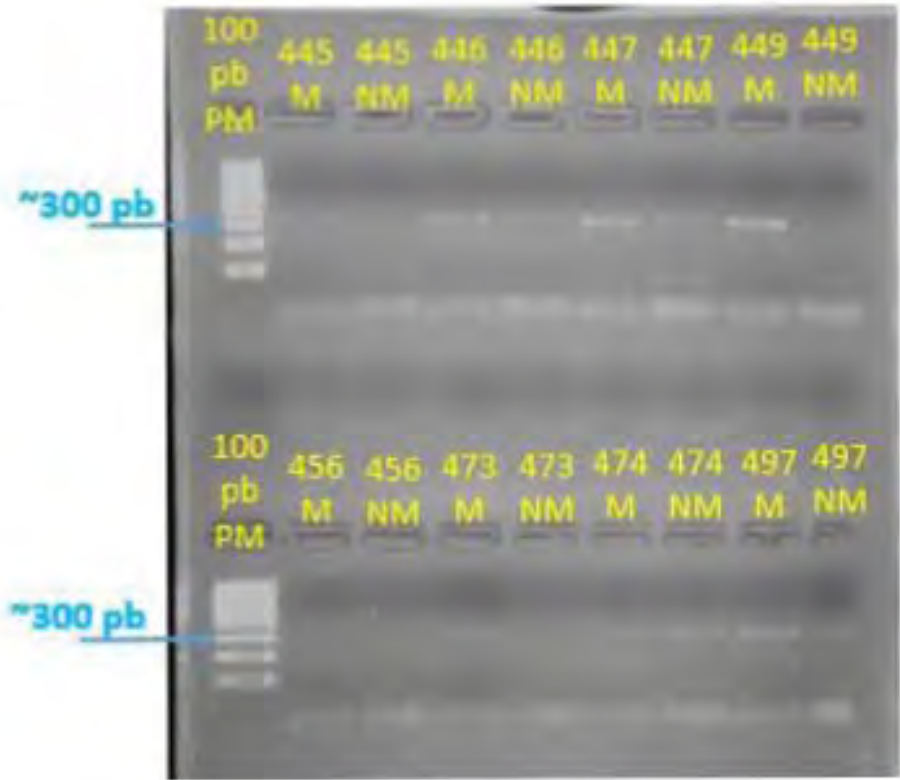




11.3 Geles representativos del grupo con AS

Se presenta el número de muestra encima de cada carril seguido por la letra M para la reacción metilada, las letras NM para la reacción no metilada. PM: marcador de peso molecular.





11.4 Geles representativos del grupo control

Se presenta el número de muestra encima de cada carril seguido por la letra M para la reacción metilada o las letras NM para la reacción no metilada. PM: marcador de peso molecular de 100 pb.

