UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.
INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD
BIOQUÍMICA CLÍNICA

IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE METILACIÓN ASOCIADOS A EPOC SECUNDARIA A EXPOSICIÓN AL HUMO DE LEÑA

TESIS

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

PRESENTA:
Q.C. SALVADOR GARCÍA CARMONA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. EN C. GLORIA PÉREZ RUBIO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS"

COMITÉ TUTOR:
DR. EN C. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS"
M. EN C. JUAN CARLOS FERNÁNDEZ LÓPEZ
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENOMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., SEPTIEMBRE DE 2019

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Agradecimientos

Tabla de contenido

Índice de tablas 4
Abreviaturas 5
Abstract 9
Introducción 10
Epidemiología de la EPOC 12
Componentes del humo proveniente de la quema de leña 13
EPOC por humo de cigarro vs EPOC por humo de leña 14
Patogénesis de la EPOC 17
Desequilibrio del estrés oxidativo en la EPOC 17
Desequilibrio de proteasas y antiproteasas en EPOC 19
Proceso inflamatorio en EPOC 20
Apoptosis en EPOC 22
Genes asociados a EPOC mediante estudios de genoma completo (GWAS) 23
Epigenética 25
Modificación de histonas 28
Micro RNAs 29
Metilación del ADN 29
Evaluación de la metilación en el genoma humano por estudio de epigenoma completo (EWAS). 32
Antecedentes 35
Planteamiento del problema 39
Justificación 40
Hipótesis 41
Objetivo general 42
Objetivos específicos 42
Metodología 43
Población de estudio 43
Definición de los grupos de estudio 43
Criterios de inclusión 44
Criterios de exclusión 44
Criterios de eliminación 44
Cálculo del tamaño de muestra. 45

Obtención de la muestra de esputo inducido 46
Procesamiento de la muestra de esputo inducido destinada para extracción de DNA y cuantificación de proteínas solubles. 46
Cuantificación de ADN 46
Conversión con bisulfito de sodio 47
Evaluación de patrones de metilación 47
Procesamiento de la muestra para determinación de proteínas en sobrenadante de esputo inducido. 47
Análisis estadístico 48
Resultados 50
Control de calidad 51
Normalización 52
Exploración de datos 53
Análisis de sitios diferencialmente metilados. 55
Cuantificación de proteínas en sobrenadante de esputo inducido. 59
Discusión 61
Conclusiones 68
Referencias bibliográficas 69
Anexos 89
Anexo 1. Carta de consentimiento informado. 89
Anexo 2. Carta de aceptación del proyecto por el comité de bioseguridad. 92
Anexo 3. Kit de extracción de DNA Sputum DNA Collection, Preservation and Isolation de Norgene Biotek Corp 93
Anexo 4. Kit de conversión con bisulfito de sodio: EZ DNA Methylation kit de Zymo Research 96
Anexo 5. Guía para el protocolo de metilación, ensayo Infinium EPIC 850k de Illumina. 99
Anexo 6. Script empleado en el análisis de datos provenientes del microarreglo 100
Anexo 7. Cuantificación de proteínas por el método de ELISA 105
Anexo 8. Kits empleados para la cuantificación de proteínas en sobrenadante de esputo inducido. 109

Índice de figuras

Figura 1. Principales modificaciones epigenéticas. Metilación del DNA, modificaciones de histonas y RNAs no codificantes. El diseño de la imagen se realizó en Biorender.com 26
Figura 2Diseño de la matriz MethylationEPIC BeadChip Infinium 850K. 34
Figura 3. Cálculo del tamaño de muestra en el programa G Power 3.1.9.2. 45
Figura 4. Integridad de las muestras de ADN de muestras de esputo inducido. 51
Figura 5. Valores de p de media de detección por muestra. 52
Figura 6. Gráfico de densidad. Muestran los valores beta antes y después de la normalización por cuantiles. 53
Figura 7. Gráficas de escala multidimensional (MDS). 54
Figura 8. Gráficos de densidad para valores beta y valores M. 55
Figura 9. Manhattan plot de sitios CpG diferencialmente metilados en EP-HL y EXP-HL. 56
Figura 10. Volcano plot del análisis de metilación diferencial en mujeres con EPOC por humo de leña y expuestos a humo de leña sin EPOC.EP-HL: EPOC por exposición a humo de leña, EXP-HL: expuestos a humo de leña sin EPOC, CpG: Sitio CpG. 56
Figura 11. Top 5 de los sitios CpG diferencialmente metilados por análisis de epigenoma completo. 58
figura 12. Cuantificación de proteínas solubles en sobrenadante de esputo inducido. 60
Figura 13. Conversión con bisulfito de sodio. Modificado de Zymo Research Corp., CA, USA. 98
figura 14. Preparación de las diluciones para la curva estándar. 107
figura 15. Diagrama de flujo para la técnica de ELISA. 108

Índice de tablas

Tabla 1. Grado de obstrucción del flujo aéreo FEV1/FVC <70% posbroncodilatador 12
Tabla 2. Características de la EPOC por humo de leña y por tabaquismo. 16
Tabla 3. Estudios de epigenoma completo (EWAS) en tabaquismo y EPOC*. 38
Tabla 4. Características demográficas y clínicas de las mujeres con EPOC por exposición al humo de leña y las mujeres expuestas al humo de leña sin EPOC. 50
Tabla 5. Top 5 de los sitios CpG diferencialmente metilados por análisis de epigenoma completo.57
Tabla 6. Sitios metilados diferencialmente en genes evaluados en esputo inducido. 59
Tabla 7.Reactivos utilizados para la cuantificación de proteínas por ELISA. 106

Abreviaturas

AAT: Alfa-1 antitripsina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AHRR: Represor del receptor de aril hidrocarburo

ARN: Ácido ribonucleico

BD: Post Broncodilatador

CGI: Isla CpG

CpA: 5'-citosina-fosfato-adenina-3 '

CpC: 5'-citosina-fosfato-citocina-3 '

CpG: 5'-citosina-fosfato-guanina-3 '

CpT: 5'-citosina-fosfato-timiina-3 '

DITABE: Departamento en investigación en tabaquismo y EPOC

DNMT: ADN metiltransferasas

IDAT: archivos de datos de intensidad

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a una enzima

ENCODE: Enciclopedia of DNA elements

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

EP-HL: EPOC por exposición al humo de leña

EPOC-T: EPOC por exposición al humo de tabaco

EWAS: Estudio de asociación de todo el epigenoma

EXP-HL: expuestos al humo de leña

FANTOM5: Anotación funcional del genoma de mamíferos

FDR: Tasa de descubrimiento falso

FEV1: Volumen espiratorio forzado en un segundo

FVC: Capacidad vital forzada

GLP: Gas licuado de petróleo

GOLD: Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

GWAS: Estudio de genoma completo

GWIS: Estudios de interacción del genoma

ICGN: Red Internacional de Genética de la EPOC

IEHL: Indice de exposición al humo de leña

IL1 β: Interleucina 1 β

IL6: Interleucina 6

IL8: Interleucina 8

IL10: Interleucina10

IMC: Índice de masa corporal

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

LTB4: Leucotrieno B4

MBD: Proteínas de unión a ADN metilado

MCP-1: Péptido quimiotáctico de monocitos 1

MMP: metaloproteinasas de matriz extracelular

NAS: Estudio de Envejecimiento Normativo

NETT: Ensayo Nacional de Tratamiento de Enfisema

ORO: Iniciativa mundial para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

PAH: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Material particulado

ROS: Especies reactivas de oxigeno

SAM: S-adenosil metionina

SGRQ: cuestionario respiratorio de Saint George

SNP: Polimorfismo de un solo nucleotido

SOD: Superóxido dismutasa

TNF: Factor de necrosis tumoral

VEGFR2: Factor de crecimiento endotelial vascular

Resumen

Introducción: La exposición al humo de leña es un factor de riesgo ambiental que puede modificar los patrones de metilación en genes que participan o contribuyen al desarrollo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Materiales y métodos: La metilación de genoma completo se realizó utilizando el microarreglo Infinium MethylationEPIC de Illumina en muestras de esputo inducido de 45 mujeres con EPOC por exposición al humo de leña (EP-HL) y 46 mujeres expuestas sin EPOC (EXP-HL). El análisis bioinformático y estadístico se realizó en el ambiente Rstudio. Se cuantificaron proteínas cuyos genes presentaron diferencias significativas en la metilación y que fueran solubles en el sobrenadante de esputo inducido mediante ELISA. Resultados: 631 sitios se encontraron diferencialmente metilados posterior corrección por Bonferroni, los genes principalmente asociados codifican para proteínas que participan en el remodelamiento pulmonar (*FOXP1* p=0.002, *FAM98A* p=0.0065, *FMOD* p=0.012, *ADAMTS12* p=0.029, *EDN1* p=0.044), del sistema inmunológico (*ALOX5* p=0.005, *IL19* p=0.047), encargadas de la producción de moco (*MUC19* p=0.04) y del metabolismo de xenobióticos (*GSTO2* p=0.02). De tres proteínas evaluadas en el sobrenadante de esputo inducido, solo endotelina 1, se encontró disminuida en EP-HL vs EXP-HL (p=0.00054). Conclusión: La exposición al humo de leña afecta la metilación en genes que pueden contribuir al desarrollo de EPOC. La metilación en el sitio cg08450425 del gen *EDN1*, es significativamente mayor en EP-HL *vs* EXP-HL. La concentración de endotelina 1 es menor en las mujeres con EPOC y esto podría ser consecuencia del estado de metilación encontrado en nuestro estudio.

Abstract

Introduction: Biomass smoke exposure is an environmental risk factor that can modify methylation patterns in genes that participate or contribute to the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Materials and methods: An epigenome-wide association study was performed using the Illumina EPIC Infinium Methylation microarray in induced sputum samples from 45 women with COPD from biomass smoke exposure (EP-HL) and 46 women without COPD but whit biomass smoke exposure (EXP-HL). The bioinformatic and statistical analysis was performed in the Rstudio environment. Soluble proteins were quantified by ELISA in the induced sputum supernatant of genes showed differences in methylation. Results: 631 sites were found differentially methylated posterior correction by Bonferroni; mainly in genes associated with lung remodeling (*FOXP1* p=0.002, *FAM98A* p=0.0065, *FMOD* p=0.012, *ADAMTS12* p=0.029, *EDN1* p=0.044), immune system (*ALOX5* p=0.005, *IL19* p=0.047), production of mucus (*MUC19* p=0.04) and xenobiotics metabolism (*GSTO2* p=0.02). Of the proteins evaluated in the induced sputum supernatant, only endothelin 1 was found to be decreased in EP-HL vs EXP-HL (p=0.00054). Conclusion: Biomass smoke exposure affects methylation in genes that may contribute to the development of COPD. Methylation at cg08450425 of *EDN1* gene is significantly higher in women with EP-HL vs EXP-HL. The concentration of endothelin 1 is lower in women with COPD, could be related to their methylation status.

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una patología compleja y multifactorial, se desarrolla de manera lenta y progresiva, la prevalencia en adultos de 40 años o más es aproximadamente de 9-10% y de 15% en las personas mayores de 65 años [1]. La limitación crónica del flujo aéreo característico de la EPOC, es producida por una combinación de enfermedad de vías aéreas pequeñas (bronquitis) y destrucción del parénquima pulmonar (enfisema), cuyas contribuciones relativas varían de un individuo a otro [2].

La EPOC se caracteriza por síntomas respiratorios persistentes, se debe entre otras causas, a anomalías de las vías respiratorias y/o alveolares, ocasionadas generalmente por exposición a partículas o a gases nocivos. Los síntomas respiratorios más frecuentes son:

a) Disnea crónica y progresiva; es el síntoma más característico de la EPOC, es la principal causa de discapacidad y ansiedad de la enfermedad [3], es descrita por los mismos pacientes como una sensación de mayor esfuerzo para respirar, falta de aire o pesadez en el pecho [4].
b) Tos crónica, por lo regular el primer síntoma de la EPOC, en un inicio se presenta de manera intermitente, después puede volverse crónica [5].
c) Producción de esputo, durante tres o más meses en dos años consecutivos (en ausencia de cualquier otra condición que pueda explicarlo) es la definición clásica de bronquitis crónica [6, 7] .

Estos síntomas cambian día a día, por lo general se presentan un par de años antes del desarrollo de la limitación de la vía aérea [8]. Las personas, especialmente

aquellas con los síntomas mencionados, y/o antecedentes de exposición a factores de riesgo de la enfermedad (tabaco y/o gases nocivos), deben ser examinadas minuciosamente [9,10]. La espirometría es la prueba más empleada, objetiva y reproducible de la limitación del flujo de aire en función del tiempo [15–17], es de fácil acceso y no es una prueba invasiva [11]. Dicha prueba debe realizarse cuantas veces sea necesario, siempre y cuando el paciente no manifieste malestar, hasta obtener tres resultados aceptables (inicio y término adecuados y libre de artefactos) y reproducibles de buena calidad [11].

Los principales parámetros fisiológicos que se obtienen durante la espirometría son la capacidad vital forzada (FVC) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1); a partir de estas mediciones se obtiene la relación FEV1/FVC. Las mediciones espirométricas se evalúan comparándolas con valores de referencia según la edad, la altura, el sexo y la raza [15]. La prueba se realiza antes de aplicar broncodilatador y posterior a la administración de broncodilatador; el medicamento recomendado es salbutamol (400 mg), administrado mediante una cámara espaciadora; posterior al medicamento, el paciente deberá permanecer sentado y en reposo y pasados 20 minutos, se procede a realizar nuevamente la espirometría [14].

La presencia de un cociente FEV1/FVC menor al 70% posbroncodilatador, confirma la presencia de limitación persistente del flujo de aire en pacientes con los síntomas antes mencionados y con exposición significativa a los agentes nocivos. La clasificación de la gravedad de la limitación del flujo aéreo empleando los valores espirométricos se muestran en la tabla 1 [2].

Tabla 1. Grado de obstrucción del flujo aéreo FEV1/FVC <70% posbroncodilatador

Estadio GOLD	Gravedad	FEV1% valor predicho
1	Leve	FEV1 ≥ 80%
2	Moderada	50% ≤ FEV1 < 80%
3	Grave	30% ≤ FEV_1 < 50%
4	Muy grave	FEV_1 < 30%

GOLD: Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, FEV1: Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo, FVC: Capacidad Vital Forzada. Tomada de la GOLD, 2019. [2]

Epidemiología de la EPOC

La exposición al humo del cigarro es considerado el principal factor de riesgo para desarrollar EPOC; en países en vías de desarrollo, la exposición constante al humo procedente de la combustión de biomasa (quema de leña, carbón, desechos de cultivos, estiércol, etcétera) es otro factor de riesgo importante [16]. Cerca del 50% de la población mundial y el 90% de los hogares en zonas rurales y suburbanas, utilizan biomasa como fuente primaria de energía doméstica para cocinar, calentar la casa, entre otros usos. En países como China, India y el África subsahariana, más del 80% de los hogares usan biomasa como combustible mientras que en América Latina, la proporción oscila hasta un 75% [17]. En México, la falta de un registro estadístico oficial subestima el problema de salud que representa la quema de leña en los hogares, la mayor parte de los usuarios de este tipo de energía se concentra en la zona centro y sur del país, en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y Veracruz [18]. Se estima que la población usuaria de leña en México es de 22.5 millones, de los cuales 16.8 millones son usuarios exclusivos de leña y 5.7 millones utilizan adicionalmente gas licuado del petróleo [18]. La mayor parte de esta población se localiza en las áreas rurales y

suburbanas [19]. Existen familias que mantienen el fuego todo el día, pero hay quien lo utiliza únicamente por la mañana (41%), en menor proporción solo lo emplean medio día (17%) o bien por la noche (4%). Este fuego está bajo la responsabilidad y cuidado en un 90% de los casos por mujeres, 5% por hombres y 5% está al cuidado de los niños. Es decir, la mujer es quien juega un papel principal en el uso del fuego dentro de las familias campesinas, y por lo tanto son las más expuestas a los impactos negativos del mismo [20]. En áreas suburbanas de la Ciudad de México, la prevalencia de EPOC por exposición al humo de biomasa fue de 3% mientras que, la prevalencia de exposición es del 47% en la población estudiada [21].

Componentes del humo proveniente de la quema de leña

Estudios sobre la exposición a contaminación de aire intramuros, han potenciado el entendimiento de su participación en enfermedades pulmonares, consecuencia de la caracterización de las propiedades físicas y químicas de las partículas presentes en la quema de biomasa [22]. Esta combustión ineficiente, produce una mezcla compleja de partículas de carbón, partículas inorgánicas, carcinógenos y gases irritantes, que comparten algunas características con el humo de tabaco [23,24]. El humo de biomasa contiene más de 250 compuestos orgánicos que pueden variar según el material que se queme [nitrógeno (N_2), dióxido de carbono (CO_2), vapor de agua (H_2O), oxígeno (O_2 no utilizado en la combustión), monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno (NOx), dióxido de azufre (SO_2), hollín y partículas sólidas] y las condiciones de la combustión (combustión completa, combustión incompleta, combustión con defecto o exceso de aire) [22]. Dependiendo de las características de la combustión, de la madera y de la estufa en el humo de

biomasa existen partículas que difieren en su composición aerodinámica [25], así podemos encontrar material particulado de 10 micrómetros (PM10, partículas gruesas, de diámetro aerodinámico de 10 µm o menos), los cuales son complejos de minerales, bacterias, endotoxinas y esporas fúngicas [26]; material particulado de 2.5 micrómetros (PM2.5, partículas finas, de diámetro aerodinámico de 2.5 µm o menos), formados en su mayoría de hidrocarburos, compuestos orgánicos semivolátiles e inorgánicas y material particulado de 0.1 micrómetros (PM0.1, partículas ultra finas, de diámetro aerodinámico de 0.1 µm o menos), son ricas en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)[25]. Las PM2.5 son responsables de provocar estrés oxidativo celular por las especies reactivas de oxígeno a partir de los metales de transición e hidrocarburos aromáticos policíclicos [27].

EPOC por humo de cigarro vs EPOC por humo de leña

En la EPOC existen dos principales fenotipos, la bronquitis y el enfisema, independientemente del factor de exposición de riesgo, los dos fenotipos coexisten en proporciones variables.[28] Cuando predomina bronquitis, los pacientes presentan hipersecreción de moco, disminución acelerada de la función pulmonar, hiperinflación pulmonar, anomalías en el intercambio de gases, hipertensión pulmonar, mayor predisposición a infecciones del tracto respiratorio inferior, mayor frecuencia de exacerbaciones y mayor tasa de mortalidad [29,30]. La presencia de células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos y linfocitos); glucosaminoglicanos (keratan sulfato, dermatan sulfato e hialurano); proteoglicanos (fibromodulina, lumican y decorina); lípidos (fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol) y patógenos como bacilos gram negativos, cambian las propiedades biofísicas del moco [31]. Existe hipersecreción de mucina (MUC5AC y MUC5B), destrucción de células ciliadas,

por la presencia de proteasas y lesión oxidativa, dando lugar a fallas en la mecánica mucociliar. La hipersecreción de mucina o desregulación del líquido superficial aumenta la concentración de solutos hasta el 15 % (el moco saludable posee 3% de material sólido) dando lugar a la formación de moco con mayor viscosidad, así como mayor elasticidad, esto lo convierte en moco difícil de eliminar [32–34].

En el fenotipo enfisematoso, existe destrucción de las paredes alveolares, esto origina agrandamiento de estos espacios y reducción consecuente del área de intercambio gaseoso en el pulmón [35]. Se desencadena degradación proteolítica a causa de alteraciones del equilibrio de proteasas y antiproteasas, así como falla en los mecanismos de reparación, mantenimiento, apoptosis, senescencia y autoinmunidad [36,37].

En EPOC por consumo de cigarro (EPOC-T), predomina el fenotipo enfisematoso, en cambio, por humo de leña (EP-HL), predomina bronquitis [38, 28]. Entre otras diferencias se encuentra que, las mujeres EP-HL son de menor estatura, presentan un índice de masa corporal (IMC) mayor [28,39] y son de mayor edad que el grupo de mujeres EPOC-T; esto último, hace suponer que, para desarrollar EPOC por exposición al humo de leña se necesita mayor tiempo de exposición al agente nocivo [28,40]. Según el cuestionario respiratorio de Saint George (SGRQ), las mujeres del grupo EP-HL presentan mayor compromiso del estado de salud, poseen más complicaciones para realizar actividades cotidianas, así como uno o más de los síntomas respiratorios e hiperreactividad bronquial cuando son comparadas con EPOC-T [28, 37, 40, 41] (tabla 2).

Tabla 2. Características de la EPOC por humo de leña y por tabaquismo.

Característica	EP-HL	EPOC-T	p
Prevalencia mundial [42,43]	980 millones	2,800 millones	
Sexo en proporción %	87%	26%	
Talla (cm)[28]	148.0 ± 6.0	154.0 ± 3.0	0.003
IMC kg/m^2 [16]	27 ± 5	25 ± 5	0.0001
Edad (años) [16]	71 ± 9	67 ± 9	< 0.0001
Escolaridad (años) %[44]	5.20 ± 3.59	7.56 ± 4.25	
SGRQ[28]			
Síntomas	46 ± 28	30 ± 18	0.03
Dificultad para realizar actividades	58 ± 20	46 ± 19	0.02
Impacto	34 ± 19	24 ± 13	0.10
Tos %	90	76	0.23
Expectoración %	90	71	0.13
Disnea %	17 ± 10	14 ± 8	0.19
Medición en vías aéreas			
Enfisema(IR TC)[28]	0.67 ± 0.80	2.33 ± 1.53	0.0001
Atrapamiento de aire (IR TC)[28]	2.60 ± 0.82	1.52 ± 1.12	0.006
Hiperreactividad bronquial, prueba de metacolína[45]	+ + +	+	
Hiperplasia de células calciformes[38]	+	+ + +	
Engrosamiento de la pared de las vías aéreas[38]	+ + +	+	
Antracosis[38]	+ + +	+	
Hiperplasia de la arteria pulmonar[38]	+ + +	+	
CD4+ y mediadores inflamatorios[46]	Th2, IL-4 e IL10	Th-17	
Función pulmonar[40]			
Declive de la función pulmonar anual (FEV1, mL)	23 ± 17	42 ± 26	< 0.001
FEV1 post-BD, % predicho	63 ± 20	50 ± 18	< 0.0001
FEV1/FVC post-BD	0.56 ± 0.09	0.47 ± 0.12	< 0.0001

EP-HL: EPOC por exposición al humo de leña, **EPOC-HT**: EPOC por exposición al humo de tabaco, **IMC:** Índice de masa corporal, **TC**: Tomografía Computarizada, **IL**: interleucina?, **SGRQ**: cuestionario respiratorio de Saint George, **FEV1 post-BD ml**: volumen espiratorio forzado en el primer segundo post broncodilatador en mililitros, **FEV1 post-BD, %**: volumen espiratorio forzado en el primer segundo posbroncodilatador en porcentaje, **FEV1/FVC post-BD**: cociente entre volumen espiratorio forzado en el primer segundo y capacidad vital forzada en porcentaje, **IR TC**: Índice radiológico por tomografía computarizada.

Patogénesis de la EPOC

La patogénesis de la EPOC involucra, mecanismos inflamatorios, desequilibrio en el estrés oxidativo, en el sistema de proteasas y antiproteasas, apoptosis, destrucción de tejido del parénquima pulmonar y alteración de la proliferación celular [47]. Estos mecanismos difieren según el desarrollo del sistema pulmonar de cada individuo, la susceptibilidad genética, mecanismos epigenéticos entre otros[47].

Desequilibrio del estrés oxidativo en la EPOC

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas inestables ricas en oxígeno, pueden convertirse en donantes o receptores de electrones. Incluye una gran variedad de radicales de oxígeno libre [anión superóxido (O^{2-}) y el radical hidroxilo (OH^{-})] y derivados de oxígeno [peróxido de hidrógeno (H_2O_2)]. La contaminación del aire en interiores y el humo del cigarro, tienen la capacidad de producir ROS, potenciando su participación en la EPOC [48]. Las células fagocíticas activadas (neutrófilos y macrófagos), también producen grandes cantidades de ROS cuando son estimuladas por partículas inhaladas u otros mediadores de la inflamación [49].

El pulmón tiene gran reserva de agentes antioxidantes como el glutatión, ascorbato, vitamina E y superóxido dismutasa (SOD), la exposición a humos nocivos provoca agotamiento de estas moléculas antioxidantes, esto contribuye al daño oxidativo del tejido. La regulación a la baja de las vías antioxidantes se ha asociado con exacerbaciones agudas de la EPOC. En un modelo *in vitro*, de células epiteliales respiratorias tratadas con H_2O_2, se obtuvo asociación entre la inducción de la acetilación de las lisinas de la histona 4 y mayor liberación de IL8

en el sobrenadante del cultivo celular, esta correlaciona de forma positiva con el aumento de neutrófilos en lavado bronquioalveolar ($r=0.818$, $p<0.0001$) [50].

Un estudio realizado a partir de muestras de esputo inducido en mujeres de la India con un índice de exposición al humo de leña (IEHL) de 120 horas año comparando con mujeres que utilizaban gas licuado de petróleo (GLP) como combustible, demostró que, la generación de ROS se aumentó 2 veces más en el grupo de mujeres que utilizaban leña para cocinar (706.4 ± 67.9 vs 338.3 ± 39.4, $p<0.001$) cuando compararon el grupo control, la cantidad de SOD en células de esputo disminuyó cerca de un 31% en los usuarios de biomasa con respecto a las de las mujeres usuarias de biomasa. Mediante un análisis de regresión logística multivariada, controlando edad, ingreso familiar y lugar de la cocina como posibles variables de confusión, resultó una fuerte asociación positiva entre la generación de ROS y el nivel de PM10 medido en el interior de la vivienda (OR = 1.35, IC 95% 1.13-1.78) [51].

Se ha propuesto que, el humo de biomasa afecta la homeostasis del hierro en las células pulmonares; cuando el material particulado (PM) se aloja en el tracto respiratorio inferior, secuestra hierro de los tejidos, disminuyendo la disponibilidad de dicho metal para las células. Los intentos de las células para restablecer esta falta de hierro, conducen a una mayor importación y reducción de hierro a través de la reacción de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$), este mecanismo, genera mayor cantidad de ROS en el proceso [52].

Desequilibrio de proteasas y antiproteasas en EPOC

La hipótesis del sistema proteasas y antiproteasas se formuló hace más de 50 años, basado en el supuesto de que, el enfisema y la destrucción del tejido pulmonar se debe a un desequilibrio entre las proteasas y sus inhibidores [53]. La deficiencia genética de *SERPINA1*, gen que codifica alfa-1-antitripsina (AAT), principal inhibidor de la elastasa de neutrófilos en el tracto respiratorio es el factor genético mejor documentado, sin embargo, se presenta en el 1-2% de la población con EPOC. En el gen *SERPINA 1*, existen dos variantes de riesgo, PiZ (rs28929474) y PiS (rs17580) [54], sujetos con genotipos SS, SZ, ZZ expresan menores concentraciones séricas de la proteína de 85, 25 y 15% respectivamente, en comparación con los niveles que expresan los sujetos sin estas variantes [55]. Entre otras proteínas importantes en este mecanismo se encuentran las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), son una familia de 25 endopeptidasas dependientes de zinc [56]. En pacientes con EPOC las MMP2, -9 y -12 se encuentran en mayor concentración [57], este tipo de moléculas fragmentan elastina, ésta va a funcionar como un potente agente quimioatrayente para monocitos, contribuyendo al aumento de inflamación [58, 59].

Al evaluar MMPs, en sangre de pacientes con EPOC, MMP-2 y MMP-3 se encuentran en mayor concentración con respecto al grupo control y MMP-2 correlacionó positivamente con la edad de inicio de EPOC, especialmente en mujeres ($r=0.730$, $p=0.040$). Estos resultados sugieren que, el aumento de los niveles de MMP-2 y -3, pueden acelerar la remodelación de la matriz extracelular y contribuir a la gravedad de la enfermedad [60].

Proceso inflamatorio en EPOC

La inflamación es un fenómeno presente, en la EPOC por exposición al humo de cigarro existe un aumento de neutrófilos (especialmente en las fases agudas), macrófagos y linfocitos T (CD8+) en diferentes áreas del pulmón. Las células inflamatorias activadas liberan una serie de mediadores: leucotrieno B4 (LTB4), interleucina 8 (CXCL-8), factor de necrosis tumoral (TNF) y otras citocinas como IL1β, IL6, e IL10 que son capaces de provocar daño o lesionar las estructuras del pulmón y perpetuar el proceso inflamatorio donde predominan los neutrófilos [50, 61].

Estudios provenientes de biopsias indican que, el pulmón del fumador se encuentra inflamado [62], muestras de esputo inducido [63] y experimentos realizados *in vitro* [64] revelan la presencia de infiltrados de estas células inflamatorias con predominio de neutrófilos y macrófagos y presencia de moléculas como IL6. El receptor soluble de IL6 (sIL-6R) se encuentran significativamente elevado en los pacientes con EPOC en comparación con sujetos fumadores (166.4 pg/mL *vs*. 101.1 pg/mL, $p < 0.05$), lo que sugiere un aumento en la señalización de esta citocina. IL-6 promueve la inflamación crónica y parece que el aumento de sIL-6R desempeña un papel clave en la mediación de estos efectos en los pulmones de los pacientes con EPOC [74.] Por otro lado, las concentraciones séricas de IL1β se encuentran significativamente más elevadas en sujetos con EPOC por tabaquismo con exacerbación cuando se comparan con sujetos con EPOC estables y sujetos controles sanos, (12.73±3.16 vs 6.19±2.44 vs 2.66±0.52 pg/mL, respectivamente); se observa la misma tendencia cuando se cuantifica las concentraciones de IL17 en muestras de suero en los mismos grupos (63.10±10.78 vs 50.47±8.94 vs 32.50±5.40 pg/mL). Se observó correlación positiva entre IL17 e IL1β (r=0,741, p

<0,001); se sugiere que IL1β, puede ser un factor importante que contribuye a la elevación de IL17 en pacientes con EPOC por exposición al humo de cigarro [65].

Existen múltiples evidencias de que, la exposición al humo de biomasa también promueve un estado inflamatorio en el pulmón; un reporte realizado en mujeres expuestas a humo de biomasa observó que, el número absoluto de neutrófilos en el esputo fue 1.3 veces mayor en comparación con mujeres usuarias de gas LP. El 23.6% de las mujeres usuarias de biomasa, presentó neutrofilia en el esputo (neutrófilo ≥ 75%) en contraste con el 12.9% del grupo de mujeres usuarias de gas LP. El porcentaje de linfocitos en el esputo fue ligeramente mayor en las usuarias de biomasa, sin embargo, el número absoluto de linfocitos fue 40% más alto en el esputo de las mujeres que utilizan biomasa comparadas con el grupo control (2.9±0.5 vs. 5.6±0.9, $p<0.05$). Las mujeres que cocinaron con combustibles de biomasa tuvieron 6.9 veces más TNF-α en su esputo en comparación con las mujeres que cocinaron con un gas LP (86.9±28.1 vs. 12.6±6.2 pg/mL, $p<0.001$). De manera similar, las concentraciones de IL6 e IL8 tienen el mismo comportamiento (59.5±11.6 vs. 16.4±4.8 pg/mL para IL6 y 26.7±7.4 vs. 10.1±3.3 pg/mL para IL8) [51]. Los macrófagos desempeñan un papel crucial en la EPOC secundaria a quema de biomasa [66], estas células se colocalizan en zonas enfisematosas; se encuentran en mayor cantidad en las vías respiratorias [67] [68], estas células son reclutadas en pulmón aumentando la liberación de TNF, IL8, péptido quimiotáctico de monocitos 1 (MCP-1) y LTB4 [69] , que contribuyen al reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y eosinófilos en el pulmón [69].

Apoptosis en EPOC

Los primeros estudios en demostrar aumento en la apoptosis en los pulmones de pacientes con EPOC por exposición al humo de cigarro muestran que, las células endoteliales de los capilares, las arteriolas, y ocasionalmente las células epiteliales, intersticiales e inflamatorias como neutrófilos y linfocitos, presentan apoptosis que podría explicar la pérdida de capilares pulmonares y alvéolos durante el desarrollo de enfisema [70]. Otro reporte mostró que, existe fragmentación del DNA, ocasionada por la cascada de señalización apoptótica en células de sitios peribronquiales, intraalveolares y septales de pulmones con enfisema; en este mismo estudio, al analizar la expresión del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) en pulmones normales y pulmones con enfisema, detectaron menor expresión de dicha proteína en los pulmones de pacientes con enfisema [71].

En EPOC secundaria a humo proveniente de la quema de leña, se han realizado estudios *in vitro* para analizar los efectos citotóxicos y genotóxicos ocasionados por PM generadas por la quema de pellets de madera (serrín natural seco y prensado, en forma de cilindros muy pequeños, de unos pocos milímetros de diámetro), carbón vegetal y madera; para ello emplearon la línea celular A549 de pulmón humano, se observó disminución de la viabilidad celular dependiente de la dosis de PM10 cuando fueron quemados los pellets y la madera; la viabilidad celular se encontró afectada por el carbón vegetal. Las células A549 expuestas a 5 $\mu g/cm^2$ de PM de carbón vegetal y madera no mostraron alteraciones del ciclo celular, mientras que las expuestas al PM de pellets sí presentaron alteraciones.

Las células expuestas a pellets presentaron un aumento significativo en la fase G0-G1 con una disminución paralela en las fases S y G2 [72].

Genes asociados a EPOC mediante estudios de genoma completo (GWAS)

Polimorfismos genéticos ubicados en el gen que codifica para la proteína Alfa 1 anti tripsina (AAT), es el principal factor de riesgo conocido para padecer EPOC, sin embargo, solo explica entre el 1 y 2% de los casos de este padecimiento. A partir de esto, ha surgido un interés en la identificación de genes asociados al riesgo de desarrollar la enfermedad [73].

Los estudios de genoma completo (GWAS), caracterizados por ser libres de hipótesis y genotipificar miles de variantes a lo largo de todo el genoma, han identificado nuevos loci de susceptibilidad para la patología.

En 2009, se llevó a cabo el primer GWAS en EPOC, para esto emplearon un diseño en varias etapas, se incluyeron casos (EPOC por humo de cigarro) y controles (fumadores sin EPOC); analizaron 1,633 participantes; reportaron 2 polimorfismos tipo SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) en el *locus CHRNA3/5* en el cromosoma 15 (rs803491, $p=1.48\times10^{-10}$ OR= 1.43 y rs1051730, $p=5.74\times10^{-10}$ OR=1.32), éstos se encontraron asociados significativamente con riesgo de padecer EPOC en dos cohortes de replicación ICGN (Red Internacional de Genética de la EPOC) y NETT (Ensayo Nacional de Tratamiento de Enfisema)-NAS (Estudio de Envejecimiento Normativo) [74]. Posteriormente en 2010, un GWAS en EPOC en tres cohortes poblacionales, donde incluyeron 2,940 fumadores y 1,380 exfumadores con función pulmonar normal, identificaron un nuevo *locus* de menor riesgo en 4q22.1 en el gen *FAM13A* (rs7671167, OR= 0.76,

$p=8.6\times10^{-8}$) y replicaron esta asociación en un nuevo grupo de casos y controles de la cohorte COPDGene (n=1,006) y dos cohortes basadas en familias (la cohorte de Boston Early-Onset COPD (EOCOPD) y la cohorte ICNG) (n=3,808), la asociación del polimorfismo rs7671167 con menor riesgo de padecer EPOC se mantuvo para *FAM13A* (OR=0.77, $p=1.2x10^{-11}$) [75].

Mediante un GWAS y un metaanálisis realizado en 2,380 individuos con EPOC, con caracterización tomográfica de enfisema, en tres cohortes independientes reportaron que, el rs10844154 en *BICD1* (cromosoma 12) se asoció significativamente con niveles de enfisema ($p=5.2\times10^{-7}$, OR=1.46 para enfisema leve y $p=4.8\times10^{-8}$, OR=1.56 para enfisema moderado) [76]. Un metaanálisis donde evaluaron la función pulmonar en 20,890 participantes de ascendencia europea, identificaron 6 polimorfismos en 3 *loci* asociados significativamente con mejor función pulmonar, entre estos se encontró el rs1980057 (cercano a *HHIP*) (β=0.51, $p=4.9x10^{-10}$); rs2070600 (*AGER)* (β=1.0, $p=3.15x10^{-14}$); rs10947233 en *PPT2* (β=1.10, $p=6.66x10^{-12}$), el rs7735184 en *HTR4* (β=0.37, $p=6.23x10^{-11}$). Por otro lado, el rs1032295 cercano a *HHIP* (β=-0.47, $p=6.28x10^{-9}$) y rs11168048 (*HTR4*) (β=-0.40, $p=1.08x10^{-11}$) se asociaron a una menor función pulmonar [77].

Como se ha descrito previamente, el desarrollo de EPOC se ha asociado a factores genéticos [75–77], ambientales [78] y las interacciones entre éstas [79]. No obstante, los estudios de asociación de genoma completo, así como los estudios de interacción del genoma (GWIS), han logrado identificar múltiples variantes genéticas en genes asociados a susceptibilidad para el desarrollo de EPOC, a la disminución o mejora de la función pulmonar, exacerbaciones, etc., sin embargo,

aún falta por explicar la participación de otros mecanismos biológicos importantes en la regulación de estos genes, uno de ellos es la epigenética.

Epigenética

La definición clásica de Conrad H. Waddington de 1950 establece que, “un rasgo epigenético es un fenotipo heredable, resultado de cambios en un cromosoma sin alteraciones en la secuencia de la molécula de ADN” [80]. El termino epigenética se define como, interacciones causales entre los genes y sus productos, que permiten la expresión fenotípica; este término fue empleado por primera vez para referirse a las complejas interacciones entre el genoma y el medio ambiente las cuales, están involucradas en el desarrollo y la diferenciación de organismos superiores [81]. En la actualidad, se refiere a alteraciones hereditarias sin afectación en la secuencia del ADN como la metilación, RNAs no codificantes y la modificación de los núcleos de histonas (figura 1); estos mecanismos afectan la accesibilidad a la secuencia del ADN y la estructura de la cromatina, originando la regulación de los patrones de expresión génica a niveles transcripcionales, postranscripcionales, o bien traduccionales y postraduccionales; de igual forma, participan en el silenciamiento génico mediado por RNA no codificante, acción de delimitadores (insulators) dependientes de la metilación y proteínas del grupo Polycomb y Tritorax [81,82].

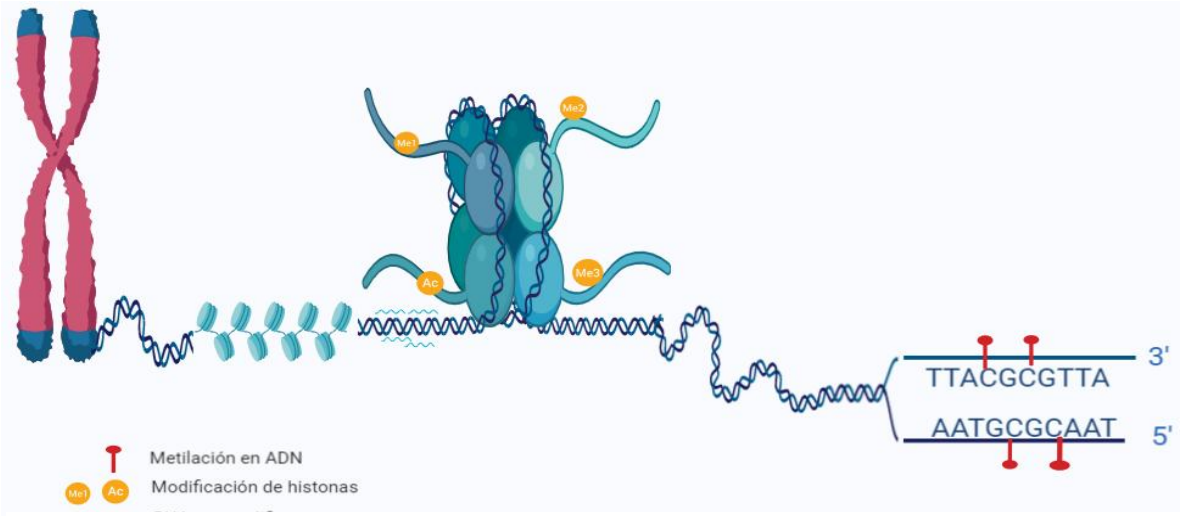

Figura 1. Principales modificaciones epigenéticas. Metilación del DNA, modificaciones de histonas y RNAs no codificantes. El diseño de la imagen se realizó en Biorender.com

Estos procesos epigenéticos son cruciales en el desarrollo de los individuos, así como en la diferenciación de los diferentes linajes celulares en el organismo [81]. Marcas epigenéticas incorrectas pueden provocar anormalidades desde el feto, como la falta de cierre del tubo neural, paladar hendido, trastornos no disfuncionales como el síndrome de Down y la trisomía 18. El folato, un importante componente nutricional en los alimentos, desempeña un papel importante en la metilación, puede influir en la producción de metionina por la remetilación de homocisteína en forma de 5-metiltetrahidrofolato. Se ha reportado que, el defecto o la escasez de folato en la dieta en adultos puede contribuir a la carcinogénesis colorrectal a través de la hipometilación del ADN genómico [83]. En estudios recientes, se ha informado que, las mujeres que usan píldoras anticonceptivas orales, tienen niveles más bajos de metilación del ADN en comparación con aquellas que no las usan ($p=0.033$) [84].

Por otro lado, al estudiar perfiles de metilación de mujeres en edades entre 49 y 75 años reportaron que, las marcas epigenéticas se modifican con la edad, encontraron 213 sitios que se hipermetilan con el aumento de los años y 147 sitios que pierden la metilación [85]. La hipometilación del ADN y los altos niveles de homocisteína, asociados con una dieta baja en consumo de folato en la edad adulta, es un factor de riesgo importante para el cáncer de colon, mama, páncreas, cuello uterino, bronquios y leucemia [86].

Existe evidencia experimental del papel que juegan las modificaciones epigenéticas en la expresión génica, sin embargo, muchos aspectos están aún sin comprender del todo. En los últimos años los análisis de metilación global, utilizando nuevas tecnologías para la secuenciación de nueva generación como los análisis de epigenoma completo, epigenoma de la cromatina y análisis de RNA no codificantes, han permitido un crecimiento acelerado en el conocimiento de la cantidad y el detalle de muchos datos relacionados con estas modificaciones epigenéticas [86]. Estos cambios epigenéticos se encuentran alterados por fuentes externas como las exposiciones ambientales, dieta, nutrición, medicamentos y productos farmacéuticos e infecciones por retrovirus, así como por fuentes internas como el envejecimiento, la dieta, estrés y niveles de ejercicio de cada individuo; esto hace que, las modificaciones epigenéticas sean más difícil de estudiar [86], sin embargo, tener una mejor comprensión del papel que desempeñan los mecanismos epigenéticos en el desarrollo de enfermedades comunes y complejas como la EPOC, nos puede ayudar a comprender mejor esta enfermedad.

Modificación de histonas

En eucariontes el ADN se encuentra empaquetado en forma de cromatina en el núcleo, en este último, la cromatina se organiza en dos áreas estructuradas diferentes, llamadas heterocromatina y eucromatina. La heterocromatina constituye la mayor parte del material nuclear, incluyendo los telómeros y las regiones pericentroméricas; estas regiones tienden a ser ricas en secuencias repetidas y con bajo contenido génico [87]. El resto del genoma está formando por eucromatina, es material genético transcripcionalmente activo y contiene la mayoría de los genes. Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas, en los seres humanos consisten de 147 pares de bases (pb) de ADN envueltos alrededor de un octámero de proteínas denominadas histonas. El núcleo de histonas $(H2A)_2$, $(H2B)_2$, $(H3)_2$ y $(H4)_2$ forman el octámero llamado nucleosoma. Estas histonas tienen un dominio carboxilo terminal y una cola amino terminal [88]. Las histonas centrales son predominantemente globulares, excepto por sus extremos amino terminales. Las modificaciones covalentes de las histonas son un mecanismo epigenético esencial de la regulación génica, estas modificaciones postraduccionales (metilación de lisinas y argininas, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y ADP-ribosilación) ocurren con mayor frecuencia en las colas amino terminales [89] El cambio en la carga eléctrica de las histonas origina la transformación de la estructura de la cromatina, de la conformación cerrada pasa a la forma abierta, esto genera la activación o inhibición de la transcripción de genes [89] y es un mecanismo de regulación de los mismos.

Micro RNAs

Un mecanismo epigenético adicional es la producción de micro RNAs los cuales funcionan como una molécula guía en el silenciamiento de genes a nivel postranscripcional, esto mediante el emparejamiento de bases con los mRNAs objetivo, lo que conduce a la escisión del mRNA o la represión de la traducción [90]. Los micro RNAs son pequeños RNAs reguladores que no codifican proteínas (~22 nucleótidos de longitud) se producen en el núcleo de la célula y luego se exportan al citoplasma. Los complejos de micro RNAs maduros pueden actuar dentro de la célula o ser secretados en el compartimento extracelular para facilitar la comunicación entre células. Tienen el potencial de afectar el desarrollo y la progresión de casi todas las enfermedades humanas a través de interacciones con mRNA [91]. Los micro RNAs con reconocimiento parcial con su mRNA blanco, reprime de manera parcial la producción de la proteína; un reconocimiento más completo, ocasionará silenciamiento de este mRNA. Mediante predicciones *in silico*, se estimó que, entre el 10 y el 30% de todos los genes humanos son objetivo para la regulación mediante micro RNAs [92].

Metilación del ADN

El mecanismo epigenético más estudiado en los humanos es la metilación de la citosina, ocurre por modificación covalente del carbono 5 de la citosina (5-metil citosina, 5mC), se encuentran presentes, en su mayoría, en dinucleótidos CG dentro del genoma. Los dinucleótidos CG tienden a estar en secuencias llamadas islas CpG [93], estas son definidas como regiones que van desde 200 bases a varias kilobases, poseen un contenido de guaninas y citocinas por lo menos de un 50% [94].

Estas regiones se sobreponen con el 50 al 60% de las regiones promotoras de los genes humanos; se estima que, aproximadamente, el 1% del total de las bases nitrogenadas en el genoma humano son 5mC [94]. Mediante un ensayo *in vitro*, se mostró la existencia de otros posibles sitios no CpG con adición de grupos metilo en el carbono 5 de la citosina (CpA, CpT y CpC), la metilación en sitios CpA (6.68%) es la segunda más frecuente, seguido de la metilación en sitios CpT (1.48%) y por último en sitios CpC (0.63%) [95]. La metilación del ADN se lleva a cabo mediante enzimas de la familia ADN metiltransferasas (DNMT), catalizan la transferencia de un grupo metilo del S-adenosil metionina (SAM) al carbono 5 de la citosina [96]. Los folatos, en la forma de 5-metil tetrahidrofolato, están involucrados en la remetilación de homocisteína a metionina, un precursor de SAM, después de transferir el grupo metilo, SAM es convertido a S-adenosilhomocisteina (SAH), un potente inhibidor de las DNMTs dependientes de SAM [83]. De esta manera, el ácido fólico y la vitamina B12 poseen un importante papel en la metilación del ADN [83]. La estructura de las DNMTs incluye 3 partes: 1 dominio regulador amino terminal, un dominio catalítico carboxilo terminal y una región central de unión [97].

En mamíferos se han reportado 5 miembros de la familia de las DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L, sin embargo, solo DNMT1, DNMT3a y DNMT3b tienen actividad de metiltransferasa [89]. DNMT2 es estructural y funcionalmente diferente, no posee el dominio regulador N-terminal y aunque tiene un dominio catalítico en su extremo carboxilo-terminal, no puede catalizar el proceso de metilación de *novo* o de mantenimiento debido a la ausencia del

dominio amino-terminal que permite a otras enzimas DNMT unirse a secuencias de ADN y otras proteínas reguladoras [98]. La DNMT 3-like (DNMT3L) es una proteína nuclear y no presenta motivos de sitios activos de metiltransferasa, no puede agregar activamente grupos metilo a los residuos de citosina, sin embargo, permite la actividad de las metiltransferasas de *novo*, DNMT3A y DNMT3B al unirse a sus dominios carboxilo-terminales [98]. DNMT3A y DNMT3B son metiltransferasas *de novo*, encargadas de establecer el patrón de metilación de citosinas en el ADN no metilado y los patrones de metilación durante el desarrollo embrionario, cuando las marcas de metilación del ADN son restablecidas después de la demetilación genómica para la reprogramación epigenética [96,99]. A pesar de que la DNMT3A es altamente específica para sitios CpG, también lleva a cabo metilación en residuos de citosina no CpG [98]. La DNMT3B está especializada para la metilación en dinucleotidos CpG en repetidos de ADN presentes en regiones satélites pericéntricas de los cromosomas [100,101]. Por último, DNMT1 es una metiltransferasa de mantenimiento, tiene preferencia de 30 a 40 veces por ADN hemimetilado (secuencia de ADN con una de las cadenas metilada y la otra no), sin embargo, también tiene actividad de DNMT *de novo* [102]. Es la más abundante de las ADN metiltransferasas. Tiene un papel importante en el mantenimiento de la metilación, donde las cadenas de ADN hemimetilado son metiladas de manera permanente por la DNMT1 durante la replicación semiconservativa del ADN [103].

El mecanismo de metilación del ADN bloquea la transcripción de diferentes maneras, un mecanismo potencial es mediante la interferencia con la unión de factores de transcripción a tales sitios [104].

La 5mC inhibe la unión de ciertos factores de transcripción que contienen secuencias CpG en sus sitios de reconocimiento (E2F, CREB, AP2, cMyc/ Myn y NFkB) [104]; otro mecanismo importante involucra proteínas o complejos proteicos que se unen específicamente a sitios CpG metilados y bloquean indirectamente la unión de los factores de transcripción, limitando su acceso a los elementos reguladores. Estas proteínas contienen dominios conservados de unión a ADN metilado (MBD, methyl binding domain). Esta familia de proteínas consta de cinco miembros bien caracterizados (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4). Las proteínas MBD se asocian con promotores de islas CpG hipermetiladas de genes supresores de tumores y propician su silenciamiento transcripcional. De hecho, la mayoría de los promotores hipermetilados están ocupados por proteínas MBD, mientras que los promotores no metilados generalmente carecen de estas [96].

Evaluación de la metilación en el genoma humano por estudio de epigenoma completo (EWAS).

Existen distintas técnicas para evaluar la metilación del ADN, sin embargo, el uso de matrices para el análisis de epigenoma completo es la forma más rentable, debido a la amplia cobertura genómica [105]. La secuenciación genómica con modificación con bisulfito de sodio es el “estándar de oro” para determinar el estado de metilación de una secuencia de ADN [106], los microarreglos de epigenoma completo se han moldeado a partir de los GWAS. Entre las plataformas ampliamente empleadas se encuentra la de la compañía Illumina; el primer diseño empleado fue Infinium I (27K) [107], esta contaba con 27,000 sitios CpG, principalmente en regiones promotoras de los genes, sin embargo, debido a su limitada cobertura, no se reconoció como estudio de epigenoma completo

(EWAS) [105]. Posteriormente, se tuvo disponible el arreglo Infinium II (450K), el cual aumento la cobertura genómica de la plataforma a más de 450,000 sitios CpG combinando el diseño original del ensayo Infinium I y añadiendo un nuevo diseño de sondas. Infinium I y II emplean sondas de 50 pb específicas de un polimorfismo (C/T), creado a partir de la conversión con bisulfito de sodio de las citosinas no metiladas en el genoma, la única diferencia entre los dos tipos de ensayos es que, difieren en el número de perlas que utilizan para identificar un solo *locus*; Infinium I necesita 2 perlas que corresponden a cada locus CpG (una para el sitio metilado (M) y la otra para el estado no metilado (U)] (figura 2a) [105]. El diseño Infinium II utiliza un solo tipo de perla para cada locus CpG y el estado de metilación se determina por la extensión de base única después de la hibridación en el microarreglo de epigenoma completo [105]. Cada *locus* será detectado en 2 colores, la “A” siempre se une al sitio no metilado (“T”), y la “G” se incorpora al sitio metilado (“C”) (figura 2b) [107]. Actualmente se encuentra disponible el microarreglo Illumina Human Methylation EPIC (850k) con 853,307 sitios CpG, analiza 8 muestras en paralelo y utiliza la combinación del Infinium I y II [106]. En esta nueva plataforma se encuentra el 91.1% de los sitios CpG incluidos en el 450K, incluye 413,745 nuevos sitios CpG localizados entre los 22 cromosomas autosómicos y los cromosomas sexuales X y Y [106]. El cromosoma 1 alberga la mayoría de las posiciones (9.4%) y el cromosoma Y la menor cantidad (0.04%) [106].

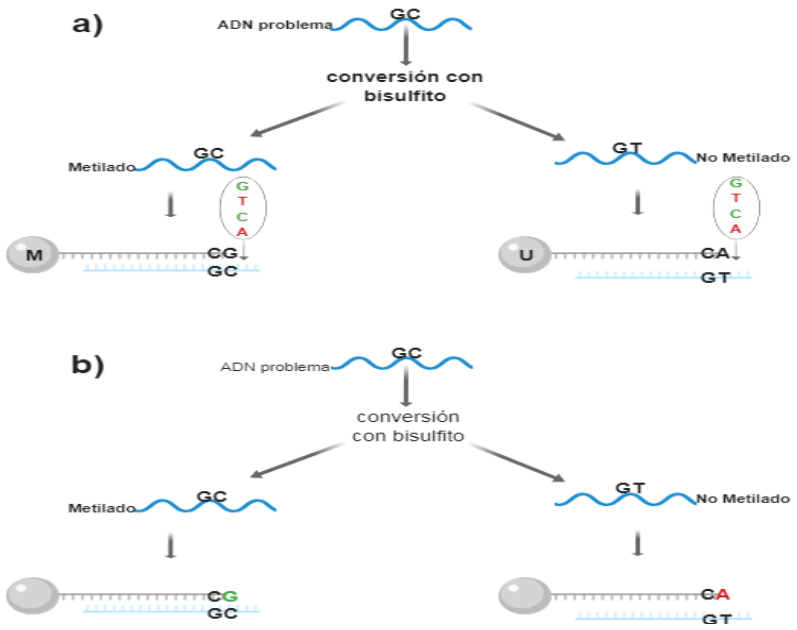

Figura 2Diseño de la matriz MethylationEPIC BeadChip Infinium 850K.

El diseño de la imagen se realizó en Biorender.com [108] **a)** Infinium I. Cada sitio CpG se identifica utilizando 2 tipos de perlas: metiladas (M) y no metiladas (U), ambos tipos de perlas incorporan el mismo nucleótido marcado para el mismo CpG objetivo, produciendo así la misma fluorescencia. El nucleótido que se adiciona está determinado por el nucleótido rio debajo de la "C" del sitio CpG objetivo. La proporción de metilación se puede calcular comparando las intensidades de las dos sondas diferentes en el mismo color. **b)** Infinium II. Cada uno de los sitios CpG objetivo se identifica utilizando un único tipo de perla (una sola perla detecta sitios CpG metilados y no metilados), el estado de metilación se detecta mediante la extensión de una sola base en la posición de la "C", del sitio CpG objetivo, por lo tanto, siempre se produce una adición de un nucleótido "G" o "A" marcado, complementario a la C "metilado" o "no metilado". Cada locus se detecta por dos colores, y el estado de metilación se determina comparando los dos colores desde una posición. Modificado de Bibikova et al. 2011[107].

Según su clasificación funcional, el 25.8% de los sitios CpG se localizan en promotores proximales, 0.9% corresponde a 3'UTRs, 40% a cuerpos genéticos y 33.3% a regiones intergénicas [106]. En relación con el contexto de CpG, el 5.4% de los sitios se encuentran en islas CpG, el 11,4% en las costas de CpG, el 5% en las plataformas de CpG y 78.2% se encuentra fuera de estas regiones ("mar abierto") [106]. Una de las principales ventajas es que, los nuevos CpG incluidos en la matriz de metilación 850K se encuentran principalmente en secuencias con un bajo

contenido de CpG y regiones intergénica (33.3%) que se incorporaron por los datos generados de los proyectos ENCODE (enciclopedia of DNA elements) [109,110] y FANTOM5(Functional Annotation of the Mammalian Genome) [111].

Antecedentes

En los últimos años, se han publicado EWAS que evalúan los cambios epigenéticos y su relación con la exposición al humo de tabaco y el desarrollo de enfermedades pulmonares. Estos estudios han proporcionado evidencia de que, existen cambios en la metilación del ADN asociados con el tabaquismo (tabla 3) [112]. Actualmente, no existen reportes que evalúen estos mecanismos epigenéticos en EPOC secundaria a la quema de biomasa.

En EPOC por tabaquismo el principal sitio CpG asociado se encuentra en el gen *F2RL3* (cg03636183), en población caucásica utilizando el microarreglo 27K, se reportó este sitio hipometilado en fumadores ($p=2.68X10^{-31}$), cuando se replicó en muestras independientes, mediante espectrometría de masas, se mantuvo la asociación ($p=6.33X10^{-34}$) [113]. En 2013, en población caucásica, mediante el microarreglo 450K, nuevamente se encontró hipometilado en fumadores vs no fumadores ($\beta=-14.74$, $p=2.42X10^{-80}$) [114], posteriormente, en 2014 dicho sitio CpG mantuvo el hallazgo (hipometilación) en fumadores cuando los compararon con no fumadores ($p=2.78\times10^{-19}$) [115]. En el 2018 Maaike de Vries y colaboradores reportaron en un estudio de epigenoma completo con el microarreglo 450K en sangre periférica de población caucásica que el sitio cg03636183 se encuentra hipometilado en fumadores ($p=6.53X10^{-8}$) [79]. Se ha reportado que el gen *F2RL3*

participa en la activación de plaquetas, sin embargo, varios estudios han descrito que, la hipometilación en humanos está asociada con el cáncer de pulmón [79].

Otro gen identificado con metilación diferencial es el *AHRR* (represor del receptor de aril hidrocarburo), en población afroamericana el sitio CpG (cg05575921) se encontró hipometilado en sangre y en tejido pulmonar de fumadores comparado con no fumadores ($\beta=-0.009$, $p=0.007$) [116]. En 2013, en población caucásica se mantuvo la hipometilación en fumadores cuando se comparó con exfumadores y no fumadores (cg05575921, $p=2.31x10^{-15}$); en este mismo estudio se realizó una validación de 6 sitios CpG en una población independiente (n=180) empleando pirosecuenciación y análisis de expresión en tejido pulmonar. Los niveles de metilación en *AHRR* se mantuvieron disminuidos ($p<0.001$) y los niveles de expresión estaban incrementados ($p= 0.0047$) en pulmón de fumadores en comparación con no fumadores [117]. En población caucásica fueron reportados dos sitios CpG en el gen *AHRR* diferencialmente metilados al comparar muestras de fumadores, exfumadores y no fumadores (cg05575921, $\beta=-0.00360$, $p=2.86X10^{-11}$, cg21161138, $\beta=-0.00106$, $p=2.99X10^{-2}$), la validación de estos sitios CpG se realizó por pirosecuenciación y mostraron niveles de metilación más bajos en fumadores ($p= 0.00556$) Los fumadores actuales mostraron niveles de metilación de ADN más bajos junto con niveles de expresión más altos en comparación con ex fumadores y nunca fumadores [79].Estudios realizados en tabaquismo y EPOC, han permitido identificar dos clases de sitios CpG, aquellos cuya metilación vuelve a los niveles típicos de aquellos individuos que nunca fumaron y los sitios que permanecen metilados, incluso a más de 35 años de haber abandono el consumo

de cigarro. Estos estudios son de interés para conocer otros mecanismos importantes que pueden estar participando en el desarrollo de la enfermedad y que estos mecanismos epigenéticos no son del todo reversibles [118].

Tabla 3. Estudios de epigenoma completo (EWAS) en tabaquismo y EPOC.*

N° sitios CpG	N° Genes asociados	Microarreglo	Tipo de muestra	Tamaño de muestra	Población	Referencia
1	1	450k	Leucocitos	399	Afroamericana, (USA)	Philibert, (2012) [116]
187	94	450k	Leucocitos	1793	Caucasicos, (Alemana)	Zeilinger, (2013) [114]
3	1	450k	Leucocitos	107	Afroamericana, (USA)	Philibert, (2013) [119]
5	5	27/450k	Leucocitos	972	Afroamericana, (USA)	Sun, (2013) [120]
1260	1120	27k	Cepillado Bronquial	38	Caucasicos, (Canadá)	Emily A. Vucic, (2013)* [121]
30	15	450k	Leucocitos	464	Caucasicos, (UK)	Tsaprouni(2014) [115]
29	15	450k	Leucocitos	192	Caucasicos, (UK)	Elliott, (2014) [122]
8	4	450k	Leucocitos	123	Asiaticos del suroeste, (Qatar)	Zaghlool, (2015)[123]
461	352	450k	Leucocitos	745	Caucasicos, (UK)	Guida F, (2015) [118]
108	29	450k	Leucocitos	100	Asiaticos, (Corea)	Mi Kyeong Lee (2016)* [124]
8	7	450k	Tejido pulmonar	237	Caucasicos, (Italia)	Ryan Stueve (2017) [125]
1	1	450k	Leucocitos	100	Asiaticos, (Corea)	Mi Kyeong Lee (2017)* [126]
14	14	450k	Leucocitos	36	Asiaticos, (China)	Shih-Wei Lee, (2018)* [127]
15	7	450k	Leucocitos	658	Caucasicos, (Holanda)	Maaike de Vries(2018)* [79]
28	25	EPIC/450k	Leucocitos	5191	Caucasicos, (UK)	Mairead L. Bermingham, (2019)* [128]

CpG: sitio CpG, 27K: microarreglo de 27,000 sitios CpG, 450K: microarreglo de 450,000 sitios CpG, EPIC: microarreglo de 850,000 sitios CpG.

Planteamiento del problema

La exposición al humo de leña es un factor de riesgo importante para el desarrollo de EPOC, especialmente en países en vías de desarrollo. Aproximadamente el 50% de la población mundial utiliza leña para cocinar, iluminar y proveer calor en el hogar donde la ventilación es deficiente El principal grupo de personas expuestas al humo de leña son las mujeres, algunas de éstas desarrollan EPOC que se caracteriza por, presentar dificultad para realizar ejercicio, disminución en el nivel de la calidad de vida, mayor disminución de la función pulmonar y en ocasiones la necesidad de oxígeno suplementario. No existen estudios donde se evalúe el patrón de metilación de genes que podrían estar participando en la etiología de la EPOC secundaria a la exposición al humo de leña. Identificar sitios diferencialmente metilados en EPOC por humo de leña, ayudara a identificar nuevas vías fisiopatológicas que participen directamente en el desarrollo de la enfermedad. Estas pueden representar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad.

Justificación

El origen de la EPOC se asocia a la exposición a diversos gases nocivos y partículas, especialmente por el tabaquismo y por la exposición directa a humo preveniente de la quema de leña; esto provoca una respuesta inflamatoria anormal en pulmones y a nivel sistémico. Sin embargo, las causas de la patología son multifactoriales, y pueden incluir factores genéticos, infecciones recurrentes en la infancia y el desarrollo de los pulmones de cada individuo [129]. A pesar de que el humo de tabaco es considerado el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, en nuestro país, la exposición al humo de la quema de biomasa es un problema de salud. Se estima que, la población usuaria de leña en México es de 22.5 millones, de los cuales 16.8 millones son usuarios exclusivos de leña y 5.7 millones utilizan adicionalmente gas LP [18]. La mayor parte de esta población se localiza en las áreas rurales y suburbanas [19]. La EPOC por humo de leña presenta diferencias clínicas a la desarrollada por tabaquismo [130].

Poco se sabe sobre la fisiopatología de la EPOC secundaria a la exposición al humo de leña; evaluar los mecanismos epigenéticos generará conocimiento sobre nuevas vías que participan en dicha enfermedad, con la finalidad de proponer nuevos blancos terapéuticos para la mejora y el tratamiento de los pacientes.

Hipótesis

La exposición al humo de leña modifica los patrones de metilación en genes que participan en el desarrollo de la EPOC y éstos afectan los niveles protéicos respectivos en sobrenadante de esputo inducido.

Objetivo general

Identificar patrones de metilación en genes que participan en el desarrollo de la EPOC secundaria a exposición al humo de leña mediante estudio de epigenoma completo y la afectación de la concentración de la proteína correspondiente.

Objetivos específicos

- Identificar patrones de metilación de pacientes con EPOC secundaria al humo de leña (EP-HL).
- Identificar patrones de metilación en mujeres expuestas a humo de leña sin EPOC (EXP-HL).
- Comparar patrones de metilación en los grupos de estudio.
- Medición de las concentraciones de proteínas extracelulares en sobrenadante de esputo inducido que, posterior al análisis de los niveles de metilación, resulten con diferencias estadísticamente significativas.
- Establecer la relación de la metilación de los genes en el desarrollo de la EPOC por humo de leña.

Metodología
Estudio prospectivo, transversal, observacional, analítico de casos y controles.

Población de estudio
Las mujeres participantes en el estudio fueron pacientes del departamento en investigación en tabaquismo y EPOC (DITABE) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas; el grupo control fueron mujeres expuestas a humo de leña que no desarrollaron la enfermedad, este grupo fue reclutado a partir de las campañas para el diagnóstico oportuno de EPOC las cuales se llevaron a cabo en poblaciones rurales y semi rurales de la república Mexicana, las cuales fueron organizadas por el DITABE. El diagnostico se realizó por medio de exámenes clínicos que estuvieron a cargo de médicos neumólogos especialistas. Las participantes fueron invitadas a participar de forma voluntaria y posterior a la aceptación, firmaron el consentimiento informado correspondiente al estudio, este fue aprobado previamente por el comité de bioseguridad y de ética en investigación del INER (clave de protocolo B18-17) (anexo 1-4). La participación de cada mujer incluida en el estudio consistió en, un llenado de cuestionario de antecedentes heredo patológicos, el registro de las horas de exposición directa a humo de leña, obtención de esputo inducido mediante la nebulización de solución salina estéril al 7% y prueba de espirometría. Una vez en el laboratorio, antes de procesar cada muestra, se asignó una clave alfanumérica con la finalidad de cumplir con los criterios de confidencialidad de datos de cada paciente.

Definición de los grupos de estudio
•Grupo control. Mujeres expuestas al humo de leña sin EPOC (EXP-HL), con exposición directa a humo de leña (≥200 horas por año, por ≥10 años), sin evidencia clínica de EPOC (este criterio fue realizado por neumólogos especialistas del DITABE).

•Grupo de casos: Mujeres con exposición directa al humo de leña con diagnóstico de EPOC realizado por neumólogos especialistas del DITABE (EP-HL) (≥200 horas al año, ≥10 años).

Criterios de inclusión

- Mujeres mexicanas (al menos dos generaciones previas nacidas en México)
- Entre 60 y 85 años
- Para el grupo de controles, sin diagnóstico de EPOC.
- Para el grupo de casos con diagnóstico de EPOC estable

Criterios de exclusión

- Uso de antibiótico en los últimos 3 meses.
- Uso de corticosteroides sistémicos en los últimos 6 meses.
- Uso de inmunosupresores sistémicos en los últimos 6 meses.
- Uso actual de oxígeno suplementario.
- Enfermedad cerebrovascular.
- Tuberculosis activa.
- Cáncer pulmonar.
- Trasplante pulmonar.
- Fibrosis quística.
- Bronquiectasias.
- Asma.

Criterios de eliminación

- Cuestionario de datos incompleto.
- Muestras biológicas insuficientes o de calidad analítica inapropiada.

Cálculo del tamaño de muestra.

a) Ensayo de metilación

Para la evaluación de los niveles de metilación, el número de pacientes con EPOC y expuestos sin EPOC fue calculado mediante el programa G*Power (Figura 3) [131], empleando datos en la literatura, donde, para EPOC por humo de tabaco, fue empleado el gen con sitio CpG ampliamente reportado y validado (*F2RL3,* cg03636183*)*, este presentó una diferencia de metilación del 12% entre fumadores y no fumadores, además de esto, los criterios establecidos fueron: poder estadístico del 95%, significancia de 0.05 (prueba bilateral), relación de 1 caso y 1 control. Bajo estos criterios, el estudio requirió 42 mujeres con EPOC (EP-HL) y 42 mujeres expuestas a humo de leña sin EPOC (EXP-HL).

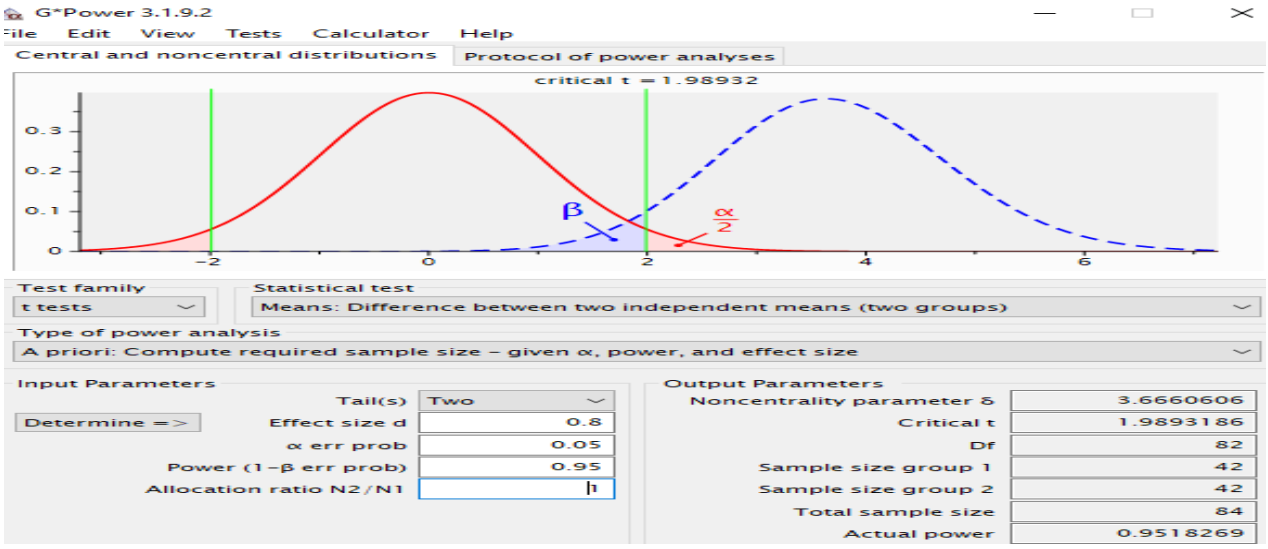

Figura 3. Cálculo del tamaño de muestra en el programa G Power 3.1.9.2.

b) Cuantificación de proteínas

De la etapa anterior, fueron seleccionados 3 genes con diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de metilación asociados a EPOC por humo de leña y cuya proteína pudiese ser medida a nivel extracelular (en sobrenadante de

esputo inducido). Este ensayo se realizó en el 48% de la población original (20 mujeres con EPOC y 20 mujeres expuestas a humo de leña sin EPOC) [117,121].

Obtención de la muestra de esputo inducido

Se tomó una muestra de esputo inducido mediante nebulización con solución salina estéril al 7%, para esto, se pidió a cada paciente que se lavara la boca con agua; la nebulización se llevó a cabo durante 5 minutos con un periodo de descanso de 5 minutos entre cada nebulización. Este procedimiento se realizó 3 veces como máximo de acuerdo con el protocolo establecido por la ERS [132].

Procesamiento de la muestra de esputo inducido destinada para extracción de DNA y cuantificación de proteínas solubles.

Mediante una pipeta Pasteur fue retirada la saliva presente en la muestra de esputo, posteriormente fueron disgregadas las células en solución salina mediante el uso de agujas de 0.9 y 0.7 mm de diámetro. Finalmente fue transferido a un filtro de nylon de 70 μm. El filtrado fue centrifugado a 3500 rpm por un periodo de 10 minutos para obtener dos fases; el sobrenadante del esputo inducido que se almacenó en criotubos a -80ºC para la cuantificación de proteínas solubles por técnica de ELISA y el precipitado de células que fueron destinadas para la extracción de ADN empleando el protocolo recomendado por el proveedor del estuche comercial sputum ADN Collection, Preservation an Isolation kit (Norgen Corporation) (anexo 5).

Cuantificación de ADN

La cuantificación del DNA se realizó con un micro espectrofotómetro de absorción de luz ultravioleta (marca nanodrop 2000 de Thermo Fisher Scientific) a 260 nm de longitud de onda. La contaminación con proteínas se determinó a 280 nm y se consideró una muestra libre de contaminantes cuando la relación 260/280 se encontraba entre 1.7 y 2.0. Cada muestra fue ajustada a una concentración entre 30 y

50 ng/µl en un volumen final de 60µl. La integridad del DNA de las muestras fue evaluada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Conversión con bisulfito de sodio

Se utilizaron 500ng de DNA genómico de cada una de las muestras para la conversión con bisulfito de sodio, esto se realizó siguiendo el protocolo del kit EZ DNA Methylation de (Zymo Research Corporation, Orange, CA, USA) (anexo 6); con este kit, las citocinas no metiladas fueron convertidas a uracilo mediante deaminación, mientras que las citocinas metiladas permanecen sin modificación.

Evaluación de patrones de metilación

Los patrones de metilación fueron evaluados por medio de un microarreglo de metilación (BeadChip EPIC 850k) de epigenoma completo empleando el kit Infinium Methylation Assay Infinium EPIC (Illumina) (anexo 7) el cual cuenta con dos sondas específicas para cada sitio a evaluar, una de ellas está diseñada para el locus metilado (perlas M) y otra para el locus no metilado (perlas U). Fue seguido el protocolo recomendado por el fabricante. La fluorescencia fue medida en el equipo iScan System de Illumina.

Procesamiento de la muestra para determinación de proteínas en sobrenadante de esputo inducido.

De la etapa anterior fueron seleccionados 3 sitios CpG en genes con diferencias estadísticamente significativas en los niveles de metilación y que codifiquen para proteínas extracelulares. Esto con la finalidad de poder cuantificarla en el sobrenadante de esputo inducido. La evaluación de las proteínas se realizó mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA), para esto, las muestras de sobrenadante de esputo se descongelaron gradualmente (de -80°C a -40°C, luego a -20°C y por último a 4°C). Cada muestra se concentró empleando un equipo Concentrator Plus Vacufuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germani) hasta tener un

volumen final de 600 µl. Las muestras fueron analizadas por triplicado y en cada ensayo fue realizada una curva estándar por duplicado (Anexo 9, 10).

Análisis estadístico

Las variables demográficas y las concentraciones de las proteínas en sobrenadante de esputo inducido se analizaron en el ambiente Rstudio versión 3.5.1, para las variables con distribución normal se utilizaron pruebas paramétricas, para las variables con distribución libre se emplearon pruebas no paramétricas. La importación de los archivos de datos de intensidad (IDAT) obtenidos del microarreglo, el control de calidad de los valores de detección de intensidad, la eliminación de sondas no hibridadas y los resultados de los sitios diferencialmente metilados se analizaron mediante el ambiente de Rstudio versión 3.5.1 con los siguientes paquetes bioinformaticos de Bioconductor.siguieno la línea de comando de Jovana Maksimovic para el análisis de datos de microarreglos de metilación adaptado al microarreglo 850k[105]. Los paquetes minfi, IlluminaHumanMethylation EPICkanno.ilmn12hg19, Illumina Human Methylation EPICkmanifest, missMethyl, minfiData y DMRcate son específicos para analizar datos de metilación, mientras que RColorBrewer y Gviz fueron paquetes empleados para la visualización; utilizamos limma para probar la metilación diferencial y los paquetes matrixStats y stringr que poseen funciones utilizadas en el flujo de trabajo. El paquete IlluminaHumanMethylationEPICkmanifest proporciona el manifiesto Illumina como un objeto R que se puede cargar fácilmente en el entorno. El manifiesto contiene toda la información de anotación para cada una de las sondas CpG en la matriz de EPIC 850K. Esto es útil para determinar dónde se ubican las sondas metiladas diferencialmente en un contexto genómico (anexo 8).

Para evaluar la asociación entre las mujeres con EPOC por exposición al humo de la leña *vs* las mujeres expuestas al humo de leña sin EPOC y los niveles de metilación del DNA de células en muestras de esputo inducido fue empleada la prueba de t de Bayes, posteriormente se realizó una corrección por múltiples pruebas para obtener los valores de p corregidos. Se seleccionaron 3 sitios con patrones de metilación significativos y cuya expresión de la proteína fuera extracelular. Para el análisis de la comparación de las concentraciones proteicas entre el grupo de mujeres con EPOC por humo de leña y las mujeres expuestas sin EPOC se empleó la prueba U de Mann-Whitney.

Resultados

El análisis de metilación de genoma completo empleando el microarreglo Illumina Bead Chip EPIC que interroga 853,307 sitios CpG se realizó en 45 mujeres con EPOC por exposición a biomasa (EP-HL) y 46 mujeres expuestas al humo de leña sin EPOC (EXP-HL). Las mujeres con EPOC fueron mayores (mediana de 70 años) en comparación con el grupo de las mujeres expuestas sin EPOC (mediana de 63 años), se observó que hay diferencias en cuanto a las medidas de función pulmonar, el grupo de casos tuvo una mediana del cociente FEV1/FVC de 69.7% vs el grupo de controles que presentan un cociente FEV1/FVC de 81.55%. El índice de exposición al humo de leña (IEHL) de las mujeres con EPOC fue de 398 horas al año, esta es mayor en comparación al grupo control 226.8 horas/año, aunque se observan diferencias en índice de exposición al humo de leña y edad, las mujeres incluidas no presentaron diferencias en cuanto a índice de masa corporal (Tabla 4).

Tabla 4. Características demográficas y clínicas de las mujeres con EPOC por exposición al humo de leña y las mujeres expuestas al humo de leña sin EPOC.

Variable	EP-HL (n=45)	EXP-HL (n=46)	P
Edad (años)	70 (51-85)	63 (47-82)	0.0001**
Peso (kg)	59.79 (±12.085)	57.81 (±9.995)	NS*
Altura (m)	1.45 (1.30-1.56)	1.45 (1.34-1.56)	NS**
IMC (kg/m^2)	28.5 (18.49-43.11)	27.64 (14.89-43.16)	NS**
IEHL (h/año)	398.6 (±185.36)	226.8 (±125.5)	<0.001*
FEV1 (%)	73.5 (41.8 -89)	107 (53-154)	<0.001**
FEV1/FVC%	61.97 (36-69)	81.55 (70-99)	<0.0001**

EP-HL: EPOC por humo de leña, **EXP-HL**= expuestos a humo de leña, **IMC**: índice de masa corporal, **IEHL**: índice de exposición al humo de leña, **FEV1/FVC**: cociente volumen espiratorio forzado en el primer segundo/capacidad vital forzada, **p***: p-value obtenido mediante prueba t de student, **p****: valor de p obtenido mediante prueba Wilcoxon Mann-Whitney.

Control de calidad

La integridad del material genético se evaluó por medio de geles de agarosa al 1% durante 35 minutos a 7 volts/cm (Figura 4), las muestras de DNA que no estaban integras fueron remplazadas del estudio.

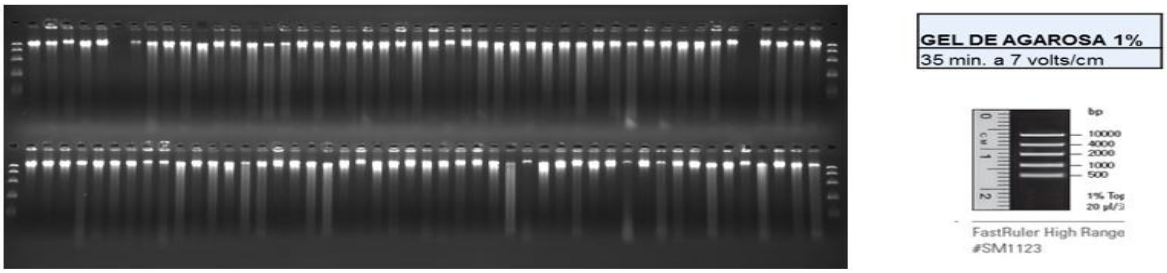

Figura 4. Integridad de las muestras de ADN de muestras de esputo inducido.

Aquellas muestras que cumplieron el criterio de calidad fueron convertidas con bisulfito de sodio para su posterior lectura en el microarreglo de metilación con el uso del escáner Bead Array Reader.

Los datos bioinformáticos recolectados a partir del microarreglo se evaluaron para su control de calidad. En primer lugar, se calcularon los valores p de detección. Se calcularon los valores de detección para cada uno de los sitios CpG en cada una de las muestras, esto es indicativo de la calidad de detección de la señal emitida por las perlas incluidas en el microarreglo. La paquetería de *minfi en el ambiente de Rstudio se empleó* para calcular los valores p de detección comparando la señal total (M+U) para cada sonda con los niveles de señal de fondo, que se calcularon a partir de las sondas control negativo. Los valores de p muy pequeños fueron indicativos de buena señal de detección, por otro lado, los valores de p grandes ($p>0.01$) fueron indicativos de mala señal de detección, por lo tanto, mala calidad en la hibridación de la muestra en el microarreglo de epigenoma completo, las muestras que tuvieron muchas sondas fallidas tuvieron valores de p de detección relativamente grandes (figura 5) en este paso

todas las muestras incluidas en el estudio cumplieron con el criterio de calidad con valores de p de detección <0.002 por lo tanto se consideraron todas las señales de detección de las muestras como adecuadas para incluirlas en los siguientes análisis.

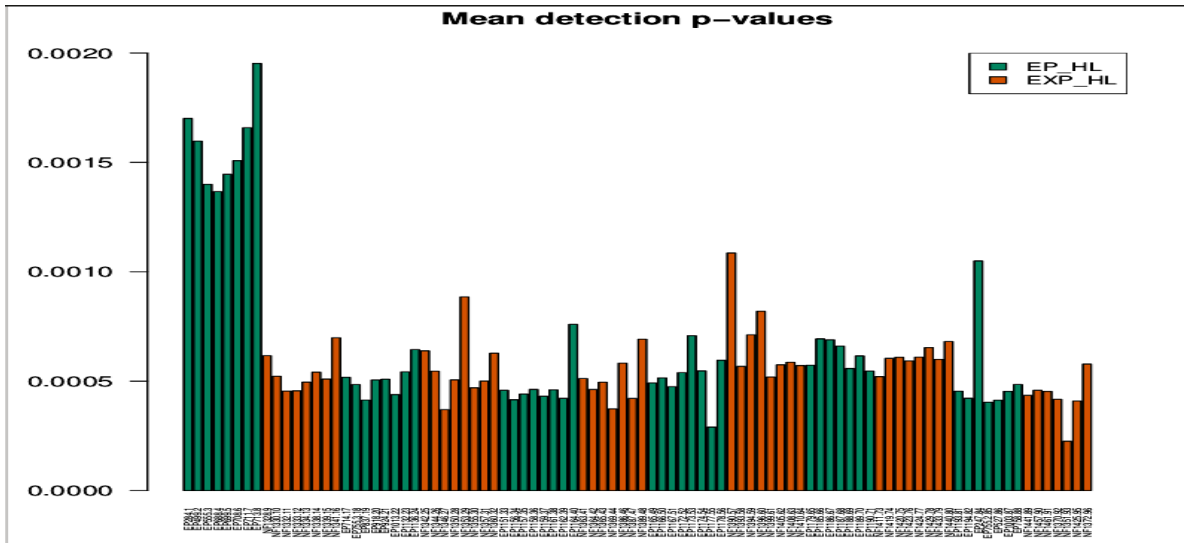

Figura 5. Valores de p de media de detección por muestra.
EP-HL: EPOC por humo de leña, EXP-HL: expuestas al humo de leña sin EPOC.

Normalización

Para minimizar la variación dentro y entre las muestras se utilizó una normalización por cuantiles ya que es el tipo de normalización recomendado cuando se están analizando diferentes tipos de células en las muestras de esputo inducido.

Para la presentación de los datos de normalización de estas muestras se construyeron gráficas de densidad, esta es una representación mucho más compacta de los datos ya que la información del canal de color se descarta y la información de intensidad *M* (metilado) y *U* (sin metilar) se ha convertido en valores M y valores beta, junto con las coordenadas genómicas asociadas. En la figura 6 se presentan los datos antes (Raw) y después de la normalización por cuantiles.

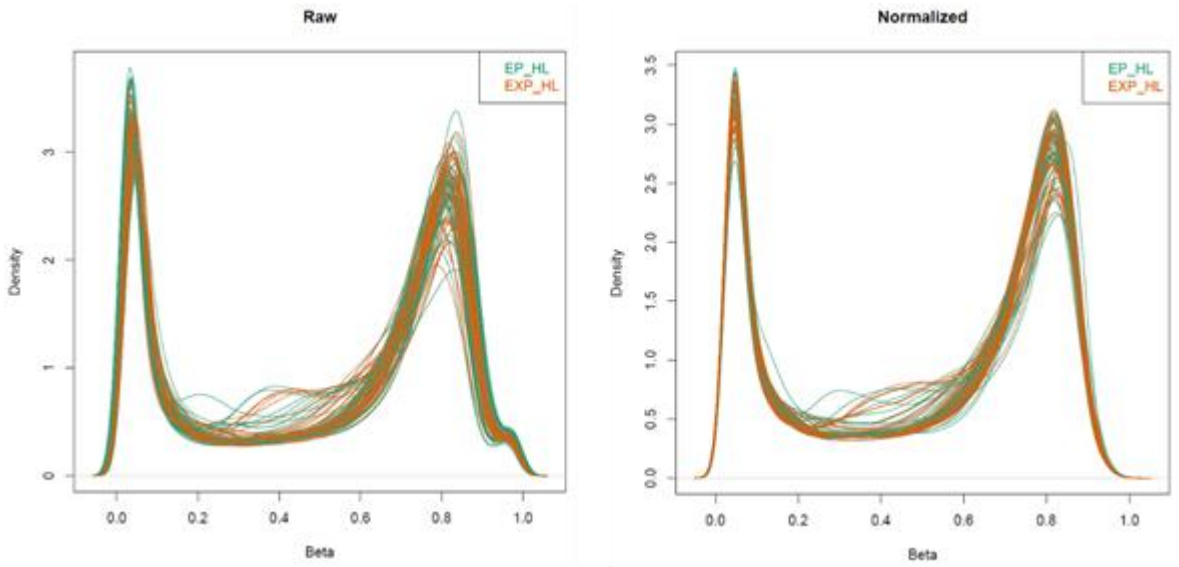

Figura 6. Gráfico de densidad. Muestran los valores beta antes y después de la normalización por cuantiles.
EP-HL: EPOC por humo de leña, EXP-HL: expuestas al humo de leña sin EPOC.

Exploración de datos

Se emplearon gráficas de escalamiento multidimensional (MDS) para la visualización de los datos, con la finalidad de explorar las similitudes y diferencias entre las muestras. La dimensión uno (o el componente principal uno) captura la mayor fuente de variación en los datos, la dimensión dos muestra la segunda mayor fuente de variación en los datos, en la figura 7, se muestra un MDS de las muestras EPOC por exposición al humo de leña (EP-HL) y expuestas a humo de leña sin EPOC (EXP-HL), se observa claramente que se encontraron muestras agrupadas de casos y controles, sin embargo se puede ver que algunas muestras, en conjunto, casos y controles formaron un grupo esto indica que, aunque existen características que muestran que hay diferencias entre casos y controles, también existen similitudes entre algunas muestras de cada grupo.

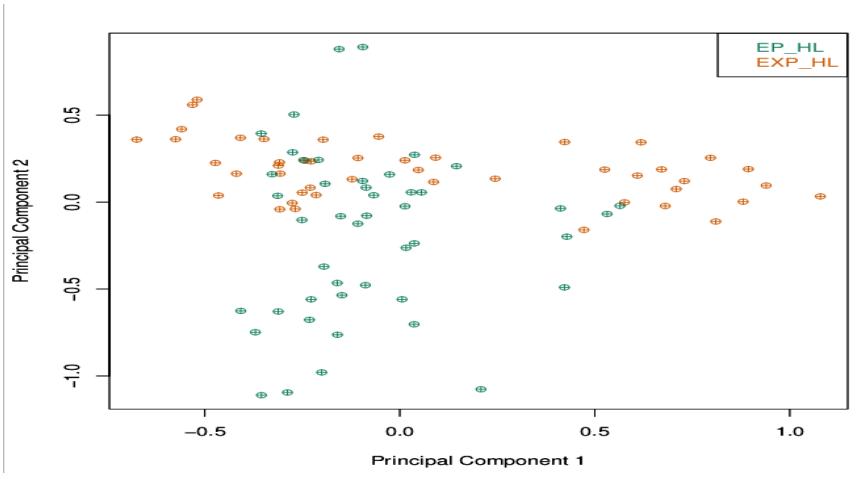

Figura 7. Gráficas de escala multidimensional (MDS).
EP-HL: EPOC por exposición a humo de leña, EXP-HL: expuestas al humo de leña sin EPOC.

Se realizó un filtrado donde las sondas de bajo rendimiento se eliminaron antes del análisis de metilación diferencial. Cuando la señal de estas sondas no es confiable, al eliminarlas no incurrimos en una penalización de prueba múltiple reducida. Filtramos las sondas que fallaron en una o más muestras basadas en el valor de p de detección. Después de este análisis se eliminaron 14,524 sondas del total que incluye el microarreglo. Se omitieron las sondas de las cuales se conoce que tienen SNPs comunes en los sitios CpG y se eliminaron 28,093 sondas, el análisis se continuó con 824,219 sondas después del filtrado. Con estos datos se calcularon los valores beta y valores M (figura 8.), con los cuales se pudieron realizar los análisis de metilación diferencial. Los tipos de perlas se resumen por la señal promedio para los alelos metilados (M) y no metilados (U), y se utilizaron para calcular el valor beta, donde:

β = Max (M.0) /Max (M,0) +Max(U,0) +100

Un valor beta de 0 equivale a un sitio CpG no metilado y un valor de beta de 1 a un sitio CpG completamente metilado.

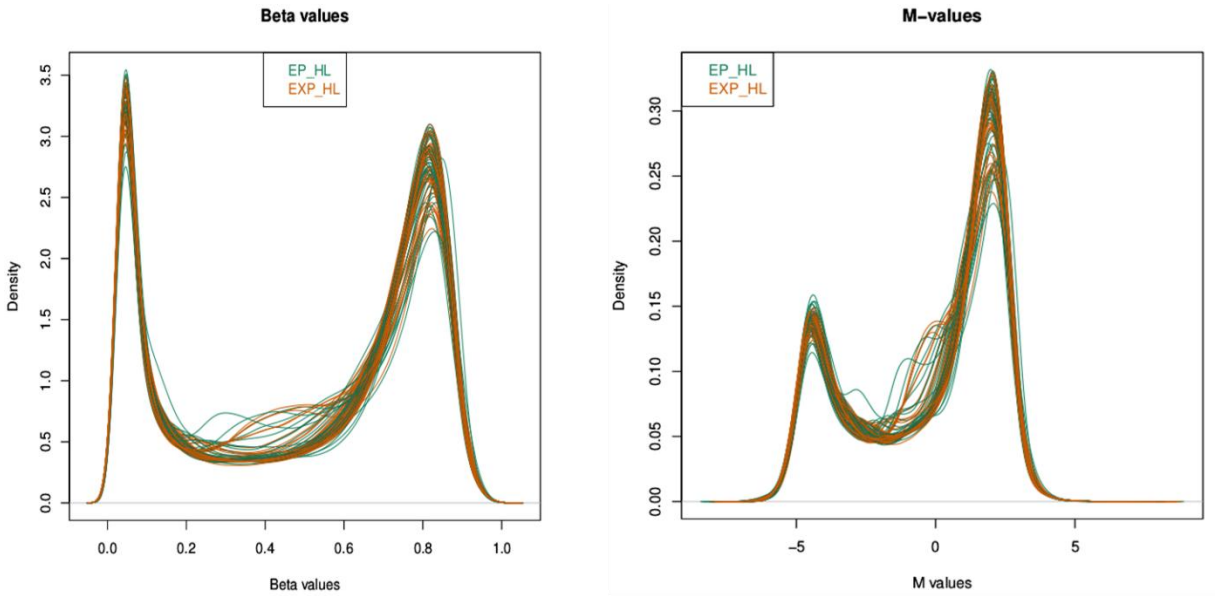

Figura 8. Gráficos de densidad para valores beta y valores M.
EP-HL: EPOC por humo de leña, EXP-HL: expuestas al humo de leña sin EPOC.

Análisis de sitios diferencialmente metilados.

El análisis de sondas diferencialmente metiladas (DMP) revelo 631 sitios metilados al comparar las mujeres con EPOC por exposición al humo de leña EP-HL y expuestas sin la enfermedad (EXP-HL) ($p<0.05$) posterior corrección por múltiples pruebas; de estos, 202 sitios fueron hipometilados (log FC=-0.5) y 429 sitios hipermetilados, (log FC=0.05) (figura 9). El grafico de Manhattan se creó con el paquete qqman en Rstudio donde se puede observar que, múltiples sitios CpG presentan un valor estadísticamente significativo ($p=0.05 \times 10^{-5}$) en diferentes cromosomas (figura 9).

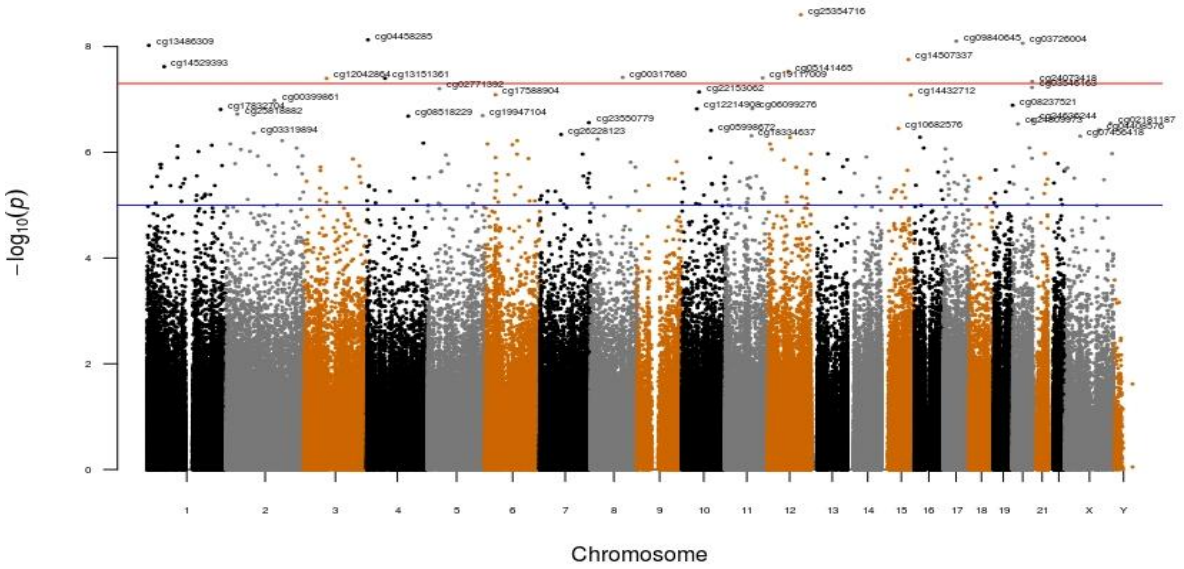

Figura 9. Manhattan plot de sitios CpG diferencialmente metilados en EP-HL y EXP-HL.
cg: sitio CpG, x: cromosoma X, y: cromosoma Y, línea azul: valor de p= 0.00005, línea roja: valor de p=0.0000005.

De manera similar, la gráfica de volcán se generó usando la función de geom_point en el paquete ggplot en Rstudio, para observar los sitios CpG más representativos (Figura. 10), resaltando los sitios CpG con valor de p estadísticamente significativo y el estado de metilación (hipermetilado e hipermetilado) (puntos de color rojo).

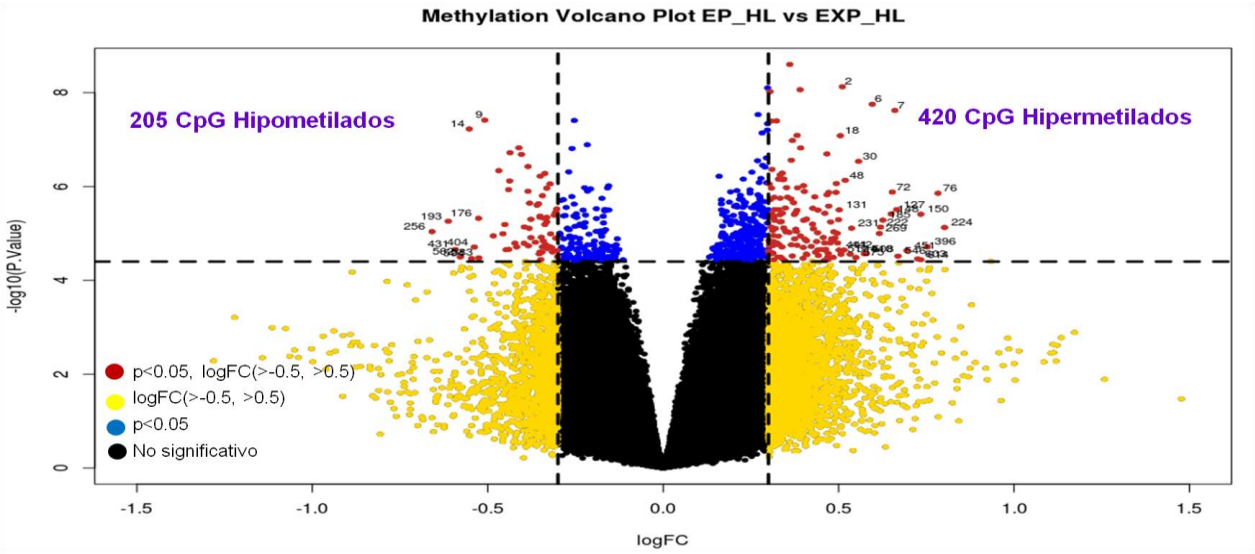

Figura 10. Volcano plot del análisis de metilación diferencial en mujeres con EPOC por humo de leña y expuestos a humo de leña sin EPOC.EP-HL: EPOC por exposición a humo de leña, EXP-HL: expuestos a humo de leña sin EPOC, CpG: Sitio CpG.

En la tabla 5 y figura 11 se presentan los 5 sitios CpG (cg25354716, cg04458285, cg09840645, cg03726004, cg13486309) con las diferencias significativas menores en el análisis de pruebas diferencialmente metiladas, por otro lado, en la figura 10 se observan las gráficas individuales para el top 5 de los principales sitios diferencialmente metilados comparando los valores beta entre el grupo EP-HL y EXP-HL.

Tabla 5. Top 5 de los sitios CpG diferencialmente metilados por análisis de epigenoma completo.

Sitio CpG	Chr	Relación con la isla	Gen	Localización según anotación GENCODE V19	logFC	*p	**p
cg25354716	12	Open Sea	*GNPTAB*	Body	0.361	2.50E-09	0.0015
cg04458285	4	Island	*MSANTD1*	TSS200	0.510	7.46E-09	0.0015
cg09840645	17	Shore	*RPL27*	TSS1500	0.297	7.91E-09	0.0015
cg03726004	20	Open Sea	*C20orf203*	3´UTR	0.390	8.66E-09	0.0015
cg13486309	1	Island	*5772385*	-	0.304	9.51E-09	0.0015

cg: sitio CpG, Chr: Cromosoma, TSS: sitio de inicio de transcripción, logFC: veces de cambio en escala logarítmica, *p: valor de p sin corregir, **p: valor de p corregido por multiples pruebas.

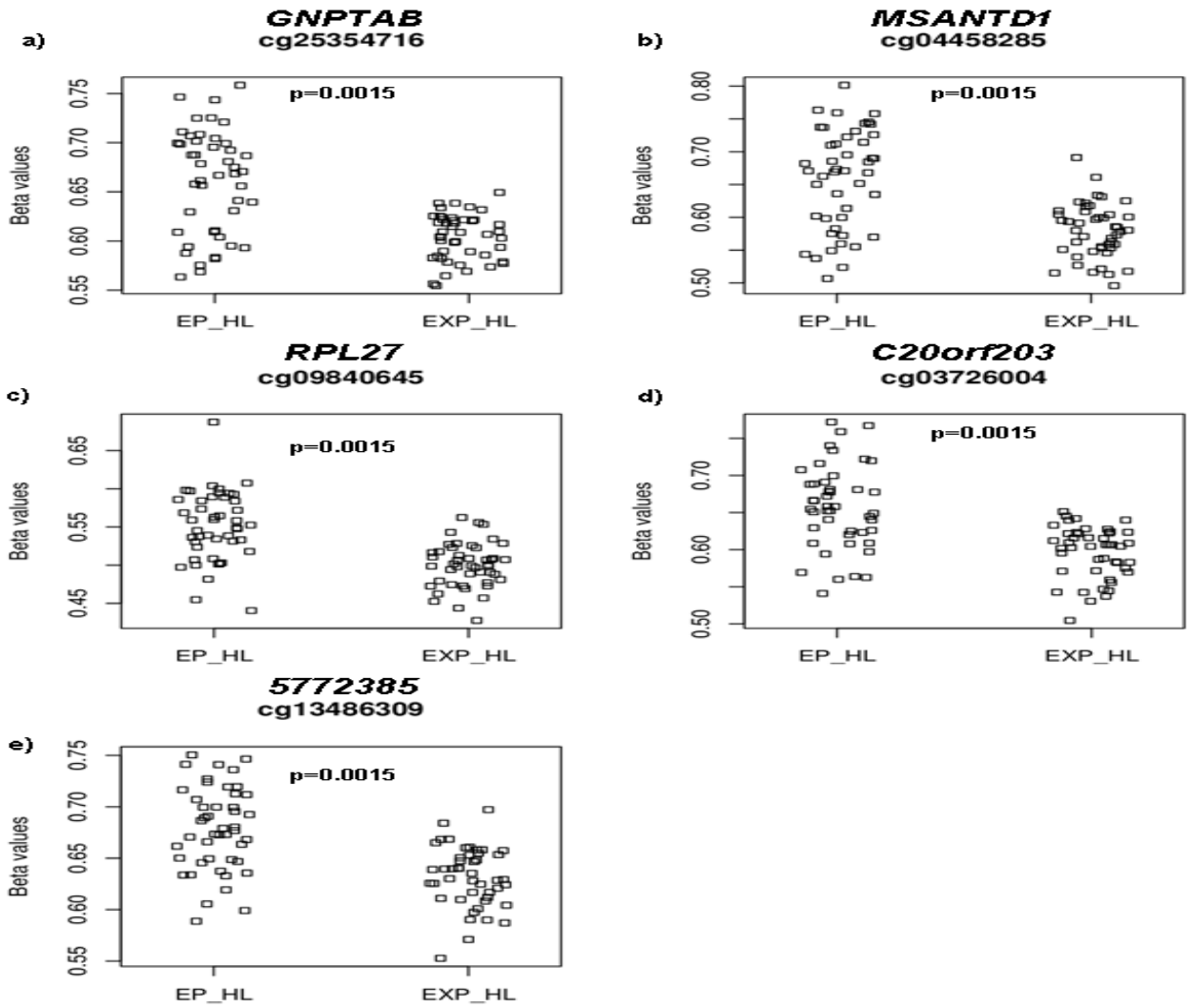

Figura 11. Top 5 de los sitios CpG diferencialmente metilados por análisis de epigenoma completo.

Cuantificación de proteínas en sobrenadante de esputo inducido.

A partir del análisis de los 631sitios metilados diferencialmente, se seleccionaron genes de importancia biológica que pudieran participar en la patogénesis de la EPOC y cuyo producto proteico pudiese ser medido en el sobrenadante de esputo inducido (proteína extracelular), los 3 sitios CpG seleccionados fueron: cg26508775, cg08450425, cg09676860 (tabla 6). Estos sitios se encontraron en los genes *FMOD, EDN1* y *PTEN* respectivamente. La cuantificación de las proteínas solubles en el sobrenadante de esputo inducido se realizó entonces para fibromodulina, endotelina-1 y fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa del sobrenadante de 20 muestras de cada uno de los grupos de estudio por el método de ELISA.

Al cuantificar la concentración de proteínas solubles en el sobrenadante de esputo no se encontró diferencia estadísticamente significativa para las proteínas fibromodulina y fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa, sin embargo, endotelina-1 se encuentró disminuida en las mujeres con EPOC secundaria a exposición al humo de leña 125.05 pg/ml (98.32-194.94) en comparación con las mujeres expuestas al humo de leña sin EPOC 169.33 pg/ml (118.33-264.704, p=0.00054) y esto está relacionado directamente con el estado de metilación del sitio CpG evaluado en el respectivo gen (Figura 12).

Tabla 6. Sitios metilados diferencialmente en genes evaluados en esputo inducido.

Sitio CpG	Chr	Relación con la isla	Gen	Localización de acuerdo a la anotación	logFC	*p	**p
cg26508775	1	Open Sea	*FMOD*	TSS1500	0.518	7.38E-07	0.0127
cg08450425	6	Open Sea	*EDN1*	3'UTR	0.254	2.56E-05	0.044
cg09676860	10	Island	*PTEN*	TSS1500	0.302	2.57E-05	0.044

cg: sitio CpG, Chr: Cromosoma, TSS: sitio de inicio de transcripción, logFC: veces de cambio en escala logarítmica, *p: valor de p sin corregir, **p: valor de p corregido por múltiples pruebas.

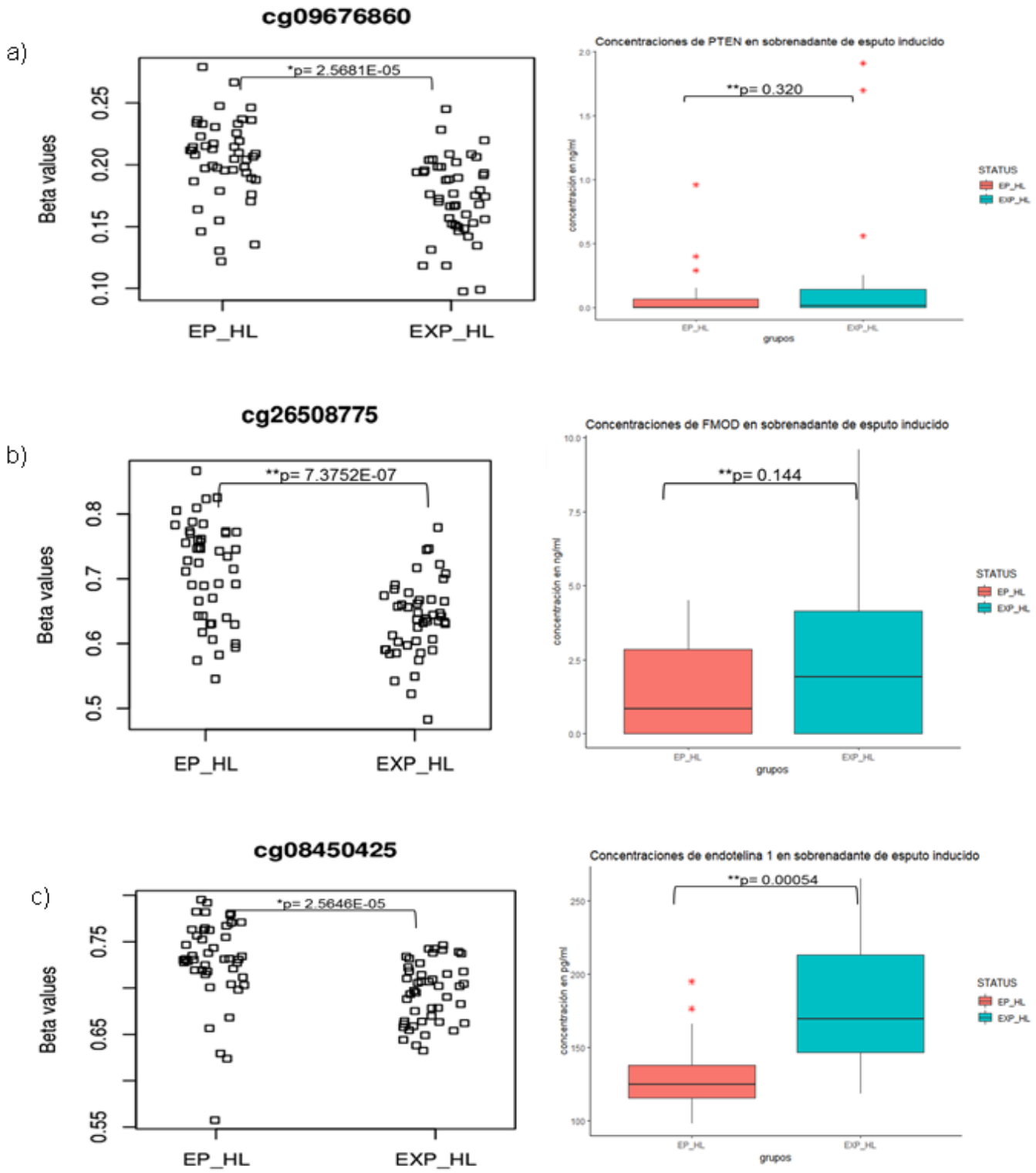

figura 12. Cuantificación de proteínas solubles en sobrenadante de esputo inducido.
a) *Metilación del sitio CpG26508775 en el gen FMOD (Fibromodulina) y concentraciones de la proteína,* ***b)*** *Metilación del sitio CpG09676860 en el gen PTEN (fosfatasa y homologa de tensina) y concentraciones de la proteína,* ***c)*** *Metilación del sitio CpG08450425 en el gen END1 (Endotelina 1) y concentraciones de la proteína. EP-HL: EPOC por exposición a humo de leña, EXP-HL: expuestos a humo de leña sin EPOC, *p= valor de p con prueba de T de bayes, **p= valor de p con prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.*

Discusión

Realizamos un EWAS para investigar el estado de metilación de 45 mujeres mexicanas con EPOC por exposición al humo de leña y 46 mujeres expuestas al humo de leña sin la enfermedad e identificamos 625 sitios CpG diferencialmente metilados posterior corrección por múltiples pruebas. Dentro de estos hallazgos, existen genes de importancia biológica con sitios CpG diferencialmente metilados, un sitio CpG (cg12042864) en el gen *FOXP1* que se encuentró hipermetilado en las mujeres con EPOC en comparación con las mujeres sin EPOC, este gen es un represor transcripcional, actúa en conjunto con FOXP4 para regular el destino y la regeneración de las células epiteliales secretoras de pulmón mediante la restricción del programa de linaje de células caliciformes, reprime la transcripción de varios genes pro-apoptóticos y participa en la señalización de NF-kappa B para promover la expansión de las células B mediante la inhibición de apoptosis dependiente de caspasas [133]; se sabe que FOXP1 se une a los elementos del promotor CSF1R y participa en la regulación de la diferenciación de los monocitos y las funciones de los macrófagos [134], la hipermetilación de este gen podría estar participando en la expresión aberrante de la proteína FOXP1 y evitando la regeneración de células epiteliales en el pulmón de las mujeres con EPOC por humo de leña. Por otro lado, el sitio cg12214908 en el gen *ALOX5* (araquidonato 5-lipooxigenasa), cuya función es la transformación de ácidos grasos en leucotrienos y desempeña una función esencial en los procesos inflamatorios, se encuentra hipermetilado en las mujeres con EPOC. En un estudio de epigenoma completo previamente se había reportado que, aquellos pacientes con EPOC por humo de cigarro, con una buena respuesta al tratamiento con corticosteroides, tuvieron diferentes niveles de metilación de la sonda cg26848724 ($p=7.45X10^{-15}$) en ALOX5AP (proteína activadora de la 5-lipooxigenasa) [127].

Se ha encontrado que los inhibidores de la proteína activadora de la 5-lipooxigenasa (ALOX5AP) son útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluida la EPOC [135]. En este estudio el sitio cg12214908 en *ALOX5* se observó con menor grado de metilación en las mujeres que aún utilizaban leña para cocinar, esto sugiere que la participación de ALOX5 podría ser en exposición temprana y antes del desarrollo de la EPOC propiciando la inflamación pulmonar. ALOX5AP y ALOX5 son objetivos farmacológicos para bloquear la producción de leucotrienos sugiriéndolos como buenos candidatos para el estudio de la eficacia del tratamiento en la EPOC [127].

Entre otros sitios CpG destacados en EPOC por exposición al humo de leña es el ubicado en *GSTO2 (*cg16455757*)*, gen asociado con el metabolismo de xenobióticos; la proteína codificada es una Glutatión S-transferasa de clase omega. Este sitio se encontró hipermetilado en las mujeres con EPOC, suponemos que esto puede impedir que se exprese el gen, reduciendo la eficacia del metabolismo de los xenobióticos.

La familia de proteínas de glutatión está implicada en el metabolismo de xenobióticos y carcinógenos, tiene alta actividad de dehidroascorbato reductasa y puede contribuir al reciclaje del ácido ascórbico. Participa en la biotransformación del arsénico inorgánico y reduce el ácido monometilarsonico (MMA) [136]. Los genes de la familia de Glutation S-transferasa son de gran interés debido a su función en el metabolismo de xenobióticos, como aquellos que se encuentran en el humo proveniente de la combustión de leña. En el 2007 un estudio realizado en una cohorte con sujetos homocigotos con una deleción en el gen *GSTT1* solo o en combinación con una deleción homocigota en *GSTM1* se asoció con un descenso excesivo del valor de FEV1 en hombres, pero no en mujeres, atribuyendo este hallazgo a que la obstrucción del flujo de aire estaba asociada con la presencia de lesión epitelial pre invasiva de alto grado en hombres, además se

encontró que las mujeres en comparación con los hombres exhibían un aumento de la capacidad antioxidante sistémica, como mayores niveles de glutatión en la sangre, mayor actividad de la glutatión peroxidasa y menos daño al ADN debido al estrés oxidativo a una edad avanzada, sugiriendo que el receptor de estrógeno está involucrado en la regulación al alza de los genes defensivos del estrés oxidativo, incluido el GSTP1, lo que apoya la idea de que existen mecanismos específicos del sexo en la respuesta de defensa al estrés oxidativo, independientemente del estado de fumador [137]. La disminución anual media adicional del FEV1 en hombres con deleción en *GSTT1* y en *GSTM1* fue de -8,3 ml/año en relación con los hombres que no presentaban estas deleciones [137]. Posteriormente, mediante un microarreglo de genotipificación en población caucásica se reportó que *GSTO2* se asocia a la presencia de EPOC (p=0.003), así como a la presencia de cáncer de pulmón (p=0.001) por exposición al humo de cigarro, debido a que la Glutation S-transferasa Omega 2 es una enzima que cataliza la conjugación del glutatión con sustratos electrofílicos, variaciones en la expresión de *GSTO2* podrían afectar la actividad catalítica en la biotransformación del arsénico, este contaminante se ha encontrado en PM2.5 [138].

El gen *PTEN* codifica para una proteína que regula la señalización de supervivencia celular; esta es una proteína supresora de tumores que se expresa cuando existen señalizaciones de daño bloqueando la supervivencia de la célula mediante p53, este actúa como regulador negativo de PI3K (fosfatidilinositol- 3-kinasa), PTEN desfosforila el fosfatidilinositol-3,4,5-fosfato (PIP3) en fosfatidilinositol-4,5-fosfato (PIP2), inhibiendo el proceso de activación de Akt e inactivando p53. El sitio CpG (cg09676860) en *PTEN* se encontró hipermetilado en las mujeres con EPOC por humo de leña, el silenciamiento de este podría participar en procesos donde existe alteración en el ciclo celular, promoviendo la presencia de células cancerígenas,

En estudios previos, se ha reportado que, el estrés oxidativo inhibe los niveles de la proteína PTEN en pacientes con EPOC por exposición al humo de cigarro lo cual ocasiona activación persistente de la vía PI3K/Akt y la subsecuente liberación de mediadores proinflamatorios. Esto puede explicar parcialmente la progresión de la EPOC incluso después de dejar de fumar; suponemos que esto mismo puede estar sucediendo en EPOC secundaria a exposición a quema de leña. La activación de la señalización de PI3K como resultado de la disminución de la expresión de PTEN podría ser importante en la resistencia a los corticosteroides y el envejecimiento celular acelerado, así como en el aumento del riesgo de cáncer de pulmón en la EPOC [139]. La actividad antiinflamatoria de PTEN podría ser un posible objetivo terapéutico en el futuro para prevenir la progresión de la EPOC [139]. Aunque en nuestro estudio, el estado de metilación no presentó relación con la cuantificación de la proteína en el sobrenadante de esputo inducido, este gen es de gran importancia y se deben realizar otros estudios que nos ayuden a explicar la participación de la metilación del gen *PTEN* en EPOC por exposición al humo de leña.

El gen *FMOD* codifica para la proteína fibromodulina, esta pertenece a la familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs), participa en mecanismos como el ensamblaje de las fibras de colágeno de la matriz extracelular, tiene acción moduladora de la actividad de TGF-β, es un estimulador de crecimiento de células endoteliales y participa en la respuesta inflamatoria a través de la vía clásica del complemento [136]. En nuestro estudio encontramos que el sitio CpG (cg26508775), cercano al sitio de inicio de la transcripción del gen *FMOD* se encuentra hipermetilado en mujeres con EPOC por humo de leña ($p=0.0127$) en comparación con las mujeres expuestas a humo de leña sin la enfermedad, la metilación de este sitio CpG puede reducir la expresión del

gen FMOD y de esta manera promover las infecciones por diferentes microrganismos como *Moraxella catarralis* y las exacerbaciones bacterianas frecuentes en EPOC[141].

Existen reportes sobre algunos proteoglicanos cortos ricos en leucina (SLRPs), entre ellos la fibromodulina, que tienen actividad antibacteriana. *Moraxella catarralis* es un comensal humano específico, sin embargo, frecuentemente causa otitis media aguda en niños y estimula las exacerbaciones agudas en pacientes con EPOC. Esta bacteria evade el sistema inmunológico del huésped adquiriendo en su superficie inhibidores del complemento, como la proteína de unión a C4b (C4BP), la fibromodulina (FMOD), la osteoadherina (OSAD) y la biglicina (BGN) e inhiben competitivamente la unión de C4BP a la superficie de *M. catarrhalis*, permitiendo la formación del complejo de ataque a la membrana y la destrucción de la bacteria por el sistema del complemento[141].

Entre nuestros hallazgos, encontramos un sitio CpG (8cg08450425) diferencialmente metilado en el gen *END1* que codifica para una proteína que participa en el mecanismo de vasoconstricción; este sitio se encontró hipermetilado en las mujeres con EPOC por exposición al humo de leña y la cuantificación de la respectiva proteína en el sobrenadante de esputo fue menor en comparación con el grupo de mujeres expuestas al humo de leña sin EPOC, estos resultados concuerdan con el estado de metilación del DNA. La endotelina-1 se expresa en las células endoteliales, en las células del músculo liso vascular y en otras células del epitelio bronquial. La literatura reporta que, las células epiteliales bronquiales de los pacientes asmáticos presentan mayor expresión de esta proteína [140]; también se ha encontrado elevada en las vías respiratorias de los pacientes con asma y se ha demostrado que estimula la secreción de moco, el edema de las vías respiratorias, la mitogénesis del músculo liso y la hipersensibilidad bronquial[141]. Se ha propuesto que tiene un efecto proinflamatorio en las vías

respiratorias ya que es un quimioatrayente y un regulador positivo de otros mediadores inflamatorios como las interleucinas IL-6 e IL-8 [141]. Esto hace de endotelina 1 sea un gen importante en el desarrollo de EPOC secundaria a la exposición de quema de leña.

Los patrones de metilación diferencial presentes en las mujeres con EPOC por exposición al humo de quema de leña, se encuentran en diversos genes entre nuestros hallazgos encontramos aquellos asociados con el remodelamiento de tejido pulmonar (*FOXP1*, *FAM98A*), sistema inmunológico (*ALOX5*, *IL19*), genes supresores de tumores (*PTEN*), remodelamiento epitelial (*FMOD*, *ADAMTS12*, *EDN1*), producción de moco (*MUC19*) y metabolismo de xenobióticos (*GSTO2*). De esta manera se pueden explorar nuevas vías y tener blancos terapéuticos que puedan modificar el acceso de los factores de transcripción al sitio de inicio de la transcripción, permitiendo la expresión de genes importantes en la regeneración pulmonar o bien, regular la expresión de genes anti-inflamatorios, así como genes antioxidantes que contraresten el estrés oxidativo a causa de los contaminantes presentes en el humo de la leña. Por otra parte, un próximo análisis es estratificar por estadios GOLD de la enfermedad e identificar los sitios metilados diferencialmente según la gravedad de la patología, ayudando a tener mejores tratamientos de manera personalizada según el estadio de la enfermedad.

Entre las principales fortalezas del estudio se encuentra que es el primer EWAS realizado en EPOC secundaria a la combustión de leña en muestras de esputo inducido el cual se compone básicamente de células que reflejan lo que sucede a nivel bronquial. Si bien este trabajo es uno de los primeros estudios en probar un gran panel de sitios CpG en EPOC, presenta algunas limitaciones; una de ellas es que, la medición acumulativa de exposición al humo de leña (índice de exposición al humo de leña) es una medida auto referida por las participantes y de esta manera se puede subestimar la

verdadera exposición a los contaminantes. Otra limitante del estudio es que, aunque la muestra de esputo inducido es representativa de la vía aérea, la contaminación por células epiteliales de la boca es un importante factor que puede interferir en el estudio, por lo tanto, es necesario hacer una corrección por la celularidad presente en las muestras y en la etapa de validación, solo pudimos medir proteínas extracelulares presentes en el sobrenadante del esputo inducido.

Conclusiones

- Existe afectación en los niveles de metilación en genes que codifican para factores de transcripción, proteínas involucradas en el remodelamiento pulmonar, sistema inmune, producción de moco y metabolismo de xenobióticos en pacientes con EPOC secundaria a humo de leña en muestras de esputo inducido.
- A pesar de que la exposición al humo de cigarro y al humo de leña son los principales factores de riesgo para el desarrollo de EPOC, los genes con sitios CpG con metilación diferencial difiere entre estos. No se encontró concordancia entre la metilación diferencial y la concentración PTEN y FMOD en sobrenadante de esputo inducido.
- El estado de metilación de endotelina-1 se encuentra en relación con la concentración de la proteína en sobrenadante de esputo inducido al comparar mujeres con EPOC por exposición al humo de leña y mujeres expuestas a humo de leña sin la enfermedad.
- Identificamos sitios diferencialmente metilados en genes específicos que están implicados en los mecanismos moleculares subyacentes a la patogénesis de la EPOC por exposición al humo de leña, lo cual ayudará a identificar nuevas vías fisiopatológicas que participen directamente en el desarrollo de la enfermedad y pueden representar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad.

Referencias bibliográficas

1. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: Systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2006;28(3):523-532. doi:10.1183/09031936.06.00124605

2. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung. *Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*.; 2019. www.goldcopd.org. Accessed March 1, 2019.

3. Miravitlles M, Worth H, Soler Cataluña JJ, et al. Observational study to characterise 24-hour COPD symptoms and their relationship with patient-reported outcomes: Results from the ASSESS study. *Respir Res*. 2014;15(1):122. doi:10.1186/s12931-014-0122-1

4. Macrae KD, Murphy K, Guz A, Adams L, Cockcroft A, Elliott MW. The Language of Breathlessness: Use of Verbal Descriptors by Patients with Cardiopulmonary Disease. *Am Rev Respir Dis*. 2011;144(4):826-832. doi:10.1164/ajrccm/144.4.826

5. Cho S-H, Thanaviratananich S, Brnabic AJM, et al. Respiratory disease in the Asia-Pacific region: Cough as a key symptom. *Allergy Asthma Proc*. 2016;37(2):131-140. doi:10.2500/aap.2016.37.3925

6. MRC. Medical Research Council Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis. Definition and classification of chronic bronchitis for clinical and epidemiological purposes. *Lancet*. 1965;1(April):775-779.

7. Allinson JP, Hardy R, Donaldson GC, Shaheen SO, Kuh D, Wedzicha JA. The presence of chronic mucus hypersecretion across adult life in relation to chronic obstructive pulmonary disease development. *Am J Respir Crit Care Med*.

2016;193(6):662-672. doi:10.1164/rccm.201511-2210OC

8. Kim V, Crapo J, Zhao H, et al. Comparison between an alternative and the classic definition of chronic bronchitis in COPDGene. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(3):332-339. doi:10.1513/AnnalsATS.201411-518OC

9. Schermer TR, Robberts B, Crockett AJ, et al. Should the diagnosis of COPD be based on a single spirometry test? *NPJ Prim care Respir Med*. 2016;26:16059. doi:10.1038/npjpcrm.2016.59

10. Albert P, Agusti A, Edwards L, et al. Bronchodilator responsiveness as a phenotypic characteristic of established chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2012;67(8):701-708. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-201458

11. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005;26(2):319-338. doi:10.1183/09031936.05.00034805

12. Galdiz JB, Burgos F, García-Río F, et al. Espirometría. *Arch Bronconeumol*. 2013;49(9):388-401. doi:10.1016/j.arbres.2013.04.001

13. Padilla RP y cols. Manual de entrenamiento en Espirometria. *Man Entren en Espirometria*. 2005:160. doi:10.1016/j.det.2007.06.017

14. Benítez-Pérez RE, Torre-Bouscoulet L, Villca-Alá N, et al. Espirometría: Recomendaciones y procedimiento. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir*. 2016;75(2):173-189. www.medigraphic.org.mx. Accessed March 10, 2019.

15. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005;26(5):948-968. doi:10.1183/09031936.05.00035205

16. Ramirez-Venegas A, Sansores RH, Perez-Padilla R, et al. Survival of patients with

chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(4):393-397. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16322646. Accessed February 27, 2017.

17. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet*. 2009;374(9691):733-743. doi:10.1016/S0140-6736(09)61303-9

18. Silva Aparicio M, Castro Ramírez AE, Perales Rivera HR. Áreas Voluntarias de Conservación y la extracción de leña en núcleos agrarios de Oaxaca. *Ecosistemas y Recur Agropecu*. 2018;5(15):435. doi:10.19136/era.a5n15.1743

19. CFPRS. Usuarios de leña en México | Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios | Gobierno | gob.mx. gob.mx. https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/3-usuarios-de-lena-en-mexico. Published 2017. Accessed May 2, 2019.

20. Cruz-Sandoval G, Figueroa-Bautista P, Villalvazo-López VM, Gerritsen PRW. Tecnología apropiada para el quemado de leña: el caso de la estufa Lorena en la Tinaja, municipio de Juchitlan, Jalisco. 2008. http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Otrasinstituciones/CruzSandovalGerardo(pp633-640)/633-640.pdf. Accessed May 2, 2019.

21. Ramírez-Venegas A, Velázquez-Uncal M, Pérez-Hernández R, et al. Prevalence of COPD and respiratory symptoms associated with biomass smoke exposure in a suburban area. *Int J COPD*. 2018;13:1727-1734. doi:10.2147/COPD.S156409

22. Naeher LP, Brauer M, Lipsett M, et al. Woodsmoke Health Effects: A Review.

Inhal Toxicol. 2007;19:67-106. doi:10.1080/08958370600985875

23. Kim KH, Jahan SA, Kabir E. A review of diseases associated with household air pollution due to the use of biomass fuels. *J Hazard Mater*. 2011;192(2):425-431. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.05.087

24. Perez-Padilla R, Schilmann A. Respiratory health effects of indoor air pollution. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(9):1079-1086. doi:20819250

25. Jones JM, Lea-Langton AR, Ma L, Pourkashanian M, Williams A. *Pollutants Generated by the Combustion of Solid Biomass Fuels*.; 2014. doi:10.1007/978-1-4471-6437-1

26. Rosas Pérez I, Serrano J, Alfaro-Moreno E, et al. Relations between PM10 composition and cell toxicity: A multivariate and graphical approach. *Chemosphere*. 2007;67(6):1218-1228. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.10.078

27. Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;257(2):209-226. doi:10.1016/j.taap.2011.09.007

28. Camp Pat G, Ramirez-Venegas Alejandra, Sansores Raul H, et al. COPD phenotypes in biomass smoke- versus tobacco smoke-exposed Mexican women. *Eur Respir J*. 2014;43(3):725-734.

29. nght L, Wtggs B, Pare P, et al. *The Changes in Airways Structure Associated with Reduced Forced Expiratory Volume in One Second The Changes in Airways Structure AssociaJed with Reduced Forced Expiratory Volume in One Second*. Vol 2.; 1989. https://erj.ersjournals.com/content/erj/2/9/834.full.pdf. Accessed January 17, 2019.

30. O'Donnell DE, Revill SM, Webb KA. Dynamic hyperinflation and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(5):770-777. doi:10.1164/ajrccm.164.5.2012122

31. Lynne M. Reid. *La Patología Del Enfisema. Chicago: Year Book Medical Publishers*.; 1967.

32. Chung KF, Caramori G, Adcock I, Di Stefano A. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9(1):397. doi:10.2147/COPD.S42544

33. Fahy J V, Dickey BF. Airway Mucus Function and Dysfunction. *N Engl J Med*. 2010;363(23):2233-2247. doi:10.1056/NEJMra0910061

34. Allinson JP, Hardy R, Donaldson GC, Shaheen SO, Kuh D, Wedzicha JA. The Presence of Chronic Mucus Hypersecretion across Adult Life in Relation to Chronic Obstructive Pulmonary Disease Development. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(6):662-672. doi:10.1164/rccm.201511-2210OC

35. From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD GI for COLD (GOLD) 2017. A from: http://goldcopd. or. Guías para el Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Neumol Cir Torax*. 2012.

36. Gordon L. Snider , Jerome Kleinerman , William M. Thurlbeck ZHB. The Definition of Emphysema. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(1):182-185. doi:10.1164/arrd.1985.132.1.182

37. MacNee W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):258-266. doi:10.1513/pats.200504-045SR

38. Rivera RM, Cosio MG, Ghezzo H, Salazar M, Pérez-Padilla R. Comparison of lung morphology in COPD secondary to cigarette and biomass smoke. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12(8):972-977. http://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtld/2008/00000012/00000008/art00017#. Accessed February 5, 2018.

39. Perez-Padilla R, Fernandez R, Lopez Varela MV, et al. Airflow Obstruction in Never Smokers in Five Latin American Cities: The PLATINO Study. *Arch Med Res*. 2012;43(2):159-165. doi:10.1016/j.arcmed.2012.03.007

40. Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Quintana-Carrillo RH, et al. FEV 1 Decline in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Associated with Biomass Exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(9):996-1002. doi:10.1164/rccm.201404-0720OC

41. González-García M, Gómez V, Perlaza I CA. Diferencias en el impacto sobre el estado de salud entre la EPOC por cigarrillo y por humo de leña. *Arch Bronconeumol Bronconeumol*. 2014:50-59.

42. Bonjour S, Adair-Rohani H, Wolf J, et al. Solid fuel use for household cooking: country and regional estimates for 1980-2010. *Environ Health Perspect*. 2013;121(7):784-790. doi:10.1289/ehp.1205987

43. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, et al. Smoking Prevalence and Cigarette Consumption in 187 Countries, 1980-2012. *JAMA*. 2014;311(2):183. doi:10.1001/jama.2013.284692

44. Olloquequi J, Jaime S, Parra V, et al. Comparative analysis of COPD associated with tobacco smoking, biomass smoke exposure or both. *Respir Res*.

2018;19(1):13. doi:10.1186/s12931-018-0718-y

45. Gonzalez-García M, Torres-Duque C, Bustos A, Peña C, Maldonado D. Airway Hyperresponsiveness in Wood Smoke Chronic Obstructive Pulmonary Diseas. *Chest*. 2003;124(MeetingAbstracts):168S. doi:10.1378/chest.124.4_MeetingAbstracts.168S-b

46. Pérez-Padilla R, Ramirez-Venegas A, Sansores-Martinez R. Clinical Characteristics of Patients With Biomass Smoke-Associated COPD and Chronic Bronchitis, 2004-2014. *Chronic Obstr Pulm Dis (Miami, Fla)*. 2014;1(1):23-32. doi:10.15326/jcopdf.1.1.2013.0004

47. Martínez-Aguilar NE, Vargas-Camaño ME, Hernández-Pliego RR, Chaia-Semerena GM, Pérez-Chavira M del R. Inmunopatología de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista Alergia México*. http://revistaalergia.mx/ojs/index.php/ram/article/view/263/471. Published October 16, 2017. Accessed January 17, 2019.

48. Bowler RP, Balkisson RC, Crapo JD. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Minerva Pneumol*. 2003;42(3):101-114. doi:10.1164/ajrccm.156.2.9611013

49. Nishikawa M, Kakemizu N, Ito T, et al. Superoxide Mediates Cigarette Smoke-Induced Infiltration of Neutrophils into the Airways through Nuclear Factor- κ B Activation and IL-8 mRNA Expression in Guinea Pigs *In Vivo*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(2):189-198. doi:10.1165/ajrcmb.20.2.3305

50. Lin JL, Thomas PS. Current perspectives of oxidative stress and its measurement in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*.

2010;7(4):291-306. doi:10.3109/15412555.2010.496818

51. Dutta A, Roychoudhury S, Chowdhury S, Ray MR. Changes in sputum cytology, airway inflammation and oxidative stress due to chronic inhalation of biomass smoke during cooking in premenopausal rural Indian women. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(3):301-308. doi:10.1016/j.ijheh.2012.05.005

52. Silva R, Oyarzún M, Olloquequi J. Mecanismos patogénicos en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica causada por exposición a humo de biomasa. *Arch Bronconeumol*. 2015;51(6):285-292. doi:10.1016/j.arbres.2014.10.005

53. Shapiro SD, Ingenito EP. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: Advances in the past 100 years. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32(5):367-372. doi:10.1165/rcmb.F296

54. Pérez-Rubio G, Jiménez-Valverde LO, Ramírez-Venegas A, et al. Prevalencia de variantes de alto riesgo de alfa-1 antitripsina en población mestiza mexicana y su relación con los valores de la función pulmonar. *Arch Bronconeumol*. 2015;51(2):80-85. doi:10.1016/J.ARBRES.2014.09.010

55. Brantly ML, Wittes JT, '\bgelmeier CF, et al. *Use of a Highly Purified a 1-Antitrypsin Standard to Establish Ranges for the Common Normal and Deficient a 1-Antitrypsin Phenotypes**. Vol 100.; 1991. doi:10.1378/chest.100.3.703

56. Hernández-Montoya J, Pérez-Rubio G, Ramos JP, et al. Involvement of extracellular matrix metalloproteinases in COPD. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir*. 2014;73(2):128-137. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462014000200005. Accessed May 3, 2019.

57. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix Metalloproteinase-9 in Lung Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(1):12-24. doi:10.1165/rcmb.2002-0166TR

58. Hunninghake GW, Davidson JM, Rennard S, Szapiel S, Gadek JE, Crystal RG. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science (80-)*. 1981;212(4497):925-927. doi:10.1126/science.7233186

59. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem*. 1996;271(48):30375-30380. doi:10.1074/JBC.271.48.30375

60. Dimov D, Tacheva T, Ivanova D, et al. Blood levels of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix matalloproteinases (TIMPs) as biomarkers of COPD. In: *Molecular Pathology and Funct. Genomics*. Vol 52. European Respiratory Society; 2018:PA942. doi:10.1183/13993003.congress-2018.PA942

61. Montaño M, Sansores RH, Becerril C, et al. FEV1 inversely correlates with metalloproteinases 1, 7, 9 and CRP in COPD by biomass smoke exposure. *Respir Res*. 2014;15(1):74. doi:10.1186/1465-9921-15-74

62. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, et al. Increased expression of nuclear factor-κB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*. 2002;20(3):556-563. doi:10.1183/09031936.02.00272002

63. Ravi AK, Khurana S, Lemon J, et al. Increased levels of soluble interleukin-6 receptor and CCL3 in COPD sputum. *Respir Res*. 2014;15(1):103. doi:10.1186/s12931-014-0103-4

64. Shao MXG. Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor

necrosis factor- -converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *AJP Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(2):L420-L427. doi:10.1152/ajplung.00019.2004

65. Zou Y, Chen X, Liu J, et al. Serum IL-1β and IL-17 levels in patients with COPD: Associations with clinical parameters. *Int J COPD*. 2017;12:1247-1254. doi:10.2147/COPD.S131877

66. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev*. 2007;87(1):69-98. doi:10.1152/physrev.00022.2006

67. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzo H, Cosio MG. Alveolar Inflammation and its Relation to Emphysema in Smokers. https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/ajrccm.152.5.7582312. Accessed January 30, 2018.

68. Shapiro SD. The Macrophage in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:29-32. https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/ajrccm.160.supplement_1.9. Accessed January 30, 2018.

69. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. doi:10.1183/09031936.03.00040703

70. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*. 2000;117(3):684-694. doi:10.1378/chest.117.3.684

71. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(3 I):737-744. doi:10.1164/ajrccm.163.3.2002117

72. Marchetti S, Longhin E, Bengalli R, et al. In vitro lung toxicity of indoor PM10 from a stove fueled with different biomasses. *Sci Total Environ*. 2019;649:1422-1433. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.249

73. Foreman MG, Campos M, Celedón JC. Genes and chronic obstructive pulmonary disease. *Med Clin North Am*. 2012;96(4):699-711. doi:10.1016/j.mcna.2012.02.006

74. Pillai SG, Ge D, Zhu G, et al. A Genome-Wide Association Study in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Identification of Two Major Susceptibility Loci. McCarthy MI, ed. *PLoS Genet*. 2009;5(3):e1000421. doi:10.1371/journal.pgen.1000421

75. Cho MH, Boutaoui N, Klanderman BJ, et al. Variants in FAM13A are associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Genet*. 2010;42:200-202. doi:10.1038/ng.535

76. Kong X, Cho MH, Anderson W, et al. Genome-wide association study identifies BICD1 as a susceptibility gene for emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(1):43-49. doi:10.1164/rccm.201004-0541OC

77. Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, et al. Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat Genet*. 2010;42(1):45-52. doi:10.1038/ng.500

78. de Jong K, Boezen HM, Kromhout H, Vermeulen R, Postma DS, Vonk JM. Association of Occupational Pesticide Exposure With Accelerated Longitudinal Decline in Lung Function. *Am J Epidemiol*. 2014;179(11):1323-1330. doi:10.1093/aje/kwu053

79. de Vries M, van der Plaat DA, Nedeljkovic I, et al. From blood to lung tissue: effect of cigarette smoke on DNA methylation and lung function. *Respir Res*. 2018;19(1). doi:10.1186/s12931-018-0904-y

80. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009;23(7):781-783. doi:10.1101/gad.1787609

81. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*. 2011;123(19):2145-2156. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839

82. Santos-Rebouças CB, Pimentel MMG. Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases. *Eur J Hum Genet*. 2007;15(1):10-17. doi:10.1038/sj.ejhg.5201727

83. Kim Y-I. Nutritional Epigenetics: Impact of Folate Deficiency on DNA Methylation and Colon Cancer Susceptibility. *J Nutr*. 2005;135(11):2703-2709. doi:10.1093/jn/135.11.2703

84. Campesi I, Sanna M, Zinellu A, et al. Oral contraceptives modify DNA methylation and monocyte-derived macrophage function. *Biol Sex Differ*. 2012;3:4. doi:10.1186/2042-6410-3-4

85. Rakyan VK, Down TA, Maslau S, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome*

Res. 2010;20(4):434-439. doi:10.1101/gr.103101.109

86. Greer JM, McCombe PA. The role of epigenetic mechanisms and processes in autoimmune disorders. *Biologics*. 2012;6:307-327. doi:10.2147/BTT.S24067

87. Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(4):596-612. doi:10.1007/s00018-008-8432-4

88. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007;128(4):693-705. doi:10.1016/J.CELL.2007.02.005

89. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007;128(4):693-705. doi:10.1016/J.CELL.2007.02.005

90. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-385. doi:10.1038/nrm1644

91. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006

92. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA Targets. doi:10.1371/journal.pbio.0020363

93. Manel Esteller. Epigenetics in evolution and disease. *Lancet*. 2008;372(9633):90-92. doi:10.1016/S0140-6736(08)60924-1

94. Straussman R, Nejman D, Roberts D, et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(5):564-571. doi:10.1038/nsmb.1594

95. Bernstein BE, Bock C, Boyle P, et al. Genomic Distribution and Inter-Sample Variation of Non-CpG Methylation across Human Cell Types. *PLoS Genet*.

2011;7(12):e1002389. doi:10.1371/journal.pgen.1002389

96. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet*. 2007;16(R1):R50-R59. doi:10.1093/hmg/ddm018

97. Araujo FD, Croteau S, Slack AD, et al. The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus. *J Biol Chem*. 2001;276(10):6930-6936. doi:10.1074/jbc.M009037200

98. Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie*. 2015;116:103-113. doi:10.1016/j.biochi.2015.06.019

99. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*. 1999;274(46):33002-33010. doi:10.1074/JBC.274.46.33002

100. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*. 1999;99(3):247-257. doi:10.1016/S0092-8674(00)81656-6

101. Kato Y, Kaneda M, Hata K, et al. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet*. 2007;16(19):2272-2280. doi:10.1093/hmg/ddm179

102. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-1068. doi:10.1038/nbt.1685

103. Kishikawa S, Murata T, Ugai H, Yamazaki T, Yokoyama KK. Control elements of Dnmt1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner. *Nucleic Acids Res*

Suppl. 2003;(3):307-308. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14510503. Accessed March 22, 2019.

104. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 1993;3(2):226-231. doi:10.1016/0959-437X(93)90027-M

105. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Research*. 2017;5(3):1281. doi:10.12688/f1000research.8839.3

106. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*. 2016;8(3):389-399. doi:10.2217/epi.15.114

107. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011;98(4):288-295. doi:10.1016/J.YGENO.2011.07.007

108. BioRENDER. Untitled. https://app.biorender.com/illustrations/edit/5ca4e13c894307003340d4df. Accessed May 7, 2019.

109. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74. doi:10.1038/nature11247

110. Siggens L, Ekwall K. Epigenetics, chromatin and genome organization: Recent advances from the ENCODE project. *J Intern Med*. 2014;276(3):201-214. doi:10.1111/joim.12231

111. Lizio M, Harshbarger J, Shimoji H, et al. Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas. *Genome Biol*. 2015;16(1):1-14. doi:10.1186/s13059-014-0560-6

112. Gao X, Jia M, Zhang Y, Breitling LP, Brenner H. DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults: A systematic review of DNA methylation studies. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):113. doi:10.1186/s13148-015-0148-3

113. Breitling LP, Yang R, Korn B, Burwinkel B, Brenner H. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *Am J Hum Genet*. 2011;88(4):450-457. doi:10.1016/j.ajhg.2011.03.003

114. Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, et al. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One*. 2013;8(5):e63812. doi:10.1371/journal.pone.0063812

115. Tsaprouni LG, Yang TP, Bell J, et al. Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics*. 2014;9(10):1382-1396.

116. Philibert RA, Beach SRH, Brody GH. Demethylation of the aryl hydrocarbon receptor repressor as a biomarker for nascent smokers. *Epigenetics*. 2012;7(11):1331-1338. doi:10.4161/epi.22520

117. Shenker NS, Polidoro S, van Veldhoven K, et al. Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking. *Hum Mol Genet*. 2013;22(5):843-851. doi:10.1093/hmg/dds488

118. Guida F, Sandanger TM, Castagné R, et al. Dynamics of smoking-induced genome-wide methylation changes with time since smoking cessation. *Hum Mol Genet*. 2015;24(8):2349-2359. doi:10.1093/hmg/ddu751

119. Philibert R, Hollenbeck N, Andersen E, et al. A quantitative epigenetic approach for the assessment of cigarette consumption. *Front Psychol*. 2015;6(JUN):1-8.

120. Sun Y V, Smith AK, Conneely KN, et al. Epigenomic association analysis identifies smoking-related DNA methylation sites in African Americans. *Hum Genet*. 2013;132(9):1027-1037. doi:10.1007/s00439-013-1311-6

121. Vucic Emily A CR, Thu, Kelsie L, Wilson Ian M, Cotton Allison M, Kennett Jennifer Y, Zhang May Lonergan, Kim M Steiling K, J., Brown Carolyn MA, Ohtani, Keishi Lenburg Marc E, Sin Don D, Spira Avrum MacAulay, Calum E, Lam Stephen Lam WL. DNA methylation is globally disrupted and associated with expression changes in chronic obstructive pulmonary disease small airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(5):912-922.

122. Repapi E, Sayers I, Wain L V, et al. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat Genet*. 2010;42(1):36-44. doi:10.1038/ng.501

123. Zaghlool SB, Al-Shafai M, Al Muftah WA, Kumar P, Falchi M, Suhre K. Association of DNA methylation with age, gender, and smoking in an Arab population. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):6. doi:10.1186/s13148-014-0040-6

124. Lee MK, Hong Y, Kim SY, London SJ, Kim WJ. DNA methylation and smoking in Korean adults: epigenome-wide association study. *Clin Epigenetics*. 2016;8(1):103. doi:10.1186/s13148-016-0266-6

125. Stueve TR, Li W-Q, Shi J, et al. Epigenome-wide analysis of DNA methylation in lung tissue shows concordance with blood studies and identifies tobacco smoke-inducible enhancers. *Hum Mol Genet*. 2017;26(15):3014-3027. doi:10.1093/hmg/ddx188

126. Lee MK, Hong Y, Kim S-Y, Kim WJ, London SJ. Epigenome-wide association study of chronic obstructive pulmonary disease and lung function in Koreans. *Epigenomics*. 2017;9(7):971-984. doi:10.2217/epi-2017-0002

127. Lee S-W, Hwang H-H, Hsu PW-C, Chuang T-Y, Liu C-W, Wu LS-H. Whole-genome methylation profiling from PBMCs in acute-exacerbation COPD patients with good and poor responses to corticosteroid treatment. *Genomics*. September 2018. doi:10.1016/J.YGENO.2018.09.010

128. Bermingham ML, Walker RM, Marioni RE, et al. Identification of novel differentially methylated sites with potential as clinical predictors of impaired respiratory function and COPD. *EBioMedicine*. March 2019. doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.072

129. Zeng G, Sun B, Zhong N. Non smoking-related chronic obstructive pulmonary disease - a neglected entity? *Respirology*. 2012;17(6):no-no. doi:10.1111/j.1440-1843.2012.02152.x

130. Torres-Duque CA, García-Rodriguez MC, González-García M. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica por humo de leña: ¿un fenotipo diferente o una entidad distinta? *Arch Bronconeumol*. 2016;52(8):425-431. doi:10.1016/j.arbres.2016.04.004

131. Newcastle University. Power and Sample Size In epigenetic epidemiology studies. 2018.

http://www.bristol.ac.uk/caite/geocode/newcastleshortcourse/powerandsamplesize.pdf. Published 2018. Accessed May 6, 2019.

132. Weiszhar Z, Horvath I. Induced sputum analysis: step by step. *Breathe*. 2013;9(4):300-306. doi:10.1183/20734735.042912

133. van Keimpema M, Grüneberg LJ, Mokry M, et al. FOXP1 directly represses transcription of proapoptotic genes and cooperates with NF-κB to promote survival of human B cells. *Blood*. 2014;124(23):3431-3440. doi:10.1182/blood-2014-01-553412

134. Li S, Wang Y, Zhang Y, et al. Foxp1/4 control epithelial cell fate during lung development and regeneration through regulation of anterior gradient 2. *Development*. 2012;139(14):2500-2509. doi:10.1242/dev.079699

135. Sampson AP. FLAP inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10(11):1163-1172. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876784. Accessed May 19, 2019.

136. GeneCards Human Gene Database. No Title.

137. Imboden M, Downs SH, Senn O, et al. Glutathione S-transferase genotypes modify lung function decline in the general population: SAPALDIA cohort study. *Respir Res*. 2007;8(1):2. doi:10.1186/1465-9921-8-2

138. de Andrade M, Li Y, Marks RS, et al. Genetic variants associated with the risk of chronic obstructive pulmonary disease with and without lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(3):365-373. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0243

139. Yanagisawa S, Baker JR, Vuppusetty C, et al. Decreased phosphatase PTEN amplifies PI3K signaling and enhances proinflammatory cytokine release in

COPD. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2017;313(2):L230-L239. doi:10.1152/ajplung.00382.2016

140. Vittori E, Marini M, Fasoli A, De Franchis R, Mattoli S. Increased Expression of Endothelin in Bronchial Epithelial Cells of Asthmatic Patients and Effect of Corticosteroids. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(5_pt_1):1320-1325. doi:10.1164/ajrccm/146.5_Pt_1.1320

141. Mullol J, Baraniuk JN, Logun C, Benfield T, Picado C, Shelhamer JH. Endothelin-1 induces GM-CSF, IL-6 and IL-8 but not G-CSF release from a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B). *Neuropeptides*. 1996;30(6):551-556. doi:10.1016/S0143-4179(96)90038-4

Anexos

Anexo 1. Carta de consentimiento informado.

SALUD

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas

INER

Ciudad de México a _____ de _____ 201___

Consentimiento Informado

Protocolo: **Identificación de patrones de metilación asociados a EPOC secundaria a exposición a humo de leña y afectación de los niveles de expresión en regiones genómicas metiladas identificadas**

Descripción del protocolo
El objetivo general del presente protocolo es: Identificar patrones de metilación en genes que participan en el desarrollo de EPOC por humo de leña y evaluar si la metilación afecta la expresión del gen identificado. La información generada en el presente protocolo dará a conocer genes afectados en pacientes con EPOC secundaria a humo de leña. Todas las muestras serán manejadas con claves alfa numéricas, con la finalidad de resguardar la información de cada participante.

Procedimiento de participación en el protocolo
Consiste de tres partes:
Primera: Toma de una muestra de 14 mL de sangre obtenida por punción en la vena del antebrazo; la cual será utilizada para la extracción de suero, plasma y RNA.
Segunda: Se realizará una nebulización con solución salina estéril al 7%, con la finalidad de obtener una muestra de "flema" producida por la tos originada por la solución. La muestra de flema será utilizada para la extracción de ADN
Tercera: Recolección de datos en un formato escrito, en donde le solicitamos responder un cuestionario con información acerca de sus antecedentes médicos, estado de salud, residencia actual y previa de hasta 2 generaciones anteriores a usted.

Riesgos probables
En la toma de muestra sanguinea puede sentir molestia a la punción con la aguja, un ligero sangrado, y en ocasiones puede haber la aparición de un moretón. La muestra de sangre será tomada por personal capacitado para tal fin, lo que disminuye estos riesgos probables. Adicionalmente existe disponibilidad de tratamiento médico para el procedimiento de toma de muestra e indemnización a que legalmente tendría derecho, por parte de la institución, en el caso de daños que la ameriten, directamente causados por la venopunción, en caso presentarse gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación. Los riesgos probables en la obtención de la flema son mínimos, como secreción nasal y tos pasajera; esta muestra es obtenida por personal capacitado en esta técnica la cual no es invasiva. Ambos procedimientos NO ponen en riesgo su vida.En caso de duda médica, contactar a Dra. Alejandra Ramírez-Venegas extensión 5166.

Aceptación de participación en el protocolo
Al aceptar participar en el presente protocolo, después de haber leído y pensado su decisión, usted está confirmando las siguientes aseveraciones:

Acepto de manera voluntariadonar esta muestra de sangre y flema para obtención de ADNpara todos los estudios que corresponden a este protocolo y recibiré una copia de este formato para mi registro personal.
Entiendo que de la muestra de sangre y de flema se extraerá el material genético para realizar estudios afectación de la expresión de genes; además se me ha explicado que las muestras serán almacenadas de manera segura y en condiciones óptimas para su preservación en un área especial dentro del laboratorio de HLA del INER.Todas las muestras obtenidas y mis datos serán manejados con claves de identificación, es decir, se asignará una clave alfa-numérica con la finalidad de resguardar mi información personal, posteriormente, mi muestra y datos no serán manejados con mi nombre.

Pag. 1 de 2

Identificación de patrones de metilación asociados a EPOC secundaria a exposición a humo de leña y afectación de los niveles de expresión en regiones genómicas metiladas identificadas.
Investigadora responsable del proyecto: Dra. en C. Gloria Pérez-Rubio ext. 5152

Se me ha explicado sobre las complicaciones que puedo llegar a presentar como consecuencia de la punción y en la obtención de flema. Estoy satisfecho con la información que se me ha proporcionado y mis preguntas han sido contestadas satisfactoriamente. He leído y me han explicado claramente en que consiste esta forma de consentimiento informado con respecto al uso de mi muestra de sangre y de flema en el presente protocolo de investigación.Entiendo mis derechos y requerimientos y sé que por lo tanto, si decido no participar, lo puedo hacer sin necesidad de justificar mi decisión y sin que por este motivo se vea alterado mi trato como paciente.Entiendo que estos estudios son realizados con fines de investigación y no ofrecen mejoría en mi tratamiento, de igual forma entiendo que no me serán entregados resultados.
Estoy de acuerdo que mi identidad permanecerá anónima en caso de que mi historial médico sea revisado por personas ajenas a estos estudios de investigación.Entiendo que al firmar esta forma de consentimiento no estoy cediendo ninguno de mis derechos legales, también entiendo que nada en este consentimiento intenta cambiar ninguna ley aplicable en relación a los consentimientos informados.
De igual manera, al donar mi muestra de sangre y de flema, se obtendrá ADN, estas muestras quedarán almacenadas en el laboratorio HLA del INER y podrán ser usadas para otros estudios relacionados a enfermedades respiratorias y/o como control de referencia (creación de un banco de muestras).Si____ No___

Nombre del participante	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)
Nombre del Testigo 1/Relación o Parentesco	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)
Nombre del Testigo 2/Relación o Parentesco	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)

Compromiso del Investigador:
Certifico que de acuerdo a lo mejor de mis conocimientos, el paciente (o su representante legal) que firmó este consentimiento recibió una explicación clara, completa y detallada de las investigaciones que se realizarán con su muestra de sangre y de flema y ha tenido oportunidad de preguntar libremente cualquier duda respecto a la naturaleza, riesgos y beneficios de su participación en este protocolo de investigación, así como una copia del presente consentimiento informado.
Este formato de consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud. Todos los conceptos plasmados en la declaración de Helsinki se han cumplido.

Investigador responsable del proyecto: **M. en C./Dra.en C Gloria Pérez-Rubio**. Contacto: Laboratorio de HLA, 5487 1700 ext. 5152; Para preguntas, dudas y problemas relacionados a su participación con la Dra. Rocío Chapela M. Presidenta del Comité de Ética en Investigación del INER: 5487 1700 ext. 5254.

Firma dela Investigadora:_____

Fecha (Día/Mes/Año):_____

Sello de autorización Comité de Ética en Investigación, INER:

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

INER

SALUD

INFORME AL TITULAR DE SUS DATOS PERSONALES
(DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN)

Los datos personales serán protegidos, incorporados y tratados en el sistema de datos personales denominado BASE DE DATOS DE LOS PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN, con fundamento en Ley General de Salud en Materia de Investigación, Decreto INER 04-08-88, Ley General de Salud D.O.F. 7-II-1984 Ref. D.O.F. 27-V-1987, 23-XII-1987, 14-IV-1991, 7-V-1997, F.E. D.O.F. 6-IX-1984, 23-VII-1986, 18-11-1988, 12-VII-1991, 07-VI-2012. Adiciones D.O.F. 21-X-1988, 24-X-1994, 26-VII-1995, 9-VII-1996; Ley de los Institutos Nacionales de Salud D.O.F. 26-V-2000, Reforma 30-V-2012, cuya finalidad es concentrar la información necesaria para el desarrollo del proyecto de investigación para lo cual fue reclutado el paciente, fue registrado en el sistema de datos personales ante el Instituto Federal de Acceso a la Información Pública, IFAI (www.ifai.org.mx). La unidad administrativa responsable del sistema de datos personales en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Dirección de Investigación, Dirección Médica e Investigadores, la dirección donde el interesado podrá ejercer los derechos de acceso y corrección ante la misma es la Unidad de Enlace del INER, ubicada en Calzada de Tlalpan 4502. Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan.

Lo anterior se informa en cumplimiento del Decimo séptimo de los Lineamientos de Protección de Datos Personales, publicados en el Diario Oficial de la Federación del 30 de septiembre de 2005.

ENTREGA PERSONAL ADMINISTRATIVO INER, NOMBRE: _____.

RECIBE PACIENTE O FAMILIAR DEL PACIENTE, NOMBRE: _____.

FIRMA: _____. **FECHA:** _____ / _____ / _____.

_____ _____

ACEPTO
Publicación de datos personales

NO ACEPTO
Publicación de datos personales

INER-DI-01 (01-2013)

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

INER

SALUD

INFORME AL TITULAR DE SUS DATOS PERSONALES
(DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN)

Los datos personales serán protegidos, incorporados y tratados en el sistema de datos personales denominado BASE DE DATOS DE LOS PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN, con fundamento en Ley General de Salud en Materia de Investigación, Decreto INER 04-08-88, Ley General de Salud D.O.F. 7-II-1984 Ref. D.O.F. 27-V-1987, 23-XII-1987, 14-IV-1991, 7-V-1997, F.E. D.O.F. 6-IX-1984, 23-VII-1986, 18-11-1988, 12-VII-1991, 07-VI-2012. Adiciones D.O.F. 21-X-1988, 24-X-1994, 26-VII-1995, 9-VII-1996; Ley de los Institutos Nacionales de Salud D.O.F. 26-V-2000, Reforma 30-V-2012, cuya finalidad es concentrar la información necesaria para el desarrollo del proyecto de investigación para lo cual fue reclutado el paciente, fue registrado en el sistema de datos personales ante el Instituto Federal de Acceso a la Información Pública, IFAI (www.ifai.org.mx). La unidad administrativa responsable del sistema de datos personales en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Dirección de Investigación, Dirección Médica e Investigadores, la dirección donde el interesado podrá ejercer los derechos de acceso y corrección ante la misma es la Unidad de Enlace del INER, ubicada en Calzada de Tlalpan 4502. Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan.

Lo anterior se informa en cumplimiento del Decimo séptimo de los Lineamientos de Protección de Datos Personales, publicados en el Diario Oficial de la Federación del 30 de septiembre de 2005.

ENTREGA PERSONAL ADMINISTRATIVO INER, NOMBRE: _____.

RECIBE PACIENTE O FAMILIAR DEL PACIENTE, NOMBRE: _____.

FIRMA: _____. **FECHA:** _____ / _____ / _____.

_____ _____

ACEPTO
Publicación de datos personales

NO ACEPTO
Publicación de datos personales

INER-DI-01 (01-2013)

Anexo 2. Carta de aceptación del proyecto por el comité de bioseguridad.

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

INER
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS
COMITÉ DE BIOSEGURIDAD

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

Ciudad de México, a 23 junio de 2017
DI/CB/PI/21/17

Estimada: Dra. en C. Gloria Pérez Rubio
Asunto: Dictamen del Comité de Bioseguridad

APROBADO

Título del protocolo: "Identificación de patrones de metilación asociados a EPOC secundaria a exposición a humo de leña y afectación de los niveles de expresión en regiones genómicas metiladas identificadas"

FOLIO: 2117

Le informamos que su proyecto ha sido evaluado por este Comité y se ha encontrado que cumple con los requerimientos básicos para llevarse a cabo de manera segura en sus instalaciones.

Es fundamental que durante el desarrollo de este proyecto, se de puntual cumplimiento a lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud Título Cuarto Capítulo I. La disposición final de los **RPBI y CRETIS** procedentes de las técnicas utilizadas en el proyecto deberá realizarse de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL- SSA-1-2002, Protección Ambiental, Salud Ambiental, Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos-Clasificación y especificación de manejo, que se generan en establecimientos que presentan atención médica, coordinado para su efecto por la SEMARNAT.

Atentamente,

Edgar Enrique Sevilla Reyes, PhD.
Presidente del Comité de Bioseguridad
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

Comité de Ética en Investigación
30 JUN. 2017
RECIBIDO

Calzada de Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, Deleg. Tlalpan, C. P. 14080, Ciudad de México.
Tel: (55) 54871700 www.iner.salud.gob.mx

Anexo 3. Kit de extracción de DNA Sputum DNA Collection, Preservation and Isolation de Norgene Biotek Corp

Contenido y características del kit de extracción Sputum DNA Collection, Preservation and Isolation:

1) Sputum DNA Preservative
2) Sputum Liquefier
3) Proteinasa K

La solución Sputum DNA Preservative es un buffer diseñado para la rápida lisis celular y subsecuente preservación del DNA a partir de muestras en fresco. Este buffer previene el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas, así como hongos, también inactiva virus impidiendo la contaminación de las muestras haciendo su traslado más seguro. Adicionalmente el buffer elimina la necesidad de procesar inmediatamente o congelar las muestras. Los componentes del buffer permiten almacenar las muestras a temperatura ambiente por más de 2 años sin pérdida considerable de DNA.

Extracción de DNA a partir de células de esputo inducido

1.- Las células se coloca en la solución preservadora de DNA de esputo y se almacena a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

2.- Incubar la muestra en baño maría junto con la solución preservadora en el tubo colector a 56ºC por 1 hora.

3.- Utilizando un agitador, mezclar la muestra con la solución preservadora procurando que la muestra se encuentre lo más homogénea posible.

4.- Transferir 500µl del esputo preservado a un tubo eppendorff de 2mL.

5.- Adicionar 500µl del buffer Sputum Liquefier al tubo eppendorff, mezclar por inversión con la muestra preservada por algunos segundos. Para asegurar la homogenización de la muestra, colocar en baño maría a 56ºC de 30 minutos a 1 hora.

6.- Adicionar 10µl de proteinasa K (agitar la proteinasa K antes de usar), mezclar en agitador magnético por 20 segundos e incubar la muestra a baño maría por 1 hora.

7.- Adicionar 1mL de isopropanol a la muestra. Mezclar por inversión.

8.- Centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos a 14,000 xg.

9.- Remover y descartar cuidadosamente el sobrenadante, procurando no desechar el pellet de DNA. Colocar el tubo boca abajo para remover el residuo de isopropanol.

10.- Con mucho cuidado adicionar 500µl de etanol al 70%. Disgregar el pellet de ADN por 1 minuto.

11.- Centrifugar a temperatura ambiente por 2 minutos 4,000 xg; con precaución remover y descartar el etanol sin remover el pellet.

12.- Colocar el tubo abierto boca abajo en papel absorbente por un periodo de 10 a 15 minutos para remover el exceso de etanol al 70% y secar al aire el pellet de DNA.

13.- Adicionar 100µl de TE buffer. Agitar por 1 minuto e incubar a baño maría a 56ºC por 1 hora con la finalidad de rehidratar el pellet.

14.- Centrifugar el tubo a 14,000 xg por 130 segundos, para que cualquier material insoluble se posicione en el fondo del tubo.

15.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio procurando no disgregar el pellet.

16.- El material genético purificado puede ser almacenado a 4ºC por 2 meses. Es recomendable que las muestras sean almacenadas a -20ºC para periodos más largos de almacenamiento.

Anexo 4. Kit de conversión con bisulfito de sodio: EZ DNA Methylation kit de Zymo Research.

Contenido del kit:

- Reactivo de conversión CT.
- Buffer de dilución M.
- Buffer de unión M.
- Buffer de lavado M.
- Buffer de desulfonación M.
- Buffer de elución.
- Columnas Zymo-Spin™ IC.
- Tubos colectores.

El kit EZ DNA Methylation emplea un procedimiento simplificado para la conversión del DNA con bisulfito de sodio. Se basa en 3 reacciones entre las citosinas y el bisulfito de sodio, en este proceso las citosinas son convertidas a uracilo. El uso de columnas elimina cualquier formación de precipitados en la muestra.

Especificaciones

DNA problema: muestras que contengan 500 pg/µL de DNA, para mejores resultados la cantidad de DNA debe estar entre 200 y 500 ng.

Eficiencia de conversión: >99%de los residuos de citosina no metilados son convertidos a uracilos; >99% de las citosinas metiladas no sufren ningún cambio.

Cobertura del DNA:>80%.

Protocolo

1. Colocar 5 µl del buffer de dilución a la muestra de DNA y ajustar a un volumen total de 50 µl con agua grado biología molecular. Mezclar la muestra con la pipeta.
2. Ejemplo: para 14 µl de DNA adicionar 5 µl del buffer de dilución-M y 31 µl de agua grado biología molecular.
3. Incubar la muestra a 37°C durante 15 minutos.
4. Después de la incubación, adicionar 100 µl del reactivo de conversión CT a cada muestra y mezclar.
5. Incubar la muestra en obscuridad a 50°C por 12-16 horas.
6. Incubar las muestras entre 0-4°C (hielo) por 10 minutos, las muestras se pueden mantener a 4°C hasta por 20 horas.
7. Adicionar 400 µl del buffer de unión-M en una columna Zymo-Spin™ y colocarlo en el tubo colector.
8. Cargar la muestra (paso 5) en la columna que contiene el buffer de unión-M. cerrar la tapa y mezclar por inversión varias veces. Zymo-Spin™.
9. Centrifugar a máxima velocidad (≥10,000 xg) por 30 segundos. Descartar el flujo continuo.
10. Adicionar 100 µl de M-Wash-Buffer a la columna. Centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos.
11. Adicionar 200 µl de M-Desulphonation Buffer a la columna y dejar reposar a temperatura ambiente (20-30°C) durante 15-20 minutos. Después de la incubación, centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos.
12. Adicionar 200 µl de M-Wash-Buffer a la columna. Centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos. Adicionar otros 200 µl de M-Wash-Buffer y centrifugar 30 segundos más a toda velocidad.

13. Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml. Adicionar 10 µl de M-Elution-Buffer directamente a la matriz de la columna. Centrifugar a máxima velocidad para eluir el DNA.

El DNA queda listo para su análisis inmediato o se puede almacenar a temperaturas menores a -20°C para evitar degradación. Para almacenamiento a largo plazo colocarlo a -70°C. Se recomienda el uso de 1-4 µl del eluido para cada PCR, no obstante, se puede usar 10 µl del eluido si es necesario.

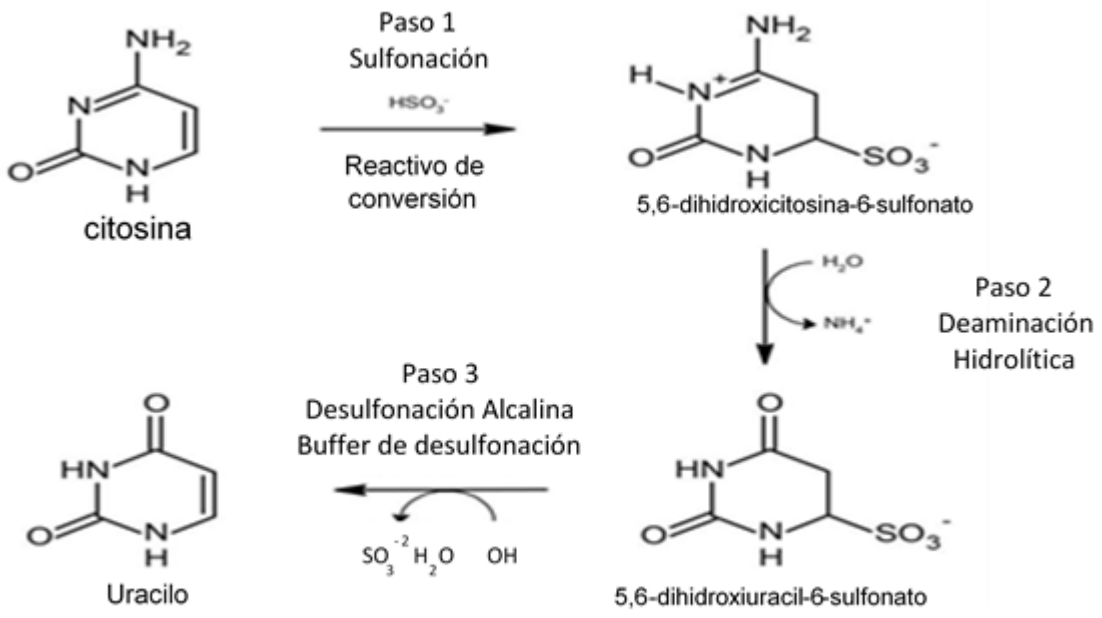

Figura 13. Conversión con bisulfito de sodio. Modificado de Zymo Research Corp., CA, USA.

Anexo 5. Guía para el protocolo de metilación, ensayo Infinium EPIC 850k de Illumina.

illumina

Infinium® HD Assay Methylation Protocol Guide

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ILLUMINA PROPRIETARY
Material # 20002138
Document # 15019519 v01
November 2015

Anexo 6. Script empleado en el análisis de datos provenientes del microarreglo

```
##methylation analysis EPIC - 850k##
source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite()
biocLite(c("limma","minfi","IlluminaHumanMethylationEPICanno.ilm10b4.hg19","IlluminaHuman
MethylationEPICmanifest"))
library(limma)
library(minfi)
library(IlluminaHumanMethylationEPICanno.ilm10b4.hg19)
library(IlluminaHumanMethylationEPICmanifest)
library(ggplot2)
library(RColorBrewer)
library(missMethyl)
library(matrixStats)
library(minfiData)
library(Gviz)
library(DMRcate)
library(stringr)
library(wateRmelon)
## get the 450k annotation data##
annEPIC850k = getAnnotation(IlluminaHumanMethylationEPICanno.ilm10b4.hg19)
head(annEPIC850k)
##si lo vas a hacer en rstudio fijar el directorio donde tienes los datos
## read in the sample sheet for the experiment
targets<-read.csv("muestras_methylation_SGC_conexclucion.csv", header=T)
targets
## read in the raw data from the IDAT files
rgSet <- read.metharray.exp(targets=targets)
rgSet
## give the samples meaningful names
targets$ID = paste(targets$Sample_Name.1,targets$Sample_Name,sep=".")
sampleNames(rgSet) = targets$ID
rgSet
## calculate the detection P-values
detP = detectionP(rgSet)
head(detP)
###Quality control
pal = brewer.pal(8,"Dark2")
pdf("pvalues_methylation.pdf")
par(mfrow=c(1,1))
barplot(colMeans(detP),las=2,cex.names=0.4, col=pal[factor(targets$Sample_Label)],
      main="Mean detection p-values")
abline(h=0.01,col="red")
legend("topright",legend=levels(factor(targets$Sample_Group)),cex=0.8, fill=pal,bg="white")
barplot(colMeans(detP), las=2,cex.names=0.4,ylim=c(0,0.002),
col=pal[factor(targets$Sample_Label)],
      main="Mean detection p-values")
abline(h=0.01,col="red")
legend("topright",legend=levels(factor(targets$Sample_Group)),fill=pal, cex=0.8,bg="white")
dev.off()

## remove failed samples
keep = colMeans(detP) < 0.05
rgSet = rgSet[,keep]
```

```
targets = targets[keep,]
detP = detP[,keep]
rgSet
targets
## produce a general QC report for the data
qcReport(rgSet,sampNames=targets$Sample_ID,sampGroups=targets$Sample_Group,pdf="qc
Report.pdf")

##NORMALIZACION
pal = brewer.pal(8,"Dark2")
## create a MethylSet object from the raw data
mSetSq <- preprocessQuantile(rgSet)
mSetRaw <- preprocessRaw(rgSet)
## [preprocessQuantile] Quantile normalizing.
pdf("density.pdf")
par(mfrow=c(1,1))
densityPlot(rgSet, sampGroups=targets$Sample_Group,main="Raw", legend=T)
legend("topright", legend = levels(factor(targets$Sample_Group)),
      text.col=brewer.pal(8,"Dark2"))
densityPlot(getBeta(mSetSq), sampGroups=targets$Sample_Group ,
           main="Normalized", legend=T)
legend("topright", legend = levels(factor(targets$Sample_Group)),
      text.col=brewer.pal(8,"Dark2"))
dev.off()

###Data exploration
## MDS plots to look at largets sources of variation
pdf("mds.pdf")
par(mfrow=c(1,1))
plotMDS(getM(mSetSq), top=1000, gene.selection = "common", pch=10,
col=pal[factor(targets$Sample_Group)])
legend("topright",legend=levels(factor(targets$Sample_Group)),text.col=pal)
plotMDS(getM(mSetSq), top=1000, gene.selection = "common", pch=10,
col=pal[factor(targets$Sample_Group)], dim=c(1,3))
legend("topright",legend=levels(factor(targets$Sample_Group)),text.col=pal)
par(mfrow=c(1,1))
## Examine higher dimensions to look at other sources of variation
plotMDS(getM(mSetSq), top=1000, gene.selection = "common", pch=10,
col=pal[factor(targets$Sample_Group)], dim=c(2,3))
legend("topright",legend=levels(factor(targets$Sample_Group)),text.col=pal)
plotMDS(getM(mSetSq), top=1000, gene.selection = "common", pch=10,
col=pal[factor(targets$Sample_Group)], dim=c(1,4))
legend("topright",legend=levels(factor(targets$Sample_Group)),text.col=pal)
dev.off()

###Poor performing probes are generally filtered out prior to differential methylation analysis. As
the signal from these probes is unreliable, by removing them we perform fewer statistical tests
and thus incur a reduced multiple testing adjustment. We filter out probes that have failed in one
or more samples based on detection p-value. The detection p-values are automatically
calculated using the signal from the negative control probes on the array; probes that are
determined to not have a signal significantly different from the background level have high
detection p-values.######
## remove any probes that have failed in one or more samples##
```

```
detP = detP[match(featureNames(mSetSq),rownames(detP)),]  # ensure probes are in the same
order in the mSetSq and detP objects##
keep = rowSums(detP < 0.01) == ncol(mSetSq)
table(keep)
mSetSqFlt = mSetSq[keep,]
mSetSqFlt
keep = !(featureNames(mSetSqFlt) %in% annEPICanno$Name[annEPICanno$chr %in%
c("chrX","chrY")])  ####esto no lo realice debido a que todas mis muestras son de sexo
femenino###
## remove probes with SNPs at CpG or SBE site##
mSetSqFlt = dropLociWithSnps(mSetSqFlt)
mSetSqFlt

####despues de normalizar y filtrar, se pueden calcular los valores de Beta y M###
mVals = getM(mSetSqFlt)
head(mVals)
bVals = getBeta(mSetSqFlt)
head(bVals)

## calculate M-values and Beta-values for statistical analysis
pdf("B-M_Values.pdf")
par(mfrow=c(1,1))
densityPlot(bVals, sampGroups=targets$Sample_Group, main="Beta values",
          legend=FALSE, xlab="Beta values")
legend("top", legend = levels(factor(targets$Sample_Group)),
      text.col=brewer.pal(8,"Dark2"))
densityPlot(mVals, sampGroups=targets$Sample_Group, main="M-values",
          legend=FALSE, xlab="M values")
legend("topleft", legend = levels(factor(targets$Sample_Group)),
      text.col=brewer.pal(8,"Dark2"))
dev.off()

# this is the factor of interest
cellType = factor(targets$Sample_Group)

# use the above to create a design matrix
design <- model.matrix(~0+cellType, data=targets)
colnames(design) <- c(levels(cellType))
rownames(design)<-sampleNames(mSetSqFlt)
# fit the linear model
fit <- lmFit(mVals, design)
# create a contrast matrix for specific comparisons
contMatrix <- makeContrasts("EP_HL-EXP_HL",
                        levels=design)

# fit the contrasts
fit2 <- contrasts.fit(fit, contMatrix)
fit2 <- eBayes(fit2)
# look at the numbers of DM CpGs at FDR < 0.05
summary(decideTests(fit2))

DMPs <- topTable(fit2, num=Inf, coef=1, genelist=annEPIC850k)
write.csv(DMPs,file="DMPs.csv",quote=F)
pdf("CPG_EP_HL-EXP_HL.pdf")
```

```
par(mfrow=c(2,2))
sapply(rownames(DMPs)[1:750], function(cpg){
  plotCpg(bVals, cpg=cpg, ylab = "Beta values", pheno = targets$Sample_Group)
})
dev.off()

###Gene ontology testing
sigCpGs = DMPs$Name[DMPs$adj.P.Val<0.05]
sigCpGs[1:10]
length(sigCpGs)
all = DMPs$Name
length(all)
pdf("ontologiagenica.pdf")
par(mfrow=c(1,1))
gst <- gometh(sig.cpg=sigCpGs, all.cpg=all, plot.bias=TRUE)
dev.off()

topGO(gst)

write.csv(topGO,file="top.GO.csv",quote=F)
topGO
dev.off()

###Differential variability
fitvar <- varFit(mVals, design = design, coef = c(1,2))
contr <- makeContrasts("EP_HL-EXP_HL",
                       levels=design)
fitvar <- contrasts.varFit(fitvar,contrasts=contr)
summary(decideTests(fitvar))
topDV <- topVar(fitvar, coef=1)
topDV
pdf("differential_variability.pdf")
par(mfrow=c(2,2))
sapply(rownames(topDV)[1:100], function(cpg){
  plotCpg(bVals, cpg=cpg, ylab = "Beta values", pheno = targets$Sample_Group)
})
dev.off()



#### analisis de metilacion diferencial por regiones##
myAnnotation <- cpg.annotate(object = bVals, datatype = "array", what = "Beta",
                             analysis.type = "differential", design = design,
                             contrasts = TRUE, cont.matrix = contMatrix,
                             coef = "EP_HL-EXP_HL", arraytype = "EPIC",fdr=0.00005)
DMRs <- dmrcate(myAnnotation, lambda=1000, C=2)
head(DMRs$results)
results.ranges <- extractRanges(DMRs, genome = "hg19")
# set up the grouping variables and colours
groups <- pal[1:length(unique(targets$Condicion))]
names(groups) <- levels(factor(targets$Condicion))
cols <- groups[as.character(factor(targets$Condicion))]
samps <- 1:nrow(targets)
# draw the plot for the top DMR
```

```
DMR.plot(ranges=results.ranges, dmr=1, CpGs=bVals, phen.col=cols, what = "Beta",
        arraytype = "EPIC", pch=10, toscale=TRUE, plotmedians=TRUE,
        genome="hg19", samps=samps)

## GO term enrichment
sigCpGs <- DMPs$Name[DMPs$P.Value<0.00005]
length(sigCpGs)
all <- DMPs$Name
length(all)
par(mfrow=c(1,1))
gst <- gometh(sig.cpg=sigCpGs, all.cpg=all, plot.bias=TRUE)
sigCpGs <- DMPs$Name[DMPs$P.Value<0.05]
all <- DMPs$Name
par(mfrow=c(1,1))
gst <- gometh(sig.cpg=sigCpGs, all.cpg=all, plot.bias=TRUE)

topGO(gst, number=10)
##Age calculation
edad<-agep(bVals)

###Differential methylation analysis (regions)
myAnnotation = cpg.annotate(datatype = "array", bVals, annotation=c(array =
"IlluminaHumanMethylationEPICanno", annotation = "ilm10b4.hg19") ,
analysis.type="differential", design=design, contrasts = TRUE,arraytype="EPIC",
                        cont.matrix = contMatrix, coef="EP_HL-EXP_HL")
str(myAnnotation)
DMRs = dmrcate(myAnnotation, lambda=1000, C=2)
par(mfrow=c(1,1))
DMR.plot(dmrcoutput=DMRs, dmr=1, CpGs=bVals,
phen.col=pal[factor(targets$Sample_Group)],genome="hg19", array.annotation = c(array =
"IlluminaHumanMethylationEPIC", annotation = "ilm10b2.hg19"),
        pch=16, toscale=TRUE, plotmedians=TRUE)
legend("bottomleft",legend=levels(factor(targets$Sample_Group)),col=pal,lty=1)
```

Anexo 7. Cuantificación de proteínas por el método de ELISA

Se emplearon 3 kits de ELISA para la determinación cuantitativa *in vitro* de las concentraciones de FMOD, endotelina 1 y PTEN humana en el sobrenadante de esputo inducido.

Principio de prueba. Los estuches de ELISA utilizan el principio sándwich-ELISA. La placa de micro ELISA que proporcionan estos kits fueron recubiertos previamente con un anticuerpo específico para cada proteína. Se añadieron estándares o muestras a los pocillos de la placa de micro ELISA y se combinaron con el anticuerpo específico. Posteriormente, se agregó un anticuerpo de detección biotinilado específico para cada proteína analizada (FMOD, END1 o PTEN humano) y el conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo de microplaca y se incubo. Los componentes libres son lavados. La solución de sustrato se adicionó a cada pozo. Los pocillos que contenían las proteínas humanas, anticuerpo de detección biotinilado y conjugado de abidina-HRP aparecerán de color azul. La reacción enzima-sustrato se termina con la adición de una solución de paro y el color se vuelve amarillo. La densidad óptica (OD) se midio espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm (±2nm). El valor OD es proporcional a la concentración de FMOD, endotelina-1 y PTEN humana. Se puede calcular la concentración de las proteínas humanas en las muestras comparando el OD de las muestras con la curva estándar.

Tabla 7.Reactivos utilizados para la cuantificación de proteínas por ELISA.

Reactivo	**Almacenamiento**
Placa Micro ELISA (Desmontable)	-20 ℃, 6 meses
Estándar de referencia	
Detección concentrada biotinilada Ab (100 ×)	
Conjugado HRP concentrado (100 ×)	-20 ℃ (proteger de la luz), 6 meses
Estándar de referencia y diluyente de muestra	4 ℃, 6 meses
Detección Biotinilada Ab Diluyente	
HRP conjugado diluyente	
Tampón de lavado concentrado (25 ×)	
Reactivo de sustrato	4 ℃ (proteger de la luz)
Solución de paro	4 ℃
Sellador de placas	

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a una enzima, HRP: Solución de trabajo conjugado, Ab: abidina.

Otros materiales requeridos

- Lector de microplacas con filtro de longitud de onda de 450 nm.
- Pipeta de transferencia de alta precisión.
- Tubos eppendorff.
- Puntas de pipeta desechables.
- Incubadora capaz de mantener 37°C.
- Agua desionizada.
- Papel absorbente.
- Ranura de carga para solución tampón de lavado.

Preparación de los reactivos

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (25°C) antes de usarlos. Seguir el manual de las microplacas para configurar y precalentar el equipo durante 15 minutos antes de medir la densidad óptica.

Wash Buffer: Diluir el buffer de lavado concentrado con agua desionizada o destilada para preparar la solución de lavado a la concentración necesaria para cada proteína. Nota: si se han formado cristales en el concentrado, calentarlo en baño maría a 40°C y mezclarlo hasta disolver.

Standard working solution: centrifugar la solución estándar a 10,000xg por 1 minuto. Adicionar 1.0 mL de estándar de referencia y diluyente de la muestra, dejarlo reposar durante 10 minutos e invertir gentilmente varias veces. Después de disolver completamente mezclar bien con una pipeta. Esta reconstitución produce una solución de trabajo de 20ng/µL. Hacer las diluciones seriadas necesarias. El gradiente de diluciones recomendado es el siguiente: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0 ng/mL.

Método de dilución: tomar 7 tubos eppendorff añadir 500 µl del estándar de referencia y diluyente de la muestra en cada tubo. Pipetear 500 µL de los 20 ng/µL de la solución de trabajo al primer tubo y mezclar para producir una solución de trabajo de 10 ng/µL. Tomar con una pipeta 500 µL de la solución del primer tubo dentro del siguiente tubo. Nota que el último tubo se considera como blanco.

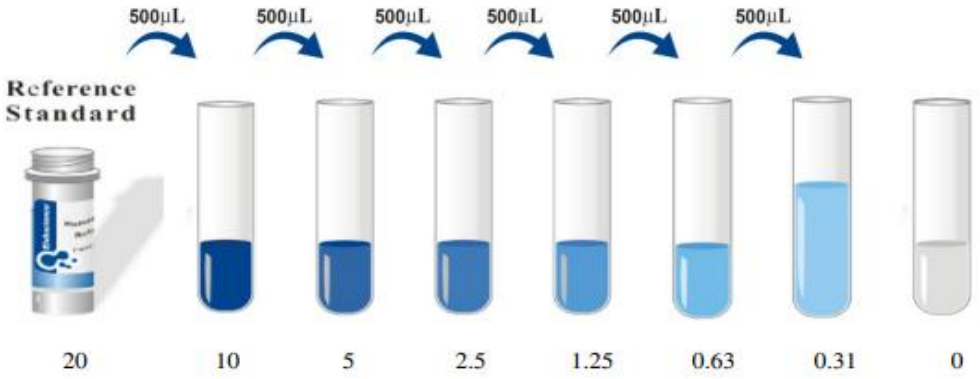

figura 14. Preparación de las diluciones para la curva estándar.

Detección de solución biotinizada Ab: calcular la cantidad requerida antes del experimento (100 µL/pozo). Preparar un poco más de lo calculado, centrifugar el tubo antes de usar. Diluir la solución concentrada (100x) de detección biotinizada a concentración 1x con el diluyente.

Solución de trabajo conjugado HRP concentrado. Calcular la cantidad requerida antes del experimento (100 µL/pozo). Preparar un poco más de lo calculado diluir la el conjugado HRP conjugado (100x) a 1x con la solución de trabajo, diluyente del concentrado conjugado HRP.

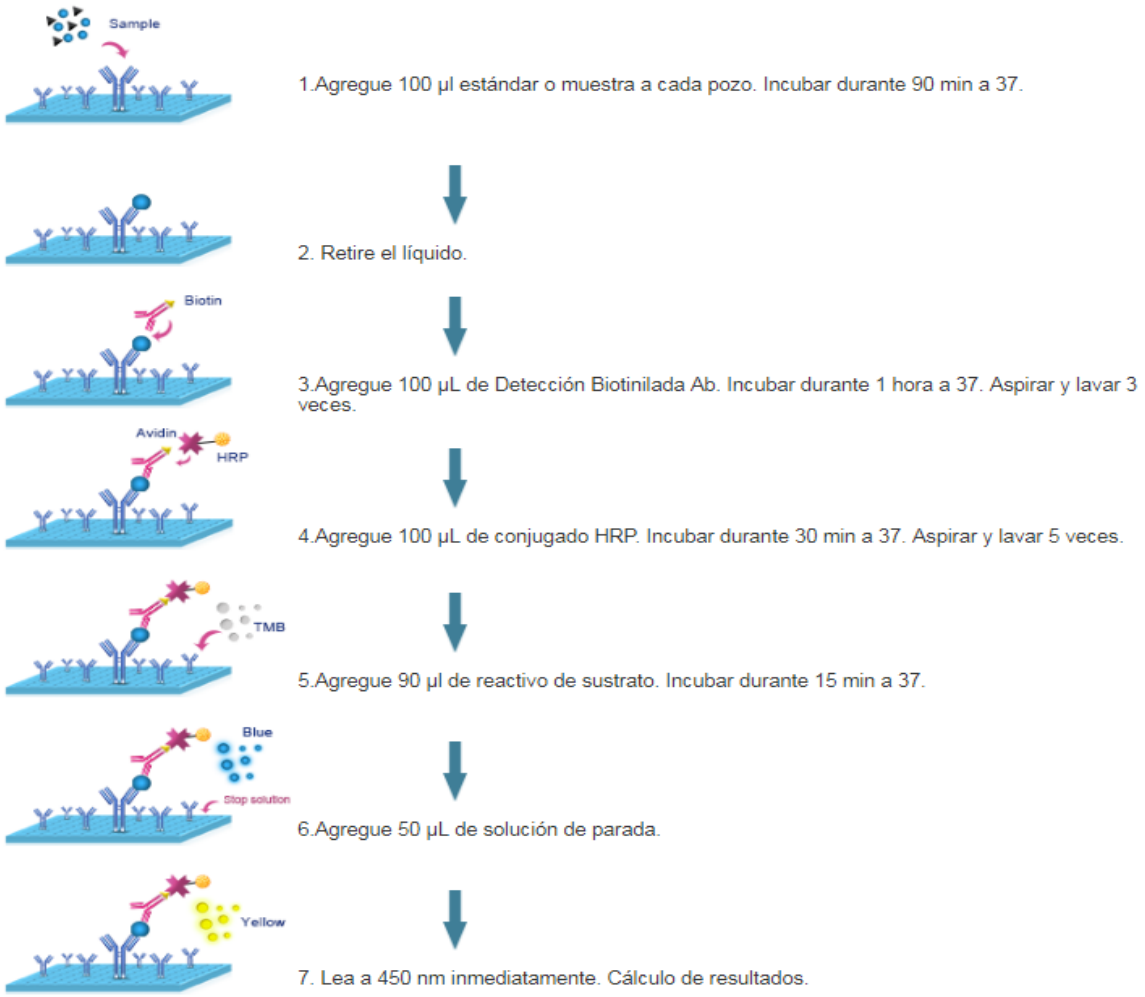

figura 15. Diagrama de flujo para la técnica de ELISA.

Anexo 8. Kits empleados para la cuantificación de proteínas en sobrenadante de esputo inducido.

Elabscience®

7th Edition, revised in April, 2017

(FOR RESEARCH USE ONLY. DO NOT USE IT IN CLINICAL DIAGNOSTICS !)

Human FMOD(Fibromodulin) ELISA Kit

Synonyms: SLRR2E, SLRR2-E

Catalog No : E-EL-H2098
96T

This manual must be read attentively and completely before using this product.

If you have any problems, please contact our Technical Service Center for help (info in the header of each page).

Phone: 240-252-7368(USA) 240-252-7376(USA)
Email: techsupport@elabscience.com
Website: www.elabscience.com

Please refer to specific expiry date from label on the side of box.

Please kindly provide us with the lot number (on the outside of the box) of the kit for more efficient service.

Human PTEN(Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN) ELISA Kit

Attention!

It is good practice, on receipt to the kit/s, to run a preliminary assay (pretest) with the standards and a few typical samples before assaying your precious samples. If the color development (blue to yellow) of either the standards or the samples appears to be too high or too low then do not use the rest of the kit until either you have resolved the issue (sample dilutions etc.) or contacted technical support for their assistance at sales@mybiosource.com

Catalog No: MBS761600

Size: 48T/96T

Reactivity: Human

Detection Range: 0.156-10ng/ml

Sensitivity: <0.094ng/ml

Application: For quantitative detection of PTEN in serum, plasma, tissue homogenates and other biological fluids.

Storage: 4°C for 6 months

NOTE: FOR RESEARCH USE ONLY.

Kit Components

Item	Specifications(48T/96T)	Storage
ELISA Microplate(Dismountable)	8×6 /8×12	4°C/-20°C
Lyophilized Standard	1 vial/2 vial	4°C/-20°C
Sample / Standard Dilution Buffer	10ml/20ml	4°C
Biotin-labeled Antibody (Concentrated)	60ul/120ul	4°C
Antibody Dilution Buffer	5ml/10ml	4°C
HRP-Streptavidin Conjugate(SABC)	60ul/120ul	4°C(shading light)
SABC Dilution Buffer	5ml/10ml	4°C
TMB Substrate	5ml/10ml	4°C(shading light)
Stop Solution	5ml/10ml	4°C
Wash Buffer (25X)	15ml/30ml	4°C
Plate Sealer	3/5pieces	
Product Description	1 copy	

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

MyBioSource.com

Human Endothelin 1 Antibody (Anti-ET-1) ELISA Kit

Cat.No: MBS025621

Store the kit at 2°C-8°C !

Valid Period: Six Months (2°C-8°C)!

Specification: 48 well kit or 96 well kit

FOR LAB REAGENT/RESEARCH USE ONLY!

NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC APPLICATIONS!

1. Introductions

This **Quantitative Sandwich ELISA** kit is for lab reagent/research use only, not for drug, household, therapeutic or diagnostic applications! This kit is intended to be used for determine the level of Anti-ET-1 (hereafter termed "analyte") in **undiluted original Human body fluids** and **tissue homogenates**. This kit is **NOT** suitable for assaying non-biological sources of substances.

2. Performances

Sensitivity: The sensitivity of this kit is 1.0pg/ml.

Detection Range: The detection range of this kit is 6.25pg/ml-200pg/ml.

Reproducibility: Both Intra-assay CV (%) and Inter-assay CV (%) is less than 15%. [CV(%) = SD/mean ×100]. All CV% should be compared by concentration, not compared by OD values.

3. Precautions

3.1) We reserve the right to amend the terms and conditions of any change without prior notice in this manual.

3.2) Limited by current skill and knowledge, it is impossible for us to complete the cross-reactivity detection between this analyte and all its analogues; therefore, cross reaction to other targets may potentially exist. Furthermore, cross-reactivity could vary between sample type or species.

3.3) Influenced by factors including cell viability, cell number and sampling time, samples from cell culture supernatant/extract or cell lysates are NOT suitable for detection by this kit.

3.4) The reagents and the plate of the kit and its technical parameters are matched and designed for optimal performance only when they are together as a whole kit, so please do **NOT** substitute reagents from one kit to other kits and use only the reagents supplied by manufacturer. Due to the possibility of mismatching between antigen/antibody from other manufacturers and antibody/antigen used in this kit (such as differences in conformational epitopes caused by chemical environments or differences in linear epitopes, and so on), some synthetic peptides, recombinant proteins and extracted proteins can not be detected out by this kit. Additionally, we will **NOT** be responsible for using this kit or any part of this kit to do any other experiments (such as western blot, immunohistochemistry, spike/recovery and so on) arbitrarily.

3.5) Results from end users might be inconsistent with our in house data due to some unexpected transportation or storage conditions, or different ambient temperature, lab equipment, operation, pipetting, washing, incubation temperature or time, and kit age. Assay variance among wells or kits might arise from these factors, too.

3.6) The Stop Solution is an acid solution, please avoid contact it, it may cause skin irritations and burns. so please pay enough attention to safety when use it. Samples should be handled as potentially hazardous and capable of transmitting disease. Disposable gloves must be worn during the assay procedure, since no known test method can offer complete assurance that products derived from body will not transmit infectious agents. Therefore, all blood derivatives should be considered potentially infectious and good laboratory practices should be followed.

4. Materials Required but Not Supplied

4.1) Distilled water.

4.2) Absorbent paper or paper towels.

4.3) Pipettes and disposable pipette tips.

4.4) An ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm.

MyBiosource.com

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.