



**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**

**ANÁLISIS DE METILACIÓN EN EL PROMOTOR DE LOS GENES DE
INTERLEUCINA-17 (IL-17) E INTERLEUCINA-27(IL-27) EN LA ENFERMEDAD
ARTERIAL CORONARIA.**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
ADRIÁN ASael RODRÍGUEZ CORTÉS**

**TUTOR: DR. JOSÉ MANUEL RODRÍGUEZ PÉREZ
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA, IGNACIO CHÁVEZ.**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, OCTUBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Aurora de la Peña Díaz. Instituto Nacional de Cardiología, “Dr. Ignacio Chávez”

VOCAL: Dr. Antonio Miranda Duarte. Instituto Nacional de Rehabilitación, “Dr. Luis Guillermo Ibarra Ibarra”.

VOCAL: Dr. José Manuel Rodríguez Pérez. Instituto Nacional de Cardiología, “Dr. Ignacio Chávez”.

VOCAL: Dra. Martha Estela Pérez Rodríguez. Centro Médico Nacional, Siglo XXI, “IMSS”.

SECRETARIO: Dra. Nancy L. Martínez Rodríguez. Hospital Infantil de México, “Federico Gómez”.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genómica, del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” bajo la dirección del Dr. José Manuel Rodríguez Pérez.



Programa de
**MAESTRÍA y
DOCTORADO** en
Ciencias Médicas
Odontológicas
y de la Salud



Este Proyecto de investigación fue apoyado por CONACYT
Fondo Sectorial en Salud y Seguridad Social - 2015 (Proyecto número 261741)



AGRADECIMIENTOS:

Primeramente, mi agradecimiento a Dios y su Santísima Madre, por haberme infundido la fuerza, la alegría, el entusiasmo, la templanza, la entereza y la alegría de poder ser partícipe de esta maravillosa experiencia de la maestría; si no fuera por ellos, sin duda, yo no estaría aquí en este momento. Con la bendición de Dios, este proyecto, finalmente se concreta. ¡Gracias!

Mi profundo agradecimiento al Dr. José Manuel Rodríguez Pérez por el apoyo, el tiempo invertido, las enseñanzas, las experiencias académicas y de vida, la paciencia y la dedicación invertida en este trabajo; sin su ayuda y total apoyo desde el inicio del mismo, y luego de sortear algunos obstáculos, esto no hubiera sido posible.

A la Dra Nonanzit Iracema Pérez Hernández, una especial y afectuosa mención, por su apoyo, su guía, su paciencia, su confianza y sus enseñanzas. Es usted una formidable mentora.

A la UNAM, la Facultad de Química, y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, por el apoyo brindado desde el inicio de este proyecto.

A la Dra Martha Menjívar, por su consejo y sus palabras, en el momento de crisis; nunca olvidaré el acertado consejo. Gracias por su apoyo.

Mi especial agradecimiento al jurado revisor de este trabajo, por el tiempo, el compromiso, la dedicación, los excelentes comentarios, y su apreciable disposición para la revisión de este trabajo.

DEDICATORIA:

Querida y adorada madre; solo tú eres la razón y el fundamento de muchos de los proyectos que siempre he emprendido. Eres el motor, la guía y el apoyo que siempre he necesitado. Eres la luz en los momentos de oscuridad, eres fortaleza en la debilidad, guía en el momento sin dirección. ¡Tú eres la mejor maestra de vida! Gracias por tu apoyo, tu corrección, tu amor, tus enseñanzas, tus palabras en el momento preciso. No soy el mejor hijo, pero tú, sí que eres la mejor de las madres. Entre nosotros, nunca sobran las palabras, pero también, he de reconocer que siempre con insuficientes para expresar precisamente lo que tú significas para mí, y el amor, la gratitud y devoción que tú mereces. ¡Este trabajo te pertenece enteramente a ti!

A Uriel, mi hermano; en cada paso que doy, siempre has de estar presente en mi mente, mis pasos y mi corazón.

A Alegna, Damaris y Cristina; siempre hicieron de mi estancia en el laboratorio, un lugar de armonía, de luz, de compañerismo y de diversión en medio del trabajo. Ustedes, también me dejaron profundas, apreciables y valiosas experiencias y enseñanzas.

A todos mis compañeros de la maestría, con los que siempre compartí polémicos, interesantes y divertidos momentos: Zaira, Paco, Narda, Mariana, Karina, Cinthya, Daniela, Eder...les recuerdo con cariño y afecto.

A Xóchitl, que la vida nos puso en el camino y, además de excelente maestra, es una entrañable amiga; gracias por tu ayuda, apoyo, consejos y enseñanzas.

“Un amigo fiel es un refugio seguro: el que lo encuentra ha encontrado un tesoro. Un amigo fiel no tiene precio, no hay manera de estimar su valor. Un amigo fiel es un bálsamo de vida, que encuentran los que temen al Señor.” (Sirácide 6, 14-16) Querida Paola, gracias por tu amistad, tus palabras y tu apoyo; eres como una luz de Dios en el momento preciso.

A Marva, Silvestre y el señor Juan, por su apoyo, su recibimiento, su trato y su compañerismo, que hicieron confortables mis días en el laboratorio.

En Cristo, “están ocultos todos los tesoros de la sabiduría y de la ciencia” (Cfr. Col 2, 3)

“Es una bendición no ser nadie, porque así se puede criticar libremente aquello que es criticable, sin deberle nada a nadie, sin hipotecas ideológicas, sin compromisos con las modas filosóficas y teológicas, con la libertad del que nada tiene que perder porque no es importante, ni tiene títulos ni galardones.”

~ Alonso Gracián, filósofo español.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	1
1.- INTRODUCCIÓN.....	2
2.- ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA.....	7
2.1.-Fisiopatología de la EAC.....	7
2.2.- Hallazgos recientes en la comprensión del fenómeno inflamatorio de la EAC.....	12
3.- LA INTERLEUCINA-17 (IL-17) Y SU PARTICIPACIÓN EN LA EAC... 	12
3.1.- Generalidades y características de la IL-17A.....	13
3.2.- Origen biológico de la IL-17A y algunas de sus funciones.....	13
3.3.- Participación paradójica de la IL-17A en la EAC.....	15
4.- LA INTERLEUCINA-27 (IL-27) Y SU PARTICIPACIÓN EN LA EAC... 	16
4.1.- Generalidades y características de IL-27.....	18
4.2.- Funciones biológicas de la IL-27.....	19
4.3.- Participación de la IL-27 en la EAC.....	20
5.- EPIGENÉTICA: GENERALIDADES Y	
ASPECTOS FUNDAMENTALES.....	22
5.1.- Principales mecanismos epigenéticos: un breve panorama.....	23
6.- METILACIÓN DEL ADN Y REGULACIÓN	
DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	25
6.1.- Las ADN-metil transferasas (DNMT´s) y la metilación del ADN.....	26
6.2.- Definición y características de las “islas CpG” (CGI´s).....	28
6.3.- Implicaciones de la metilación del ADN.....	30
7.- METILACIÓN DEL DNA Y EAC.....	32
8.- JUSTIFICACIÓN.....	39
9.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
10.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	40
11.- OBJETIVO GENERAL.....	41

11.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
12.- HIPÓTESIS.....	41
13.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
13.1.- Tipo de estudio.....	42
13.2.- Población de estudio.....	42
13.2.1.- Descripción de la muestra.....	42
13.3.- Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	42
13.4.- Método de muestreo.....	43
13.5.- Cálculo del tamaño de muestra.....	43
13.6.- Definición operativa de las variables.....	44
13.7- Métodos de recolección de datos.....	46
13.7.1.- Detección de calcio coronario.....	47
13.7.3.- Mediciones clínicas y antropométricas.....	47
13.7.4.- Análisis de Laboratorio.....	48
13.7.5.- Análisis estadístico.....	48
13.7.6.- Consideraciones éticas e institucionales.....	49
14.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	49
14.1.- Extracción de ADN genómico	49
14.2.- Cuantificación de ADNg.....	50
14.3.- Modificación del ADNg y tratamiento con bisulfito de sodio.....	50
14.4.- Amplificación de la región promotora por PCR específica de metilación (MSP).....	50
15.- RESULTADOS.....	53
16.- DISCUSIÓN	57
17.- CONCLUSIONES	62
18.- ANEXOS	63
18.1- Carta de aceptación del proyecto por parte del Comité de Investigación del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.....	63

18.2.- Carta de aprobación del proyecto por parte del Comité de Investigación y de Ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”	64
18.3.- Técnica de conversión y tratamiento del ADN con bisulfito de sodio	65
18.4.- Interpretación de las figuras 10 y 11	68
19.- BIBLIOGRAFÍA	70

ABREVIATURAS

ABCA1: Proteína transportadora de membrana dependiente de ATP1 subfamilia A.

ABCG1: Proteína transportadora de membrana dependiente de ATP1 subfamilia G.

Act1: Proteína adaptadora 1, activadora del factor nuclear κ B.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADIPOQ: Adiponectina.

ALDH2: Aldehído deshidrogenasa 2.

ALU: Secuencias de alrededor de 300pb, identificadas con la endonucleasa Alu.

Apo B: Apolipoproteína B.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATP: Adenosín trifosfato.

α -p28: Subunidad alfa de la Interleucina 27 (por su masa molar).

β -EBI3: Subunidad beta de la interleucina 27 (Epstein-Barr virus induced gene 3).

CAC: Calcio en arterias coronarias.

CD: Células dendríticas.

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CGI: Islas CpG.

CRC: Complejos remodeladores de la cromatina.

CT: Colesterol total.

CXCL8: Quimiocina motivo C-X-C ligando 8 (también conocida como IL-8).

CX3CL1: Quimiocina motivo C-X3-C ligando 1 (también denominada Fractalquina)

CXCR2: Receptor 2 de quimiocinas motivo C-X-C.

CX3CR1: Receptor 1 de quimiocinas motivo C-X3-C.

CpG: Dinucleótidos guanina-citosina.

DDAH2: Dimetilarginina dimetil amino hidrolasa 2

DNMT: ADN-metiltransferasa

EAC: Enfermedad Arterial Coronaria.

EACp: Enfermedad Arterial Coronaria prematura.

EC: Células endoteliales.

ECV: Enfermedades cardiovasculares.

EPCs: Células progenitoras endoteliales.

ER- α : Receptor alfa de estrógenos.

ER- β : Receptor beta de estrógenos.

GALNT2: UDP-N-acetil- α -D-galactosamina: polipéptido N-galactosaminiltransferasa 2.

GEA: Proyecto de estudio de la Genética de la Enfermedad Aterosclerosa.

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

$\gamma\delta$ -17: Células gamma delta 17.

Hcy: Homocisteína.

HHcy: Hiperhomocisteinemia

HMGCR: 3-hidroxi-3metilglutaril-coenzima A reductasa.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

Hsp60: Proteína de choque térmico 60.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular de tipo 1.

IFN- γ : Interferón gamma

IL-1: Interleucina 1.

IL-1 β : Interleucina 1 beta.

IL-6: Interleucina 6.

IL-17: Interleucina 17.

IL-17A: Interleucina 17A.

IL-27: Interleucina 27.

IL-35: Interleucina 35

JAK2 / STAT3: Sistema de transducción de la cinasa Janus 2 / activador de la transcripción 3.

LEP: Leptina.

LINE-1: Elementos largos interespaciados 1.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LPS: Lipopolisacáridos.

MA: Moléculas de adhesión celular.

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos (también conocida como CCL2: quimiocina motivo C-C ligando 2).

MSP: PCR específica de metilación.

NF κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NK: Células asesinas naturales.

NKT: Células asesinas naturales T.

iNOS: Sintasa inducible de óxido nítrico.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PcG: Complejo multiproteico Polycomb.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGF2: Prostaglandina F2.

P2R: Receptores purinérgicos P2 (activados por ATP).

p66shc: Proteína adaptadora proto oncogénica homóloga a Src-homóloga al colágeno de 66 kDa.

lncRNA: ARN's largos no codificantes

miRNA: micro ARN's.

siRNA: ARN's pequeños de interferencia.

SAM: S-adenosilmetionina

SAH: S-adenosylhomocysteina

SCA: Síndromes coronarios agudos.

SMC: Células musculares lisas.

SR: Receptores "Scavenger".

STAT1: Transductor de señales y activador de la transcripción 1.

TF: Factor de transcripción.

TSS: Sitios de inicio de la transcripción.

TLR: Receptores tipo Toll (por sus siglas en inglés).

TRAF6: Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral.

trxG: Complejo multiproteico Trithorax.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta.

Th-17: linfocitos T ayudadores 17.

VSMC: Células musculares lisas vasculares.

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1.

5-mC: 5-metilcitosina.

5-aza-dC: 5-Aza-2'-desoxicitidina

RESUMEN

La Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) es la principal causa de muerte a nivel mundial y en México. La EAC es un proceso inflamatorio crónico caracterizado por la alteración morfológica y funcional de la pared vascular que en estadios finales tiene como consecuencia la disminución del calibre de la luz arterial y como consecuencia final, el infarto al miocardio. A nivel molecular, los mecanismos que subyacen tras esta enfermedad son complejos y aún no han sido elucidados por completo. Recientemente se ha observado que la epigenética tiene un impacto con el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y en particular, la metilación de los genes de las citocinas IL-17 e IL-27.

Con el fin de determinar si existen diferencias en el patrón de metilación en el promotor de los genes de IL-17A e IL-27 en los grupos de estudio, se diseñó un estudio de tipo prospectivo, transversal y comparativo. Esto se realizó en la cohorte de individuos del proyecto de Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA). A los pacientes y controles, se les determinó el calcio coronario en arterias por tomografía (CAC) como un marcador específico de aterosclerosis e infarto al miocardio, con este valor se clasificó al grupo control (CAC=0), individuos con aterosclerosis subclínica (CAC= > 0) y pacientes con EAC. Con este valor se seleccionaron a 100 pacientes para cada grupo, individuos a los cuales se les extrajo ADN de sangre periférica.

El análisis de metilación se realizó por la técnica de PCR específica de metilación (MSP). La metilación en el promotor de los genes de IL-17 y IL-27, presentaron una distribución de frecuencias similares en los grupos de estudio ($p < 0.05$).

Sin embargo, este hallazgo nos muestra que existe una participación de estas citocinas en la EAC, pero que el empleo de la estrategia de MSP es poco resolutivo, lo que indica que se requiere un escaneo más detallado, abarcando un mayor número de islas CpG o emplear un método cuantitativo para comprender la participación de estas citocinas, en el proceso inflamatorio en la enfermedad.

1.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles constituyen un fuerte desafío no solo para la salud humana, sino también para el desarrollo y el crecimiento económico de los países que tienen esta problemática. Estas enfermedades son causantes del 63% del total de defunciones en todo el mundo. (Navarro 2001).

El aumento en la prevalencia e importancia de las enfermedades no transmisibles, y específicamente de los factores de riesgo cardiovasculares tales como: hipertensión, diabetes, dislipidemia y obesidad, es el resultado de una interacción compleja entre salud, crecimiento económico y desarrollo, lo que está fuertemente asociado con las tendencias universales, como el envejecimiento de la población mundial, la rápida urbanización no planificada y la globalización de estilos de vida poco saludables (Rosas 2017).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud “Medio Camino” 2016 (ENSANUT MC 2016), en México, los factores de riesgo cardiovascular en la población adulta (20-69 años) se distribuyen de la siguiente manera: hay más de 17 millones de hipertensos, más de 14 millones de dislipidémicos, más de 6 millones de diabéticos, más de 35 millones de adultos con sobrepeso u obesidad y más de 15 millones con grados variables de tabaquismo.

El preocupante aumento de la obesidad en las últimas décadas en todo el mundo coloca a la mala nutrición por exceso en un primer plano como determinante de enfermedades crónicas (OPS 2006). La alimentación rica en energía y la inactividad física son algunos de los factores del desequilibrio energético entre consumo y gasto que ocasiona el desarrollo de la obesidad (Bray 2009). El exceso de tejido adiposo, en particular en la región abdominal, se ha relacionado con la agrupación de factores de riesgo que constituyen el síndrome metabólico (hipertensión arterial, dislipidemia y glucosa en ayuno alterada) y cuya presencia confiere mayor riesgo de diabetes mellitus tipo 2 y ECV (Lee 2007; Martínez-Palomino 2006; Koh-Banerjee P 2004).

Nuestra pirámide poblacional determina que la mayoría de los adultos en nuestro país (75%) tienen menos de 55 años y, a pesar de que la prevalencia en porcentaje de los factores de riesgo cardiovascular es mayor después de los 40 años, en datos absolutos el número de millones portadores de estos factores de riesgo se ubica en la población económicamente activa, con sus consecuencias devastadoras, tanto sociales, económicas y de calidad de vida. Así, las afecciones cardiovasculares caen dentro del rubro de gastos catastróficos (Velázquez 2003).

Las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) son un grupo de enfermedades que comprometen el corazón, los vasos sanguíneos, o las secuelas de un deficiente suministro de sangre debido a una fuente vascular enferma (Lloyd-Jones 2009).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ECV son desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos, y se han convertido en la principal causa de muerte en todo el mundo (OMS 2015). En este grupo de enfermedades se incluyen:

- a) Cardiopatía coronaria: enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco.
- b) Enfermedades cerebrovasculares: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- c) Arteriopatías periféricas: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.
- d) Cardiopatía reumática: lesiones del músculo cardíaco y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por bacterias denominadas estreptococos.
- e) Cardiopatías congénitas: malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento.

- f) Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares: coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.

Del total de defunciones por ECV, según la OMS, más de tres cuartas partes se producen en los países de ingresos bajos y medios.

En México, las enfermedades del corazón representaron casi 20% de las defunciones totales en el país en 2015, de acuerdo con información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), como se observa en la siguiente gráfica (INEGI 2017):

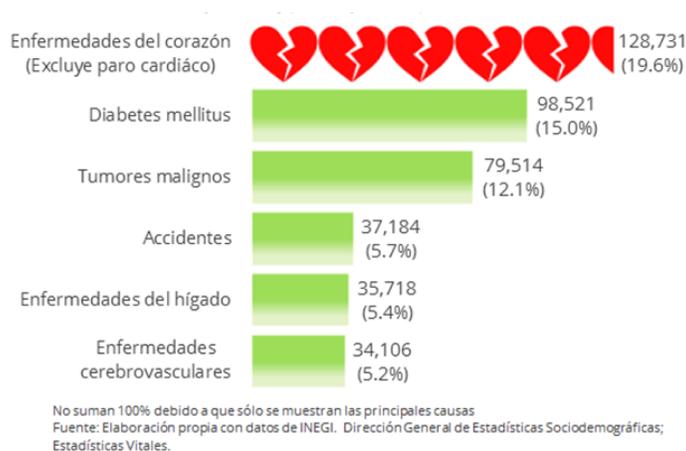


Figura 1. Principales causas de defunción en el año 2015 (INEGI)

De las enfermedades del corazón, las isquémicas ocupan el primer lugar como causas de defunción con 68.5% (INEGI 2017)



Figura 2. Defunciones por enfermedades cardiovasculares específicas en el año 2015 (INEGI)

Del número de muertes causadas en 2015 por enfermedades del corazón, la mayoría tuvieron lugar en personas del sexo masculino con 68,052 muertes, es decir, 7,382 más que el sexo femenino que registró 60,670 defunciones.



Figura 3. Defunciones por enfermedades del corazón, según sexo en 2015. (INEGI)

Si bien el número de muertes por ECV en hombres es mayor, en las mujeres representan 20.8% del total de defunciones, mientras en los hombres representan 18.7%. Es a partir de 65 años en adelante donde las ECV se convierten en la principal causa de mortalidad en ambos sexos.

De acuerdo con el boletín de prensa publicado el 24 de septiembre de 2016 por la Secretaría de Salud (SS, 2015), es importante destacar que, tener una enfermedad cardiovascular, reduce en siete años la esperanza de vida.

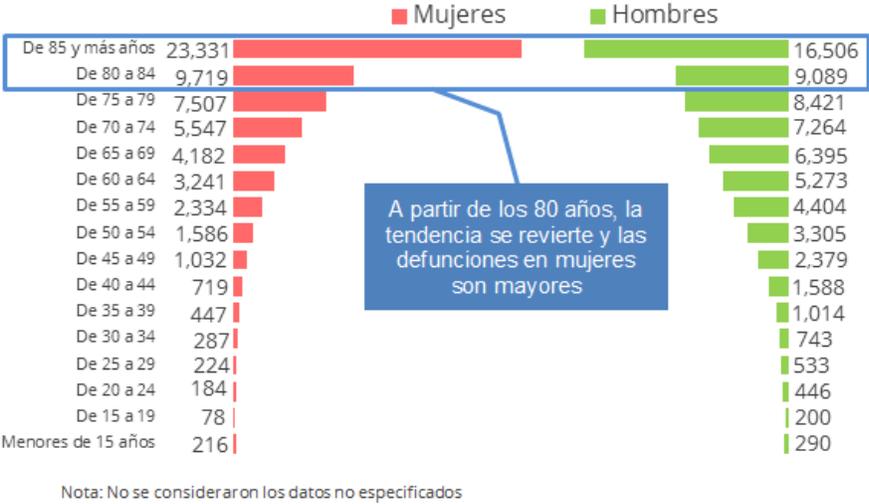


Figura 4. Defunciones por enfermedades del corazón, según sexo y grupo de edad en 2015. (INEGI)

En el mundo cada 4 segundos ocurre un ataque cardiaco, en los Estados Unidos de Norteamérica cada 26 segundos y en México se estima que cada 3 minutos. Por lo anterior y siendo las entidades nosológicas antes mencionadas la pandemia de hoy, no resulta sorprendente saber que son todos los denominados factores de riesgo cardiovascular en su conjunto, donde la aterotrombosis que culmina en infarto agudo del miocardio, el accidente vascular cerebral, la insuficiencia cardiaca, la insuficiencia renal y la ceguera, entre otros, solo son la punta del iceberg que explica por qué son los padecimientos cardiovasculares la causa número uno de morbimortalidad en el adulto (Sánchez, 2016).

Dado el impacto en la salud, y sus repercusiones en la vida socioeconómica de los individuos y de las naciones, es que se hace un tema prioritario el estudio de las enfermedades cardiovasculares, con el objetivo de tener una medicina preventiva, así como establecer claras y mejores estrategias de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las ECV y padecimientos asociados a ellas.

2.- ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA

La aterosclerosis o enfermedad arterial coronaria (EAC) es una enfermedad progresiva y crónica, caracterizada por la acumulación y deposición de lípidos en las capas íntima y media arterial, lo que provoca una reacción inflamatoria y la multiplicación y migración de las células musculares lisas de la pared, que van produciendo estrechamientos de la luz arterial. Los engrosamientos concretos son denominados placa de ateroma (Fundación Española del Corazón, 2018). Esta patología se desarrolla silenciosamente a lo largo de los años y suele estar muy avanzada cuando aparecen los síntomas.

2.1.- Fisiopatología de la EAC.

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico en la pared de las grandes arterias que ocurre en respuesta a un daño crónico y progresivo sobre el endotelio vascular. El desarrollo de este proceso tiene lugar fundamentalmente en la capa íntima arterial donde se desarrolla la placa de ateroma (Libby P, 2011). Los agentes que dañan el endotelio pueden ser uno o varios factores en un mismo individuo: tabaco, hipertensión arterial, diabetes mellitus, hiper-homocisteinemia, lipoproteínas, ácidos grasos libres o ciertas infecciones (*Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*).

La placa de ateroma se origina debido a la placa lipídica que se observa en las grandes arterias y se transforma con el transcurso del tiempo en la placa de ateroma, que de manera temprana no provoca síntomas, pero que suele tener diferentes manifestaciones clínicas dependiendo del lecho vascular afectado (Stoll 2006).

Es así que la EAC comprende un espectro de desórdenes clínicos que abarcan desde la aterosclerosis asintomática y la angina estable hasta los llamados

síndromes coronarios agudos (SCA): angina inestable, infarto y muerte súbita. La EAC es un proceso de oxidación e inflamación crónico caracterizado por la alteración morfológica y funcional de la pared vascular que en estadios finales tiene como consecuencia la disminución del calibre de la luz arterial (Hansson 2005).

A las alteraciones de la pared arterial se asocian con mayor frecuencia fenómenos de agregación plaquetaria y trombosis que pueden llegar a producir la obstrucción completa de la luz del vaso. De manera más detallada, la EAC comienza con la disfunción del endotelio vascular, producida en respuesta a una agresión ejercida en la pared vascular (Schram 2005). Como consecuencia de este daño al endotelio, se produce una infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL; [Low density lipoproteins]) al espacio subendotelial, en donde, al existir un ambiente de estrés oxidativo, ocurre la peroxidación de los lípidos contenidos en las LDL (Stokes 2006).

Las LDL oxidadas son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio vascular y se transforman en macrófagos, los cuales son capaces de fagocitar las LDL oxidadas a través de receptores “scavenger” iniciando el fenómeno inflamatorio (Akira, 2004).

El reclutamiento de monocitos circulantes hacia la capa íntima arterial constituye uno de los fenómenos más tempranos en el desarrollo de la aterosclerosis. La disfunción y la activación de las células endoteliales, resulta de un intento de adaptación a estímulos anormales (valores elevados de LDL, LDL modificadas, radicales libres, fuerzas hemodinámicas, concentraciones elevadas de homocisteína o combinaciones de estos factores) que conducen a un incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular (MA) (Schram 2005; Huo 2001). Estas moléculas median la adherencia y posterior transmigración de los leucocitos mononucleares (monocitos y células T) a través de la superficie endotelial, por lo que tienen un papel crucial en el desarrollo de aterosclerosis (Huo 2001). Inicialmente, los monocitos se adhieren de forma débil al endotelio vascular, proceso denominado rodamiento o adhesión rodante, que es mediado por

selectinas expresadas por las células endoteliales (E- y P-selectinas) y por los monocitos (L-selectina). El rodamiento disminuye la velocidad de los monocitos y permite la interacción de las integrinas leucocitarias (very late-activation antigen [VLA], CD11a/CD18 [LFA-1] y CD11b/CD18 [Mac-1]), y las moléculas adhesión (MA) de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresadas por las células endoteliales (Huo 2001). Esta familia incluye la molécula de adhesión intercelular de tipo 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1). Tanto en modelos animales de aterosclerosis como en lesiones ateroscleróticas humanas, dichas MA se hallan sobre expresadas en relación con el tejido vascular normal (Boisvert 1998). Además, las concentraciones plasmáticas de MA solubles son mucho más elevadas en situaciones de hipertensión, obesidad, dislipidemia y resistencia a la insulina (Schram 2011), así como en pacientes con EAC (Haught 1996), en comparación con controles sanos.

Los monocitos que han sido reclutados se diferencian a macrófagos bajo la influencia del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), una citocina formada en la propia capa íntima inflamada (Hansson 2005).

La adquisición del fenotipo de macrófago se asocia con un incremento en la expresión de receptores de estructuras microbianas (pattern-recognition receptors), incluyendo los receptores tipo Toll (“toll like receptor”; TLR) y los receptores “Scavenger” (SR). Los TLR del macrófago desempeñan un importante papel en la respuesta inmune que caracteriza el proceso aterosclerótico, y activan la respuesta inflamatoria en estas células a través del sistema del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas [NF κ B] (Tobias 2005). Hasta el momento se han identificado como mínimo diez TLR para los cuales se conocen los ligandos activadores (Akira 2004); entre ellos, el TLR4 es uno de los mejor caracterizados en relación con el desarrollo de la aterosclerosis. TLR4 reconoce lipopolisacáridos bacterianos (LPS) y otros ligandos relevantes para la aterogénesis, como las LDL oxidadas y las proteínas de choque térmico (Hsp; heat-shock proteins) como la Hsp60.

Una vez que los monocitos se han adherido firmemente al endotelio, migran hacia la íntima en un proceso estimulado por quimiocinas sintetizadas por células de la pared arterial, como células endoteliales y células musculares lisas, así como por los propios macrófagos. Una de las mejor caracterizadas es la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), también denominada CCL2, que interactúa con el correspondiente receptor monocítico CCR2 y desempeña un papel crítico en el reclutamiento de monocitos a través de la pared arterial (Hansson 2005).

Diversas quimiocinas juegan un papel central en este proceso como CXCL8 y CX3CL1, que se unen a sus respectivos receptores CXCR2 y CX3CR1 (Boisvert 1998; Combadiere 2003). Tanto las citocinas proinflamatorias como las LDL modificadas son capaces de incrementar la expresión de MCP-1 en las células endoteliales, facilitando la trans migración de los monocitos a la íntima arterial (Barter 2005).

La activación de los TLR en macrófagos inicia una cascada de señalización que conduce a la liberación de mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas, proteasas y radicales libres (Tobias 2005). Las citocinas secretadas por los macrófagos estimulan la expresión de MA en células endoteliales, lo que promueve el reclutamiento de más monocitos, creando un círculo vicioso que amplifica y perpetúa la reacción inflamatoria (Koh 2005). Entre las citocinas descritas que son secretadas por los macrófagos destacan especialmente la IL-1, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) ya que, no sólo median la respuesta inflamatoria local, sino también tiene efectos distantes, como la activación de genes hepáticos que codifican para proteínas de fase aguda como el fibrinógeno, el amiloide A sérico y la proteína C reactiva (PCR) (Tedgui & Mallat 2006). Aparte de su papel en la respuesta inflamatoria, estas citocinas actúan regulando la captación de lipoproteínas modificadas a través de los SR del macrófago y la salida o exportación de colesterol desde estas células.

La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos, tiene como consecuencia un cúmulo de éstos en el citoplasma del macrófago, al cual se le denomina célula espumosa. Las células espumosas

constituyen las etapas tempranas de formación del ateroma. Una vez establecido, el ateroma esta comúnmente compuesto de cantidades variables de células musculares lisas, macrófagos, linfocitos T, ésteres de colesterol y fosfolípidos (Libby 2011). Además del 5 al 20% de su estructura está conformada por calcio. La placa continúa su crecimiento paulatino hasta incluso, llegar a obliterar el lumen de la arteria, reduciendo el flujo sanguíneo y causando diferentes tipos de manifestaciones clínicas como el infarto (Davies 1996).

Es así que el fenómeno inflamatorio tiene papel central en el desarrollo de la EAC (Fan J et al. 2003, Corti R et al. 2003, Lopes N et al. 2004, García-Moll X et al. 1999). (Figura 5).

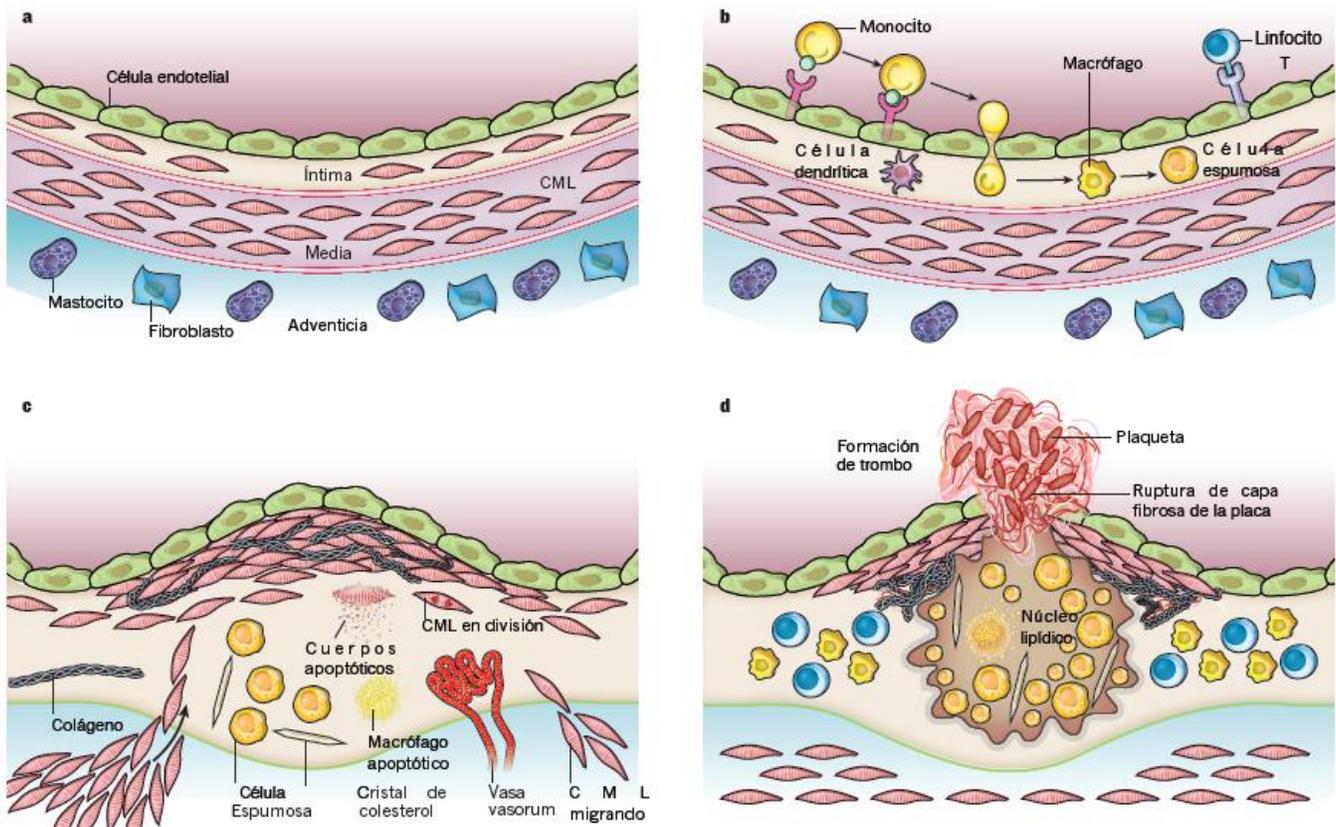


Figura 5. Etapas del desarrollo de la enfermedad arterial coronaria. Modificada de Libby, 2011.

2.2.- Hallazgos recientes en la comprensión del fenómeno inflamatorio de la EAC.

En la actualidad, se han descrito, diversas citocinas que se encuentran relacionadas en la génesis y desarrollo de la EAC, así como su participación e implicación en el proceso inflamatorio asociado a la misma como la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), entre otras. Sin embargo, de manera reciente otras citocinas estudiadas, también se ha evidenciado que poseen una participación preponderante en la enfermedad.

Datos previos en variantes genéticas de ciertas interleucinas tales como la interleucina-17(IL-17) y la interleucina-27(IL-27) por nuestro grupo han mostrado una asociación en la enfermedad (Vargas-Alarcón G et al. 2015, Vargas-Alarcón G et al. 2014, Posadas-Sánchez R et al- 2017). Sin embargo, el mecanismo de regulación de estos genes en la EAC no ha sido estudiado.

3.- LA INTERLEUCINA-17 (IL-17) Y SU PARTICIPACIÓN EN LA EAC.

La IL-17, propiamente denominada como interleucina-17A (IL-17A), es el miembro más ampliamente estudiado de la gran familia de citocinas de la IL-17. La interleucina IL-17A, se descubrió en 1993, como el miembro prototipo de, en aquel momento, una nueva subclase de citocinas (Yao Z et al. 1995)

La IL-17 humana es una glicoproteína homodimérica conformada de 155 aminoácidos cuyo peso molecular es de aproximadamente 35 kDa. Mediante ensayos de clonación y análisis de su homóloga (la inicialmente descrita en el virus del herpes) se logró describir 5 citocinas homólogas adicionales denominadas IL-17B a IL-17F las cuales, todas ellas forman homodímeros para poder ejercer sus funciones biológicas (Korn 2009).

3.1.- Generalidades y características de la IL-17A.

De la familia de citocinas de la IL-17, se conocen seis miembros los cuales son, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) y IL-17F. A su vez, se han caracterizado cinco receptores que son IL-17RA, IL-17RB/IL-25R, IL-17RC, IL-17RD/SEF y IL-17RE (Robert 2017).

Aunque la IL-17A, es la citocina más estudiada, sin embargo, el interés por los otros miembros integrantes de dicha familia de citocinas va en aumento, dada la evidencia de su participación en el fenómeno inflamatorio en diversas entidades clínicas.

Los genes que codifican para esta familia de citocinas, en el humano, se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 (6p12). La IL-17A y la IL-17F pueden ser secretadas como homodímeros además del heterodímero IL17A/F que es más potente que la IL-17F, pero menos potente que la IL-17A en la inducción de la expresión de quimiocinas. Las funciones de los otros miembros de esta familia de citocinas no han sido aún elucidadas por completo, sin embargo, se ha observado que la IL-17E (IL-25) promueve la diferenciación de células Th. (Korn 2009).

Todas las citocinas de la familia de la IL-17, comparten una estructura proteica común, que se caracteriza por poseer cuatro residuos de cisteína altamente conservados entre ellas (Gaffen 2009). IL-17A y IL-17F pueden formar homodímeros, así como IL-17A/IL-17F heterodímeros (Wright 2007). IL-17F tiene el grado más alto de homología con IL-17A y ejerce un efecto similar en un nivel más bajo. IL-17A y IL-17F han sido reportadas en las placas que lesionan el endotelio durante la aterogénesis (de Boer 2009; Erbel 2010).

3.2.- Origen biológico de la IL-17A y algunas de sus funciones.

La IL-17A es producida principalmente por los linfocitos T ayudadores 17 (Th-17), aunque también es secretada por las células asesinas naturales T (NKT), las células gamma delta 17 ($\gamma\delta$ -17) y los linfocitos T citotóxicos CD8+ (Tc17); en la EAC, principalmente se ha observado que la IL-17A amplifica el proceso inflamatorio

(Takatori 2009) inducido por otras citocinas mediante interacción sinérgica (Robert & Miossec 2017).

Dentro de las funciones biológicas de la IL-17 se ha observado que tiene como principales blancos a las células mesenquimales y las células mieloides; estimula la transcripción de genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias, citocinas hematopoyéticas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos y moléculas empleadas en la remodelación de tejidos, dependiendo del tipo celular y la enfermedad. Actúa también sobre la expansión clonal de los neutrófilos (a través del factor estimulante de colonias de granulocitos [G-CSF]) y la quimiotaxis (regulada por quimiocinas CXC) siendo consideradas estas funciones características de esta interleucina, aunque poco se sabe sobre su acción en los linfocitos T (Xu & Cao, 2010).

La evidencia experimental sobre la IL-17 apunta hacia la inducción de la inflamación al estimular la expresión de varias citocinas proinflamatorias tales como la IL-6, TNF- α , G-CSF, GM-CSF, principalmente. La IL-6 fue el primer gen blanco identificado de la IL-17 (Yao, 1995). La IL-6 es esencial para la diferenciación *de novo* de las células Th17 lo cual sugiere un circuito de retroalimentación positiva inducida por la IL-17. Además de IL-6 e IL-17 también induce la producción de otras citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- α e IL-1 β , y, al ejercer su acción sobre la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) puede producir el incremento en la producción de la PGE2 y de NO por varios tipos celulares. La estimulación con IL-17 también induce la producción o liberación de, al menos, dos diferentes CSFs, G-CSF y GM-CSF. La expresión ectópica de la IL-17 induce una expansión fuerte de neutrófilos o neutrofilia a través del G-CSF, y la neutralización de la IL-17 se asocia con granulopenia y susceptibilidad a infecciones (Yao, 1995; Jovanovic et al. 1998).

La IL-17 activa la vía de señalización del factor nuclear κ B (NF- κ B), en conjunto con Act1 y la ligasa E3 de ubiquitina. Así, induce la expresión de genes pro-inflamatorios de manera similar a como lo hacen los receptores de tipo Toll (TLR). El factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6), que es un adaptador clave en la vía de señalización de los TLR, es indispensable para llevar a cabo la

activación del NF- κ B por la IL-17. Sin embargo, el adaptador intermedio entre el IL-17RA y TRAF6 aún se desconoce. La vía de señalización más importante de la IL-17A incluye los factores ACT1/ TRAF6/NF- κ B, (Yao 1995, Xu 2010, Gaffen 2009).

3.3.- Participación paradójica de la IL-17A en la EAC.

Hasta el momento, el papel específico y la participación de la IL-17A en la EAC no es claro del todo y la evidencia obtenida hace que se considere controversial, dado que, según el contexto dicha citocina puede propiciar dos escenarios diferentes, teniendo un efecto proaterogénico o un efecto ateroprotector (Taleb S et al. 2015; Gong 2015).

La IL-17A puede inducir la liberación de quimiocinas como la quimiocina CXCL1, CXCL2, CXCL8 y CXCL10, así como otras citocinas que favorecen el reclutamiento de neutrófilos y monocitos al lugar de la lesión aterosclerótica. Además, la IL17-A también puede estimular a los macrófagos para producir citocinas inflamatorias, como IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), e IL-1 β favoreciendo así el escenario del efecto proaterogénico dado que se potencia la inestabilidad de la placa al promover un efecto proinflamatorio y, finalmente, el infarto al miocardio (Gong 2015).

Sin embargo, la IL-17A, también puede generar un escenario donde posea un efecto ateroprotector; IL-17A puede favorecer la estabilidad de la placa de ateroma al inducir la proliferación de células musculares lisas (SMC) y la síntesis de colágeno en las placas ateroscleróticas. El aumento de las SMC y el colágeno en la capa fibrosa es vital para la estabilidad de la placa. Además, la IL-17A regula a la baja la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 en las células endoteliales, obstaculizando así la adhesión de los monocitos en el lugar de la lesión aterosclerosa e inhibe la infiltración de las células T en la placa. Este efecto ateroprotector de la IL-17A se asocia con cambios en los niveles de factores inflamatorios secretados por diversas subpoblaciones de células inmunitarias, por ejemplo, bajos niveles de IFN- γ (citocina marcadora de subpoblaciones Th1) y con

aumento de los niveles de IL-5 (citocina característica de subpoblaciones Th2), IL-10 y TGF- β (citocinas características de subpoblaciones de Treg). (Taleb S et al 2015; Gong et al 2015) (Figura 6).

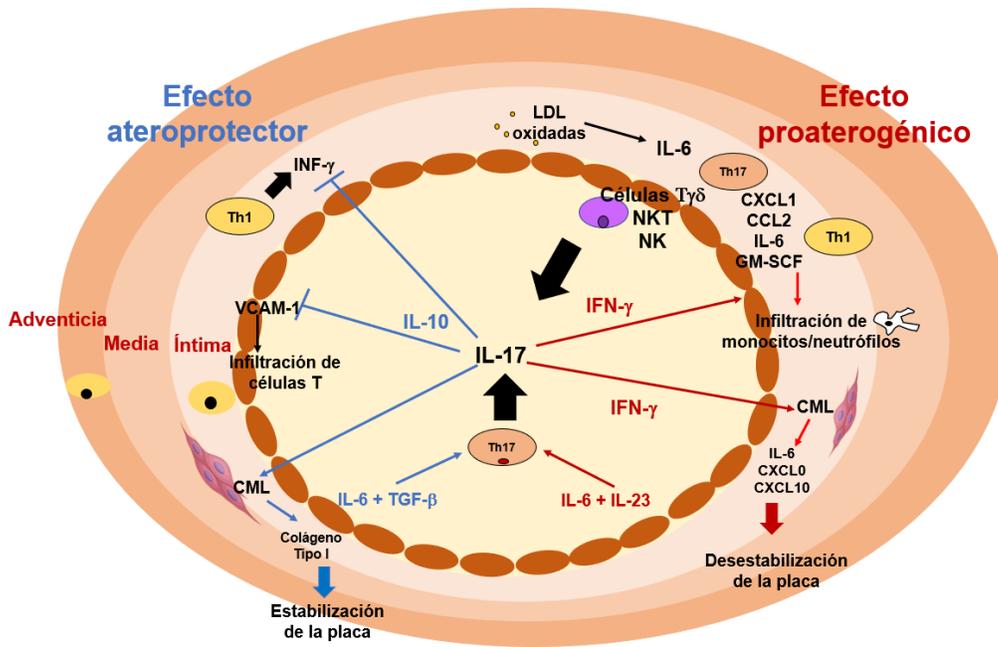


Figura 6. Papel paradójico de la IL-17 en el desarrollo de la EAC. (Modificado de Taleb et al. 2015).

4.- LA INTERLEUCINA-27 (IL-27) Y SU PARTICIPACIÓN EN LA EAC.

La IL-27, es una citocina tipo I miembro de la familia de la IL-12. La familia IL-12 está evolutivamente vinculada a la superfamilia de citocinas de la IL-6, que consisten en un grupo de citocinas heterodiméricas α/β compuestas de una de tres posibles cadenas α (p19, p28 o p35) y una de dos cadenas β (p40 o Epstein-Barr virus induced gene 3 [EBI3]). (Pflanz 2004, Kastelein 2007).

La coexpresión de las cadenas α y β es un requisito previo para la secreción de la citocina bioactiva (Wolf, 1991).

Las citocinas de la familia IL-12 pueden inducir directamente el desarrollo de subpoblaciones de células T y alterar el destino y función de muchas poblaciones celulares que influyen en el desarrollo de la EAC; así, actúa con un papel inmunomodulador en la enfermedad (Viganli 2012).

Las citocinas miembros de la familia IL-12 exhiben propiedades inmunorreguladoras debido a sus efectos sobre la diferenciación y función de células T. Dos ejemplos de citocinas proinflamatorias son IL-12 e IL-23; la primera puede inducir a las células Th1, mientras que esta última tiene un papel importante en la inducción de células Th17. Además, IL-27 exhibe un doble fenotipo funcional capaz de aumentar las respuestas pro y antiinflamatorias (Yoshida 2015).

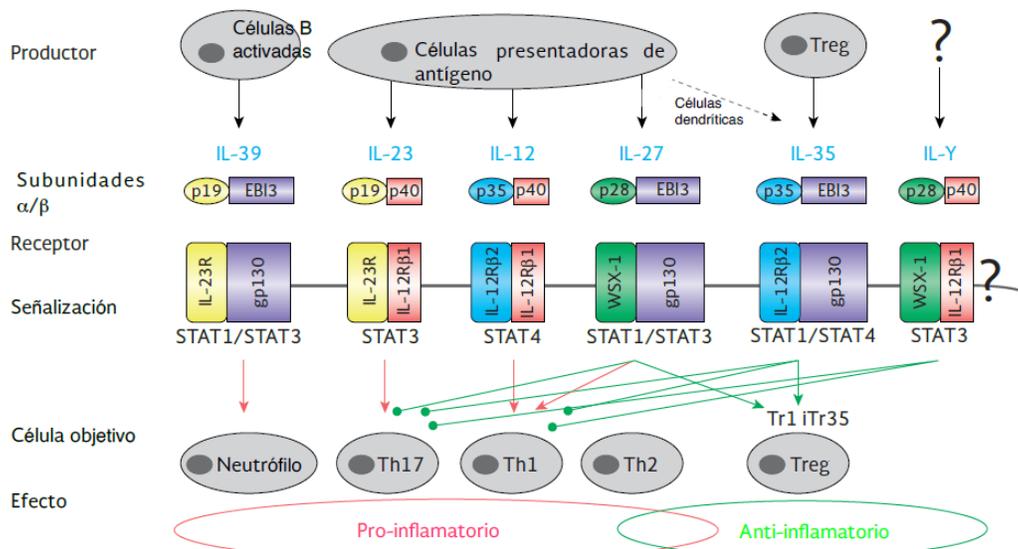


Figura 7. Citocinas integrantes de la familia de la IL-12. La IL-27, es integrante de esta familia. Modificada de Posadas-Sánchez & Vargas-Alarcón, 2018.

4.1.- Generalidades y características de IL-27

La IL-27 humana, es una proteína conformada por 243 aminoácidos, y se encuentra codificada en el brazo corto del cromosoma 16 (16p12.1)

La subunidad β -EBI3 fue identificada como un gen que se expresa preferentemente en una línea celular de células B por el virus de Epstein-Barr y que está relacionada con la subunidad IL-12p40, una subunidad de citocinas que se asemeja a un receptor soluble y es un componente de la IL-12 e IL-23 (Devergne 1996). La subunidad α -p28 fue identificada como un componente de IL-27 basándose en una búsqueda *in silico* de moléculas huérfanas similares a citocinas que podrían asociarse con β -EBI3 (Pflanz 2004). Así, la IL-27 es una de cuatro citocinas heterodiméricas relacionadas conformadas de una subunidad compuesta de cuatro α -hélices (IL-6, IL-12p35, IL-23p19 e IL-27p28), que se unen a una proteína tipo receptor soluble (IL-6R α , IL-12p40 y β -EBI3). Dentro de este grupo, las diferentes subunidades pueden formar varios homodímeros y heterodímeros, y β -EBI3 también se asocia con IL-12p35 para formar IL-35, una citocina vinculada a la modulación de la actividad de células T reguladoras (Devergne 1996, Collison 2007).

La subunidad α -p28 también se une al factor similar a citocinas 1 (CLF1) para formar un heterodímero que promueve la activación de células NKT (Crabé 2009).

De acuerdo con los modelos actuales, α -p28 y β -EBI3 se secretan como un heterodímero, sin embargo, la observación de que α -p28 puede ser secretado independientemente de β -EBI3 ha planteado interrogantes sobre la función biológica de esta molécula. En efecto, la subunidad α -p28 recombinante puede bloquear la actividad de las citocinas (IL-6, IL-11 e IL-27) que utilizan el dominio tipo I de gp130 para señalizar (Pflanz 2004, Stumhofer 2010, Shimozato 2009), y la sobreexpresión de la subunidad α -p28 antagoniza la respuesta de células B dependientes de gp130 *in vivo* y puede bloquear el daño hepático, abroga la respuesta antitumoral, suprime el rechazo al injerto e inhibe la autoinmunidad en un modelo experimental de uveítis (Wang 2012, Stumhofer 2010, Shimozato 2009,

Dibra 2012). Del mismo modo, mutantes de α -p28 que no pueden interactuar con gp130 pueden actuar como antagonistas de los receptores y limitar el daño hepático mediado por el sistema inmunitario (Rousseau 2010)

4.2.- Funciones biológicas de la IL-27

La IL-27 es un inmunoregulador que desempeña un papel importante en la respuesta inflamatoria (Yoshida 2009) ya que promueve la diferenciación temprana de subpoblaciones celulares Th1 (Takeda 2003), suprime la diferenciación de subpoblaciones Th2 y Th17 (Yoshimoto 2007; Stumhofer 2006), e induce la producción de citocinas anti-inflamatorias tales como IL-10 por parte de las células T activadas.

Entre las fuentes celulares donde se produce la IL-27 que se reconocen habitualmente se encuentran aquellas poblaciones de línea mieloide, donde se incluyen macrófagos, monocitos inflamatorios, células de la microglia y células dendríticas (CD); sin embargo, las células plasmáticas, endoteliales y epiteliales, también son capaces de expresar IL-27 (Hall et. Al 2012).

En los macrófagos y las células dendríticas, la expresión de IL-27 se da a través de la señalización frente al estímulo, a través de TLR o los receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) CD40 o 4-1BBL conduce a la activación de NF- κ B, que sinergiza con la vía de transducción de señales y activadora de la transcripción 1 (STAT1) que se activa mediante interferones de tipo I y II (IFN) para promover la transcripción de IL-27. Estos eventos son antagonizados por la capacidad del adenosín trifosfato (ATP) para unirse a receptores purinérgicos (P2R) y mediante la unión del producto de escisión del complemento C5a al C5aR.

Así, la IL-27 se ha relacionado con múltiples efectos biológicos en macrófagos y CD, incluida la inhibición de la replicación viral y la regulación a la baja de los receptores para IL-1 y TNF. La capacidad de IL-27 para regular la expresión de CD39, que puede hidrolizar el ATP, es asociado con el abatimiento del ATP y la activación

reducida del inflammasoma; y a su vez, la IL-27 también puede reducir la capacidad de las CD's para presentar antígeno. (Yoshida & Hunter, 2015).

4.3.- Participación de la IL-27 en la EAC.

IL-27 es expresada en las placas aterosclerosas (Hirase 2013), y su papel en la EAC ha sido estudiado en cultivos celulares, modelos animales y pacientes con la enfermedad, aunque los hallazgos son inconsistentes.

Modelos de ratones *knockout* deficientes en IL-27 (*Ldlr*^{-/-} *Ebi3*^{-/-}) y del receptor de IL-27 (*Ldlr*^{-/-} *WSX-1*^{-/-}) *Ldlr*^{-/-}, mostraron una mayor susceptibilidad a desarrollar aterosclerosis, y la administración de IL-27 suprimió la activación de macrófagos cel desarrollo de aterosclerosis (Hirase 2013). Sin embargo, los pacientes coronarios mostraron niveles más altos de IL-27 en comparación con los controles, y los niveles de IL-27 mostraron una correlación significativa con la gravedad de la estenosis (Jin 2012).

Lo anterior se confirma con estudios que demuestran que la IL-27 se encuentra significativamente elevada en el plasma de pacientes con aterosclerosis carotídea en comparación con sujetos sanos, lo que es corroborado al analizar los niveles de expresión de la IL-27 y su receptor (IL-27R), los cuales se muestran incrementados en los pacientes; además de que *in vitro*, la IL-27 incrementa la activación del inflammasoma NLRP3 en monocitos, con mejorada liberación de IL-1 β (Gregersen 2017).

Otros estudios han demostrado que la IL-27 se puede asociar con la protección frente a EAC, especialmente en su efecto sobre el metabolismo lipídico (Kolstova 2012), pero el mecanismo por el cual ejerce su función ateroprotectora sigue sin ser del todo claro. Sin embargo, en este paso de esclarecer dicho mecanismo, algunos estudios han proporcionado evidencia experimental de que la IL-27 mejora el flujo de salida de colesterol mediado por la proteína transportadora dependiente de ATP casete A-1 (ABCA1) en la línea celular THP-1 (una línea celular derivada de

monocitos humanos proveniente de un paciente con leucemia monocítica aguda) mediante el sistema de transducción de la cinasa Janus 2 / activador de la transcripción 3 (JAK2 / STAT3), resultando en la prevención de la acumulación de colesterol celular, y por tanto, la formación de células espumosas (Fu 2014).

Estudios in vitro, han evidenciado el papel ateroprotector de la IL-27. En nuestro grupo de investigación se ha obtenido evidencia de que el polimorfismo del gen IL-27p28 se asocia con EAC prematura (EACp), (Posadas-Sánchez 2017).

5.- EPIGENÉTICA: GENERALIDADES Y ASPECTOS FUNDAMENTALES.

El término “Epigenética” (etimológicamente, por encima de los genes) fue acuñado por Weddington en 1939, con el fin de describir aquéllos mecanismo por los cuales, los organismos multicelulares desarrollan tejidos múltiples y bien diferenciados a partir de un único genoma. Es importante señalar que, cuando Weddington formula dicho término, Watson y Crick todavía no habían propuesto la estructura de la doble hélice para la molécula de ADN, publicada más tarde en 1953, en la revista Nature. Sin embargo, lo que lo llevó a Weddington a utilizar este término era la influencia entre el medio ambiente y el genotipo llevando a la constitución de un "epigenotipo" (Weddington 1939).

En la actualidad, es aceptado que lo anterior, es posible gracias a marcas moleculares detectables que generan modificaciones que afectan la actividad transcripcional de los genes y que, una vez establecidas, son relativamente estables a través de las siguientes generaciones (Morgan 2008; Wang 2008). Es así que el término epigenética define los cambios heredables en la estructura y organización del ADN que no involucran cambios en la secuencia y que están implicados en la regulación de la expresión génica y que pueden ser heredables (Morgan 2008; Bártova 2008).

De acuerdo con lo anterior, la epigenética emerge como un área de la genética encargada del estudio de la regulación de la expresión génica a través de diversos mecanismos que no implican un cambio o alteración de la secuencia del ADN. Mediante estos mecanismos epigenéticos, las células tienen la capacidad de decidir qué genes deben ser expresados, en qué grado e intensidad y en qué momento.

Una característica distintiva a estos mecanismos de regulación de la expresión génica es que, son altamente dinámicos y pueden modificarse a lo largo de la vida celular, lo que le imprime su carácter de reversibilidad (Rodríguez 2004).

El conjunto de todos los elementos epigenéticos, también conocido como epigenoma, puede ser influenciado por factores ambientales, como la dieta (hábitos nutricionales), ejercicio, exposición a contaminantes, estrés, especialmente durante

el desarrollo embrionario y puede dar lugar a fenotipos, así como ser heredados de una célula a las células hijas. Como consecuencia, el epigenoma difiere entre poblaciones celulares del organismo, momentos del desarrollo o estado de salud (Dolinoy 2008).

Es por ello que la epigenética constituye un campo novedoso de estudio, dada su implicación en la regulación de importantes procesos biológicos así como su participación en diversas entidades clínicas patológicas, ello debido a la creciente evidencia que se va acumulando del nexo que existe de la influencia del medio ambiente sobre estos mecanismos de regulación de la expresión de los genes, y su participación importante en la génesis y desarrollo de diversas patologías (Allis & Jenuwein 2016).

5.1.- Principales mecanismos epigenéticos: un breve panorama.

Diversos eventos y procesos celulares son los que se sitúan en este grupo de mecanismos reguladores. Los principales son:

- a) Metilación del ADN.** La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo en las citosinas de las regiones ricas en CG, aunque recientes estudios apuntan a un papel relevante de la metilación de adeninas. Los grupos metilo actúan como señales de reconocimiento sobre el ADN, favoreciendo el reclutamiento de proteínas que participan en la regulación de la expresión génica. Dado que este trabajo se enfoca en la participación de este mecanismo en el desarrollo de la EAC, más adelante se profundizará sobre el mismo (Klose 2006).

- b) Modificación de las proteínas histonas.** El grupo de proteínas histonas participan en la compactación y organización del ADN en el interior del núcleo celular. Aminoácidos específicos de las histonas pueden ser susceptibles de modificación a través de la adición de grupos acetilo, metilo o fosfato. Las combinaciones de modificaciones de las histonas definen la conformación de

la cromatina (complejo formado por ADN y proteínas histonas) e influyen en la expresión génica (Marmorstein 2009).

c) Complejos remodeladores de la cromatina (CRC) dependientes de ATP.

Diversos complejos multiproteicos han emergido como importantes reguladores de la transcripción génica (Hargreaves 2011), al ser capaces de alterar la estructura de los nucleosomas utilizando la energía liberada en la hidrólisis del ATP, en respuesta a factores externos e internos (Lusser 2003), orquestando una extensa remodelación de la cromatina cuyos detalles, en la mayoría de los casos, son aún desconocidos. Un ejemplo de ello es el complejo SWI/SNF de levaduras, y su homólogo en mamíferos, que desestabiliza las interacciones ADN-Histonas modulando así la transcripción (Winston 1992; Laurent 1993; Khavari 1993). En síntesis, se trataría de complejos proteicos ATP-dependientes que expondrían secuencias de ADN ocultas por la estructura de la cromatina. Mediante estos mismos mecanismos, también se podrían ocultar regiones previamente expuestas (silenciando al gen), por lo que estos complejos proteicos dependientes de ATP tendrían la capacidad de regular la expresión de los genes tanto positivamente como negativamente (Hargreaves 2011).

d) Polycomb y Trithorax. El complejo multiproteico Polycomb (PcG) y Trithorax (trxG) constituyen un mecanismo epigenético que controlan la transcripción génica de manera antagónica mediante la modificación de la estructura de la cromatina de una conformación "cerrada" a otra "abierta" y viceversa (Mahmoudi 2001). Uno de los principales reguladores epigenéticos está conformado por el grupo de proteínas represoras polycomb (PcG) y del grupo activador Trithorax (trxG) que codifican para co-reguladores epigenéticos antagónicos, relacionadas con procesos patológicos como el cáncer, a través de la desregulación a nivel epigenético de genes supresores de tumores como BRCA1, p16 y p53, además de estar implicadas en el control del ciclo celular, la diferenciación y el desarrollo (Roberts 2004;

Dahiya 2001). Dadas las implicadas interacciones de este complejo de proteínas, se ha propuesto que su participación en la regulación epigenética de la expresión génica, puede ser el vínculo entre las grandes familias de reguladores epigenéticos, muy probablemente orquestando los principales procesos celulares a través de una fina red de interacciones (Dávalos 2011).

e) ARN's no codificantes. Los ARN pequeños (21-23 nucleótidos) pueden silenciar a los genes interfiriendo directamente con las regiones del ADN promotoras de la transcripción (Lau 2001), o bien a través de la unión con proteínas para formar complejos de silenciamiento transcripcional. Inicialmente estos ARN's cumplían la función de "mecanismo de defensa", para silenciar transgenes, transposones y parásitos genómico (Fabri 2008). Es así que, en este grupo se sitúan moléculas como los lncRNA's, miRNA's, siRNA's, principalmente.

6.- METILACIÓN DEL ADN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La metilación del ADN es el mecanismo epigenético más estudiado, el cual involucra la adición de un grupo metilo en los dinucleótidos CpG para convertir el nucleótido citosina a 5-metilcitosina (5mC) (Golbabapour 2011).

La regulación de la expresión génica por metilación del ADN es un proceso dinámico que comprende la metilación de *novo*, reconocimiento de 5mC, y demetilación activa-pasiva (Turunen 2009).

Esta modificación epigenética se efectúa a través de reacciones enzimáticas orquestadas por las ADN-metiltransferasas (DNMT) cuya función es adicionar un grupo metilo en las citosinas de regiones altamente enriquecidas de pares de citosina y guanina enlazados por grupos fosfato (Klose 2006). Este par de nucleótidos es conocido como dinucleótidos CpG, y dichas regiones se denominan como islas CpG o regiones CGI, las cuales se encuentran a lo largo de todo el genoma, pero de manera importante y principal en las regiones reguladoras de los

genes, como por ejemplo los promotores, o en elementos repetitivos característicos de los genes con imprinting (Illingworth 2009).

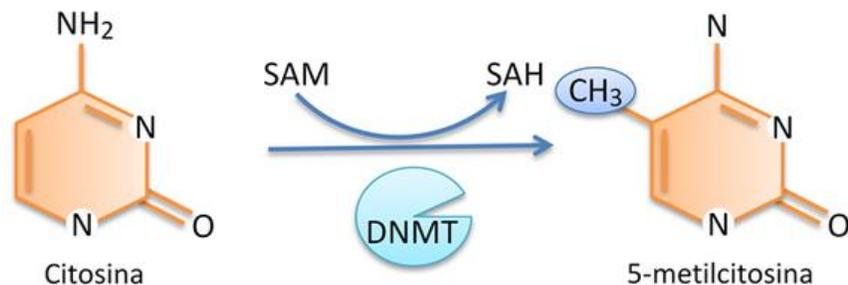


Figura 8. La metilación del ADN ocurre sobre el carbono 5 de la citosina. SAM: S-adenosil metionina (donador de grupos metilo). SAH: S-adenosil homocisteína. DNMT: ADN metil transferasa. Tomada de: <https://geneticamolecularunlar.wikispaces.com>

6.1.- Las ADN-metil transferasas (DNMT's) y la metilación del ADN.

En el caso de los mamíferos, la metilación del ADN se lleva a cabo gracias a la adición de un grupo metilo proveniente del metabolismo de los folatos, a través del aminoácido donador de grupos metilo de S-adenosilmetionina (SAM) bajo la acción de una DNMT. (Jurkowska 2011).

Las DNMT son una gran familia de proteínas con actividad enzimática que actúan en trans sobre sitios del ADN sujetos de metilación a través de señales que actúan en cis.

La metilación del ADN se clasifica como metilación de *novo* o de mantenimiento, lo que según el tipo de metilación del que se trate, nos permite agrupar a las ADN-metiltransferasas en dos grupos.

Esta familia de enzimas es vital en el proceso de metilación del ADN, dado que modulan importantes procesos celulares como la transcripción de los genes, el mantenimiento de la metilación de genes improntados o la inactivación del cromosoma "X", en el caso de las hembras de mamíferos, para compensar la dosis génica con respecto a los machos. Están caracterizadas cinco principales DNMT, identificadas desde 1980 y que tienen un papel crucial en el proceso de mantener

la metilación (Sakai 2004; Jurkowska 2011): DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L.

DNMT1, DNMT2 and DNMT3 son las ADN-metil transferasas más ampliamente caracterizadas y se puede clasificar como de mantenimiento o de novo. DNMT1 es una ADN-metiltransferasa de mantenimiento y se encarga de la metilación tanto de genes improntados como los no-improntados (Chen 2006). DNMT2 parece tener un papel regulador en la metilación del DNA, pero si esta enzima se encarga de patrones de metilación de mantenimiento o de novo, es poco claro (Robert 2003; Mortusewicz 2005).

DNMT3a es una ADN-metiltransferasa de novo además de ser un factor clave en la metilación relacionada a impronta. Isoformas de esta DNMT se sugiere que tiene un papel importante en la metilación global del DNA en células germinales (Sakai 2004).

Tipo de DNMT	Funciones
DNMT1	Mantenimiento de los patrones de metilación. Esencial para la replicación cromosómica y la reparación. Indispensable en mantener la metilación <i>de novo</i> .
DNMT2	Involucrada en la metilación del ADN y ARN.
DNMT3a	Establece los patrones de metilación <i>de novo</i> , especialmente durante la gametogénesis. Mantiene los patrones de metilación.
DNMT3b	Establece metilación <i>de novo</i> .
DNMT3L	Esencial para establecer metilación <i>de novo</i> . Intensifica la actividad de metilación <i>de novo</i> de la DNMT3a y la DNMT3b. Establece patrones de metilación <i>de novo</i> , especialmente durante la gametogénesis.

Tabla 1.- Tipos de ADNmetiltransferas y sus funciones. Adaptada de Golbabapour, 2011

DNMT3L se posiciona como un candidato que regula la metilación de genes improntados a través de la regulación de DNMT3a y DNMT3b (Suetake 2004).

6.2.- Definición y características de las “islas CpG” (CGI’s).

En todo el genoma, se encuentran regiones donde existe una atípica y alta frecuencia de pares de citosina y guanina enlazados por grupos fosfatos; estos sitios se conocen como sitios islas “CpG” o CGI.

En los mamíferos, la mayoría de los pares de dinucleótidos CG son modificados químicamente debido a la unión covalente de un grupo metilo a la posición C5 del anillo de citosina resultando en 5-metil citosina. Estos dinucleótidos modificados se distribuyen a lo largo de la mayoría del genoma, incluidos los cuerpos génicos, repetidos endógenos y elementos transponibles con el fin de reprimir la transcripción génica. La 5- metilcitosina deamina espontáneamente a timina lo que se ve reflejado en el bajo predominio de sitios CpG (21% de lo que se prevé en todo el genoma humano). Sin embargo, en el genoma es posible encontrar secuencias de ADN no metilado llamadas islas “CpG” (o “CGI’s”) que tienen un contenido elevado de guanina más citosina (G + C) y poca supresión de CpG. Estas secuencias peculiares tienen aproximadamente 1 kb de longitud y se superponen a las regiones promotoras del 60-70% de todos los genes humanos. Se ha demostrado que los CGI se co-localizan con los promotores de todos los genes expresados constitutivamente y alrededor del 40% de los casos, muestran un perfil de expresión tejido-específico restringido (Illingworth 2009).

Al parecer, una de las funciones de los sitios CGI, es definir los sitios de inicio de la transcripción (TSS) que puede iniciarse desde múltiples posiciones. La clase más restringida de tejidos de los promotores no CGI generalmente se asocia con un sitio de inicio único definido. La asociación de promotores busca la distribución desigual de los CGI en el genoma, mostrando una localización preferencial en los loci ricos en genes. De acuerdo con la asociación del promotor, los CGI generalmente se caracterizan por un estado de cromatina transcripcionalmente permisivo o relegado.

Estos hallazgos sugieren que las regiones CGI pueden proporcionar una herramienta que permita distinguir las regiones promotoras de genes de la gran proporción de la cromatina intergénica transcripcionalmente irrelevante. Esta teoría se sustenta también gracias a los estudios que exploran la distribución de los sitios de unión del factor de transcripción (TF) en un pequeño panel de genes humanos.

Mientras que los sitios de unión se enriquecieron ligeramente en secuencias proximales al promotor, también fueron muy abundantes en todo el genoma (aproximadamente 16 sitios por 100 pb). Este estudio concluye así que la presencia de sitios de unión de manera aislada es insuficiente para identificar los promotores de genes, lo que refuerza la idea de que las regiones CGI cumplen la función de una especie de “luces de aterrizaje” para los TF’s en la oscuridad del núcleo (Metivier 2008).

Es así que podemos definir una isla CpG o región CGI, como una región de tamaño igual o superior a 500 pb y con un porcentaje de GC mayor de 50 y con un promedio de CpG observado/esperado mayor de 0,6.

Lo anterior, permite comprender el papel de la metilación de los sitios CpG, como una marca que permite regular la expresión génica, mediante la represión de la transcripción cuando estos sitios se encuentran metilados.

La descripción anterior ha permitido, realizar una clasificación de los genes en base al estado de metilación del promotor. Así, islas CpG constitutivamente no metiladas, están asociadas a genes constitutivos o “housekeeping”; el 95% de los genes tienen alguna isla CpG asociada. Los genes “tejido-específico”, son aquellos genes cuyas islas CpG se encuentran diferencialmente metiladas; alrededor del 50% de los genes tejido-específico tienen alguna isla CpG asociada. Finalmente, tenemos aquellos genes cuyas islas CpG se encuentran parcialmente, siendo característico de aquellos genes con “imprinting” (Illingworth 2009).

6.3.- Implicaciones de la metilación del ADN

Aunque en este trabajo se analizó la metilación del ADN en los sitios CpG en una entidad clínica patológica, sus repercusiones e importancia biológica, no necesariamente se encuentran asociadas al proceso salud-enfermedad.

Como se ha expuesto previamente, la metilación del ADN está implicada en el silenciamiento o represión transcripcional de los genes como proceso que reviste un papel fundamental a nivel biológico de manera habitual en los procesos biológicos, por ejemplo, el desarrollo embrionario. Los genes que están involucrados en el desarrollo fetal, deben ser silenciados en etapas definidas del crecimiento, a través de la metilación del promotor, dado que las moléculas que promueven la proliferación y división celular de estructuras anatómicas primitivas, vitales en un punto específico del desarrollo embrionario no son útiles ya (Weaver 2009).

Otro proceso biológico importante es la impronta genómica o “imprinting”, relacionada directamente al proceso previamente descrito del desarrollo embrionario. Si bien los patrones de metilación a nivel genómico son estables y heredables, existen al menos dos períodos del desarrollo embrionario en los que el patrón de metilación global es borrado y re-establecido: durante la generación de las células germinales, y en el período de pre-implantación embrionario. De manera coincidente, la impronta genómica se establece en estos dos períodos de reprogramación global del patrón de metilación del ADN (Reik et al., 2001; Weaver et al., 2009). El genoma de las células germinales masculinas y femeninas maduras está altamente metilado, aunque sufre modificaciones importantes poco después de la fecundación. El genoma paterno se demetila de manera activa y completa antes del comienzo de la replicación del ADN. A pesar de estos cambios globales, algunos genes improntados, así como secuencias repetitivas, mantienen su estado de metilación lo que resulta esencial para el desarrollo embrionario posterior. El genoma materno en tanto sufre una demetilación más lenta por un mecanismo pasivo que depende la replicación del ADN. Durante el desarrollo posterior los

patrones de metilación son nuevamente establecidos tanto en tejidos embrionarios como extraembrionarios (Li 1993).

El segundo período de reprogramación del patrón de metilación se establece durante la generación de las células germinales. En este caso, el patrón de demetilación global incluye a los genes improntados y se completa entre los días embrionarios E13-E14 en el ratón, momento en el cual las células germinales primordiales ingresan a la gónada. Una vez que esto ocurre, las células germinales primordiales masculinas y femeninas entran en arresto mitótico y meiótico, respectivamente. La remetilación ocurre algunos días más tarde y se completa de manera diferencial en ambos sexos. La línea germinal masculina alcanza su estado "metilado" durante el estadio de proespermatogonia (E15-E16), mientras que la línea germinal femenina lo completa luego del nacimiento, durante el crecimiento del ovocito. De esta manera quedan establecidos nuevamente los patrones de expresión de los genes improntados, completando el ciclo (Li 2002).

Otro proceso biológico habitual en el que se encuentra implicada la metilación de ADN es la inactivación del cromosoma "X", descubierto por Mary Lyon en 1961. El cromosoma X tiene unos 1000 genes que no están presentes en el cromosoma "Y". Las hembras tienen el doble de copias de estos genes ligados al "X" y expresarían el doble de los transcritos de estos genes si no existiera un mecanismo para corregir este desequilibrio. Sin embargo, no tener un cromosoma "Y" no es un problema para las hembras ya que los pocos genes que hay en este cromosoma sólo son necesarios para el desarrollo de los machos (Disteche 2015).

Este desajuste se corrige mediante un proceso llamado compensación de dosis génica, que hace que, a pesar de esta diferencia, las células femeninas y masculinas tengan cantidades equivalentes de las proteínas codificadas por genes del cromosoma "X" (Galupa 2015). La compensación de dosis supera diferencias de sexo en la relación esperada de la dosis de genes autosómicos con la dosis de genes del cromosoma "X". Las relaciones de dosis son importantes ya que los productos de los genes ligados a "X" deben interactuar con los productos de los genes autosómicos en las diferentes vías metabólicas y del desarrollo, y las

cantidades de producto para genes sensibles a dosis fundamentales están bajo regulación estrecha (Ahn 2008).

En el caso de los mamíferos, la compensación de dosis puede conseguirse mediante la inactivación del cromosoma "X", a través del mecanismo de metilación del ADN (Chaligné 2014).

Sin embargo, alteraciones en este mecanismo epigenético de metilación del ADN se han sido observadas en algunas enfermedades humanas, entre ellas el cáncer, obesidad visceral, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa, depresión, trastornos ansiosos, adicciones y la entidad clínica que nos ocupa en este trabajo: la EAC (Oberlander 2008).

7.- METILACIÓN DEL DNA Y EAC.

La evidencia acumulada, ha permitido observar que no todos los casos de morbilidad cardiovascular se pueden explicar debido a la acción e influencia de los factores de riesgo habituales para EAC (hiperlipidemia, hipertensión, diabetes, herencia y estilo de vida). Es así que los condicionantes a desarrollar EAC se pueden agrupar en dos categorías: factores de riesgo genéticos y ambientales.

La limitación de este abordaje para identificar a las personas en riesgo de enfermedades complejas (incluyendo enfermedades cardiovasculares) han estimulado la búsqueda de otros "marcadores" que permitan explicar el fenómeno del desarrollo de estas entidades clínicas que los factores convencionales no logran explicar.

En esta línea, la epigenética ha arrojado luz al panorama que permite la comprensión de la patología de la EAC, dado que implica la transmisión de información que no involucra la modificación de la secuencia de nucleótidos, permite hacer el nexo de la interacción del ADN con el ambiente, además de que los experimentos con animales han proporcionado pruebas sólidas para componentes no genéticos (por ejemplo, estado nutricional de los padres) en el aumento del

riesgo de desarrollo de aterosclerosis en la progenie (Collas et al., 2007).; aunado a que, en los grandes estudios poblacionales, es más factible medirla en un entorno epidemiológico.

La metilación del ADN juega un papel crítico en la expresión de genes que están implicados en los diversos estadios de progresión de la EAC. La aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) es una enzima mitocondrial que resulta altamente importante para proteger el miocardio de la isquemia. Se ha observado que la hipermetilación del promotor de la ALDH2 inhibe la acción de la enzima después del infarto de miocardio en los tejidos de la zona limitante al infarto, lo que se ha visto que está relacionado con la isquemia del miocardio (Chen 2008).

Aspectos metabólicos relacionados a la metilación del ADN también están altamente implicados en la EAC. La homocisteína (Hcy), un aminoácido tiol, que actúa como un importante modulador que regula la metilación del ADN. La hiperhomocisteinemia (HHcy) es un factor de riesgo para el desarrollo de EAC (Toole 2004). Al ser el precursor de metionina, Hcy es susceptible de ser metabolizado a S-adenosilmetionina (SAM), que es el principal donador de grupos metilo para la metilación del ADN. En el proceso de transferencia del grupo metilo, SAM se convierte a S-adenosylhomocysteina (SAH) (Green 2010), haciendo que Hcy sea vínculo entre la metilación del ADN y EAC. Se ha demostrado que la hipermetilación global del ADN se asocia con EAC y es más acentuado por Hcy (Sharma 2014).

Estudios *in vitro*, han mostrado que en cultivos celulares la Hcy (Yang 2014) facilita significativamente la proliferación y la migración de células musculares lisas vasculares (VSMC) y células endoteliales (EC) a través de este mecanismo de metilación del ADN, así como promover la hipermetilación de los promotores de los genes de la dimetilarginina dimetil amino hidrolasa 2 (DDAH2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y *p66shc* [un adaptador proteico implicado en la transducción de señales por aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno](Kim 2011).

Hcy regula al alza los niveles de expresión de PDGF a través de la desmetilación del promotor en EC's, que repercute en las interacciones EC y VSMCs y la posterior activación de las VSMCs (Zhang 2012). Con la desmetilación del promotor de PDGF, Hcy también reduce la metilación de los promotores de DNMT3a, DNMT3b y de las secuencias LINE-1 (Yideng 2007). La hipometilación de las secuencias LINE-1 se ha observado que se reduce significativamente a medida que aumentan los factores de riesgo de EAC, como la edad, el colesterol total (CT) elevado y diabetes (Wei 2014). La hipermetilación en el promotor DDAH2 inducida por Hcy se correlaciona positivamente con la disfunción de células progenitoras endoteliales (EPCs) en pacientes con EAC (Niu 2014).

El proceso inflamatorio, es otro aspecto que tiene un papel importante en todas las etapas de la EAC, en la cual se han identificado algunas moléculas inflamatorias como marcadores genéticos en la susceptibilidad de la enfermedad (Vargas-Alarcón 2014; Vargas-Alarcón 2015; Posadas-Sánchez 2017). La fase temprana de la enfermedad aterosclerótica implica la respuesta inflamatoria inducida por la deposición de lipoproteínas en la capa íntima arterial. La diferenciación de los macrófagos y la activación endotelial son necesarias en la fase temprana de la aterosclerosis.

La inflamación y el estado de metilación del ADN de genes de moléculas inflamatorias guardan una relación compleja y poco clara, sin embargo, se ha observado que algunas citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α que participan de manera importante en la inflamación, tienen una expresión regulada por el mecanismo de metilación del ADN (Shen 2016; Shen 2017).

Las investigaciones en el campo muestran que la hipermetilación global del ADN está relacionada con la inflamación y causa una mayor mortalidad en las enfermedades relacionadas con la aterosclerosis (Stenvinkel 2017). Por ejemplo, la hipometilación del promotor del gen del receptor tipo 2 Toll se asocia con respuestas proinflamatorias potenciadas (Shuto 2006). Consistente con lo anterior, la exposición a lipopolisacáridos (LPS) reduce el estado de metilación del ADN de la región promotora a TNF α , y por lo tanto aumenta la expresión de esta molécula en

macrófagos. La administración de 5-Aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dC) aumenta el efecto estimulante de LPS sobre la expresión de TNF (Wilson 2008). Esto es muy importante dado que TNF α es una de las primeras citocinas proinflamatorias implicadas en la inflamación en la aterosclerosis.

La señalización controlada por NF-Kb, cuenta con evidencia sólida de que se regula a través de la metilación de ADN, teniendo como blanco específico al promotor de la molécula de adhesión VCAM-1. La transcripción de los genes de citocinas proinflamatorias tales como NF- κ B y TNF- α se encuentra regulada positivamente por factores de transcripción (Hai 2016). Así, estas citocinas ejercen influencia en los cambios sobre el epigenoma, luego de que la evidencia sugiere que el efecto de la inflamación sobre la metilación del ADN es un factor de riesgo potencial para las ECV (Ding 2015).

En muestras de sangre, la metilación de secuencias repetitivas, llamadas elementos repetitivos nucleótidos largos intercalados-1 (LINE-1) y ALU se han asociado con EAC (Baccarelli 2010). Específicamente, la metilación elevada de ALU en leucocitos se asoció con la prevalencia de EAC y obesidad en la población China (Kim 2010).

En la regulación de la expresión de varias citocinas pro-inflamatorias, las DNMTs guardan un papel clave. La evidencia obtenida hasta el momento, han demostrado que la DNMT3a puede limitar la expresión de la citocina inflamatoria interleucina-13 (IL-13) en células T-helper2 (Th2) (Yu 2012); y la DNMT3b regula, a través de la metilación del ADN, el proceso inflamatorio y la polarización de los macrófagos (Wang 2016). Así, la inflamación modulada por la metilación del ADN puede acelerar la progresión de la placa aterosclerótica.

El sexo también es un factor fundamental en el desarrollo y progreso de la EAC; las hormonas características distintivas de cada uno, son elementos importantes que influyen directamente en el estado de metilación del ADN y su papel en EAC. Los estrógenos endógenos, son reguladores importantes del metabolismo lipídico e inhiben la inflamación, el crecimiento de células vasculares y la progresión de la placa en mujeres premenopáusicas (Barton 2013). Post y cols. proporcionaron evidencia de que la inactivación del gen del receptor alfa de estrógenos (ER- α) por

metilación en el tejido vascular puede desempeñar un papel crucial en la aterogénesis y el envejecimiento del sistema vascular (Post 1999). También se ha observado que la metilación del receptor beta de estrógenos (ER- β) exhibe niveles de hipermetilación en las áreas de lesión de placa que en las regiones sin placa (Kim 2007). Además, las investigaciones han demostrado que la insulina estimula la expresión de DNMT, promoviendo con ello la metilación de la segunda región del exón ER- α y disminuyendo su expresión, interfiriendo con ello en la regulación de la proliferación de VSMCs dependiente de estrógenos, lo que resulta en aterosclerosis (Min 2016).

Una de las principales limitantes al estudiar marcas epigenéticas en enfermedades multifactoriales como lo es la EAC, es la obtención del tejido específico. Sin embargo, recientes reportes han mostrado que el estudio de la metilación a partir de sangre periférica proporciona resultados valiosos en el campo clínico. Peng y cols., reportaron la asociación de metilación en el promotor en genes tales como el del transportador de membrana dependiente de ATP, miembro 1 de la subfamilia ABCG (ABCG1), 3-hidroxi-3metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR) y UDP-N-acetil- α -D-galactosamina: polipéptido N-galactosaminiltransferasa 2 (GALNT2), con características clínicas y metabólicas en una cohorte de 85 individuos con EAC y en 54 individuos como grupo de comparación o control (Peng P et al. 2014). Así mismo, García-Cardona y cols reportaron la asociación con la frecuencia de metilación en el promotor de los genes de adiponectina (ADIPOQ) y leptina (LEP); también, evaluaron la correlación entre obesidad y resistencia a la insulina en 106 adolescentes obesos con el fin de identificar dichas moléculas como marcadores epigenéticos para identificar alteraciones asociadas al desarrollo del síndrome metabólico (García-Cardona et al. 2014).

Lo evidencia anterior permite visualizar que la metilación del ADN posee un papel crucial en el desarrollo, mantenimiento y progreso de la EAC, cobrando una especial relevancia su estudio, dado que se perfila como un área prometedora en el estudio de esta patología que afecta a millones de personas alrededor del mundo. Mucha más evidencia existe que implica la metilación del ADN en la regulación de la

expresión de genes involucrados de manera importante en la EAC, que sería una tarea compleja describir y enumerar; sin embargo, en la tabla 2 se realiza una síntesis de información relacionada con la EAC.

La EAC es una enfermedad crónica multifactorial causada por la combinación de factores genéticos y ambientales. El mecanismo de metilación/desmetilación del ADN tiene un papel preponderante en las modificaciones inducidas por factores ambientales siendo un modulador importante en la génesis y desarrollo de la EAC (Hai & Zuo, 2016). Como hemos podido observar, el mecanismo de metilación puede regular diversos genes implicados en la patología, por lo que el abordaje epigenético del componente inflamatorio de la enfermedad es crucial para elucidar la complejidad de la patología, que permitirá el establecimiento de abordajes preventivos, de diagnóstico y terapéuticos para los pacientes con esta enfermedad.

Gen	Blanco	Referencia
<i>ERα/β</i>	Tejidos cardiovasculares	Baccarelli 2009
<i>MMP9/2/7</i>	Matriz extracelular	Choi 2005; Lutun 2004
<i>EC-SOD</i>	Patogénesis de la EAC	Laukkanen 1999
<i>INF-γ</i>	Respuesta inflamatoria	Canani 2015
<i>eNOS</i>	Endotelio vascular	Chan 2004
<i>iNOS</i>	Inflamación, macrófagos	Kim 2016
<i>c-Fos</i>	Fuerza de rozamiento	Hastings 2007
<i>PDGF-α</i>	Proliferación celular	Ning 2013
<i>MYOD1</i>	Tejidos cardiovasculares	Carless 2013
<i>IGF-II</i>	Proliferación y diferenciación celular	Hara 2014
<i>ICAM-I</i>	Respuesta inflamatoria	Joyce 2015
<i>TIMP-3</i>	Matriz extracelular	Liu 2011
<i>P53</i>	Apoptosis	Rasmussen 2014
<i>Fads2</i>	Patogénesis de la EAC	Hastings 2007
<i>E-cadherin</i>	Matriz extracelular	Park 2014
<i>15-LO</i>	Patogénesis de la EAC	Liu 2004
<i>CCR5</i>	Inflamación	Wierda 2014
<i>Foxp3</i>	Inflamación	Kennedy 2014
<i>IL-4</i>	Inflamación	Deaton 2014
<i>BCL-2</i>	Apoptosis	Ma 2013
<i>PAX6</i>	Proliferación y diferenciación celular	Wang 2011

Tabla 2. Genes relacionados a EAC, que son regulados a través de la metilación del ADN.

Adaptada de Hai & Zuo, 2016

8.- JUSTIFICACIÓN

La EAC es una enfermedad multifactorial, que se desarrolla silenciosamente a lo largo de los años y suele estar avanzada cuando aparecen los síntomas. La EAC representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial y en México. Por tal motivo, estudiamos la metilación del ADN en el promotor de los genes de IL-17 e IL-27, el cual es considerado el cambio epigenético más frecuente e importante hasta ahora estudiado con un importante papel en la regulación transcripcional de genes y dado el hecho de que, en nuestro grupo, existe evidencia de que polimorfismos en ambos genes se asocian con EAC.

Recientemente se ha observado que existen patrones de metilación anormales en muchos tipos de enfermedades, incluyendo la EAC, siendo un territorio poco explorado respecto a estas citocinas que son preponderantes en el proceso inflamatorio.

Existen pocos estudios de metilación de IL-17A realizados en otro tipo de enfermedades sin ser aún explorada en la EAC. En enfermedades como la degeneración macular se encontró que la región promotora de IL-17A estaba hipometilada resultando en la expresión elevada de la proteína y el ARNm en sangre periférica, así como en la retina y coroides afectada.

En el caso de IL-27, se realizó un estudio del perfil de metilación del DNA en sangre periférica, como indicativo de carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Se estudiaron 6 islas CpG de diferentes genes, en el que se (incluida IL-27). concluyó que el perfil de metilación puede ser un indicativo de la enfermedad con un alto grado de exactitud, a partir de sangre periférica (no invasivo).

9.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las ECV, como lo es la EAC, son la principal causa de muerte en el mundo y en México; el aumento de los factores de riesgo cardiovasculares tales como hipertensión, tabaquismo, diabetes, dislipidemia y obesidad en población adulta joven en nuestro país, contribuyen a la prevalencia de la EAC.

Sin embargo, los factores de riesgo habituales no permiten explicar por completo la fisiopatología de la EAC, lo que hace necesario abordar desde otro enfoque la enfermedad con el fin de elucidar los mecanismos que subyacen tras ella.

La EAC está asociada con múltiples factores de riesgo, tanto genéticos como modificables; es por ello que, a nivel molecular, resulta importante explorar los diversos mecanismos de manera que, el estudio de ellos, nos permitan tener un panorama que permita la mejor comprensión de la EAC.

Dado que en nuestro grupo de investigación existe evidencia de que polimorfismos en los genes de la IL-17 e IL-27, se encuentran asociados a la EAC, y dado que la epigenética permite enlazar las interacciones del medio ambiente (factores de riesgo), con el ADN, se hace necesaria investigar si el mecanismo de metilación del ADN se encuentra implicado en la participación de la IL-17 e IL-17 en la EAC.

10.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias en los patrones de metilación en el promotor de los genes de IL-17 e IL-27 en individuos con EAC comparados con individuos con EAC subclínica e individuos control?

11.- OBJETIVO GENERAL

Determinar si hay diferencias en el patrón de metilación en los genes de IL-17 e IL-27 en pacientes con EAC y compararlos con individuos con aterosclerosis subclínica e individuos control.

11.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- a) Analizar las secuencias promotoras de los genes de IL-17 e IL-27, e identificar islas CpG.
- b) Diseñar los iniciadores que flanquean las islas CpG identificadas en el promotor de ambos genes.
- c) Extraer ADN genómico de muestras de sangre periférica, de los individuos que conforman cada grupo de estudio.
- d) Tratar el ADN genómico con bisulfito de sodio.
- e) Realizar la técnica de MSP con el ADN tratado con bisulfito de sodio.
- f) Analizar la frecuencia de metilación para cada grupo de estudio.
- g) Describir las características de la población por cada grupo de estudio.

12.- HIPÓTESIS

Existe un estado diferencial de metilación en el promotor de los genes de IL-17 e IL-27 entre los individuos con EAC, los individuos con aterosclerosis subclínica y los individuos control.

13.- MATERIAL Y MÉTODOS

13.1.- Tipo de estudio.

El presente estudio es de tipo prospectivo, transversal y comparativo.

13.2.- Población de estudio.

Este trabajo se realizó en un grupo de individuos de la cohorte del proyecto de Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA), el cual fue diseñado para investigar las bases genéticas de la EAC y evaluar la relación entre los factores de riesgo tradicionales y emergentes con la enfermedad aterosclerosa clínica y subclínica en población adulta mexicana.

13.2.1.- Descripción de la muestra.

La población de estudio se estratificó en tres subgrupos: individuos con EAC, individuos con EAC subclínica e individuos control. Esto, de acuerdo con la evaluación de calcio arterial coronario (CAC) a través de tomografía axial computada con multidetector según el método de Agatston. Las imágenes fueron interpretadas por un radiólogo experto; así, el grupo control está definido por $CAC=0$, el grupo de individuos con aterosclerosis subclínica por $CAC \geq 0$ y el grupo de pacientes con EAC bien establecida.

13.3.- Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

El diagnóstico de EAC en el grupo de pacientes fue definido por historia personal de infarto al miocardio, angioplastia, cirugía de revascularización, o estenosis coronaria mayor al 50% determinada por angiografía, siendo seleccionados de la consulta externa y de los pacientes que acuden para cateterismo diagnóstico o terapéutico al Departamento de Hemodinámica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Solo se incluyeron individuos con EAC de presentación prematura (edad al diagnóstico menor de 55 años en hombres y menor de 65 años en mujeres), que no hayan presentado eventos cardiovasculares agudos en los tres meses previos al estudio.

De ambos grupos, se excluyeron pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedad hepática, renal u oncológica, distiroidismo no tratado y aquellos con tratamiento corticosteroide.

Los individuos del grupo control fueron seleccionados de la población que acude con fines de donación al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Para aumentar el reclutamiento de personas mayores, se solicitó a los participantes referir individuos mayores de 60 años al estudio y menores de 65 años en mujeres. Se incluyeron individuos asintomáticos, sin historia de ECA y/o ECA prematura en familiares de primer grado y se aplicaron criterios de exclusión similares a los señalados para pacientes.

Tanto en pacientes como en controles fue requisito que el individuo de estudio y sus dos generaciones previas sean mestizos y hayan nacido en México. Participaron únicamente los individuos que después de conocer las características del estudio aceptaron firmar el consentimiento informado.

13.4.- Método de muestreo.

El muestreo se realizó a conveniencia, incluyendo 100 individuos para cada grupo de estudio.

13.5.- Cálculo del tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó considerando los datos de metilación en ECA para el gen ABCG1, también asociado a la enfermedad, según una diferencia de medias. Esto, debido a que no existen reportes de metilación en los genes estudiados. (PLoS One 2014; 9(8): e102265).

Realizando las consideraciones siguientes:

Metilación en grupo control: 17%

Metilación en pacientes: 82%

Nivel de significancia alfa: 0.01

Poder: 90%

Tenemos que:

N: 18 sujetos por grupo.

Aun cuando con 18 individuos se obtiene un alto poder estadístico y un nivel de significancia adecuado, sin embargo, se extendió la muestra a 100 individuos por grupo, con el fin de darle robustez.

13.6.- Definición operativa de las variables.

VARIABLE INDEPENDIENTE					
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Indicador	Fuente
Metilación del ADN	La metilación del ADN es un proceso por el cual se añaden grupos metilo al ADN en el carbono 5 de una citosina; la actividad transcripcional de los genes se ve influenciada cuando se encuentra metilado el promotor de un gen.	Se considera como, metilado, cuando se visualizan en un gel de agarosa al 2% los amplicones correspondientes a la secuencia metilada en estudio.	Nominal, cualitativa, dicotómica		Experimento de MSP.

VARIABLE DEPENDIENTE					
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Indicador	Fuente
IL-17	Es una citocina pro-inflamatoria que actúa favoreciendo los procesos inflamatorios principalmente sobre las células mieloides y células mesenquimales. Induce la expresión de otras sustancias, entre ellas el factor estimulante de colonias de granulocitos, y la IL-6. El efecto final consiste en incrementar la producción de granulocitos por la médula ósea y atraer leucocitos hacia la zona de inflamación.	Es una citocina que participa en los procesos de autoinmunidad, inflamación e inmunidad. La IL-17 actúa en la inmunidad sobre mucosas y tiene un efecto amplificador de la respuesta de los linfocitos TH2.	Nominal, cuantitativa.		Perfiles bioquímicos e inmunológicos.
IL-27	La IL-27 es una citocina heterodimérica integrante de la familia de la IL-12, conformada por dos subunidades, virus de Epstein-Barr (EBV)-gen inductor 3 (EBI3) (también	La IL-27 es producida por las células presentadora de antígenos. IL-27 juega un papel importante en la regulación de la actividad de los linfocitos T y B. El efecto de la IL-27 se obtiene por su interacción con el complejo receptor específico de la superficie celular	Nominal, cuantitativa.		Perfiles bioquímicos e inmunológicos

	conocido como IL-27B) y la IL27-p28 (conocida como interleucina 30)	conocido como IL-27R			
Enfermedad Arterial Coronaria (EAC)	Enfermedad cardiovascular caracterizada por engrosamiento de las arterias coronarias en la capa intima por acumulación de células proinflamatorias y lípidos.	Electrocardiograma con datos característicos. Prueba de esfuerzo patológica. Cateterismo cardiaco con indicación de obstrucción coronaria. Escaneo nuclear con datos de obstrucción coronaria.	Cualitativa	1.1 Angina de pecho estable 1.2 Angina de pecho inestable 1.3 Infarto agudo al miocardio 1.4 Muerte súbita cardiaca	Sintomatología Estudios de gabinete

13.7- Métodos de recolección de datos.

A todos los participantes se les aplicó cuestionarios estandarizados para obtener información demográfica, nivel de escolaridad, ingreso económico, historia familiar y personal de enfermedad cardiovascular, hábitos dietarios, actividad física, consumo de alcohol y uso de medicamentos y suplementos. La dieta habitual durante el año previo fue evaluada utilizando un cuestionario de frecuencias de consumo, diseñado y validado por el Instituto Nacional de Salud Pública (Hernández-Avila M et al. 1998, Baecke JA et al. 1982). La actividad física se cuantificó mediante un cuestionario (Baecke JA et al. 1982), que proporciona información sobre frecuencia, intensidad y duración de la actividad lo que le confiere particular utilidad para analizar la correlación con variables de riesgo cardiovascular.

13.7.1.- Detección de calcio coronario.

Con excepción de los pacientes con historia de cirugía de revascularización e implante de malla intracoronaria, en el presente estudio el CAC se determinó en todos los pacientes e individuos control, utilizando un tomógrafo multidetector de 64 canales (Somatom Sensation, Siemens, Erlanger, Alemania). Las imágenes fueron interpretadas por un médico radiólogo con amplia experiencia en este tipo de estudios.

El calcio en arterias coronarias (CAC) es un marcador específico de aterosclerosis (Blankenhorn DH et al. 1961) y por tanto, de infarto al miocardio y cuando es cuantificado por tomografía computada tiene correlación de 0.90 o mayor con el área de placa coronaria histológica. Es de utilidad para diagnosticar aterosclerosis subclínica y permite identificar a los individuos con riesgo aumentado de eventos coronarios (Detrano R et al. 1996, Raggi P et al. 2000).

13.7.3.- Mediciones clínicas y antropométricas.

El peso se midió en una báscula calibrada y la talla utilizando un estadímetro de pared SECA 222 (Hamburgo, Alemania). El índice de masa corporal (IMC) fue calculado con la fórmula peso (kg) / talla (m²). La circunferencia de cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio, en el punto medio de la distancia entre la parte inferior de la última costilla y la cresta iliaca. La tensión arterial se midió en posición sedente, después de por lo menos cinco minutos de reposo, utilizando un esfigmomanómetro digital Welch Allyn, series 52000 (Skaneateles Falls, N.Y, E.U.A.). En ayuno de 12 horas y después de reposo durante 20 minutos en posición sedente, se colectaron 45 ml. de sangre venosa en tubos con EDTA y en tubos sin anticoagulante. Después de centrifugar en frío, el plasma y el suero serán divididos en 16 alícuotas. A las alícuotas de plasma se añadieron inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 KIU / ml, Benzamidina 1mm). Todas las alícuotas fueron

almacenadas a -70° C. Los lípidos, lipoproteínas y glucosa fueron cuantificados en muestras frescas.

13.7.4.- Análisis de Laboratorio.

Las determinaciones de colesterol total, triglicéridos y glucosa en plasma, se realizaron en un autoanalizador Hitachi 902 (Boheringer Mannheim), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania y Wako Chemicals, E.U.A). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania) (Baecke JA et al. 1982). El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad fue calculado con la fórmula de Friedewald modificada por De Long (DeLong DM et al. 1986). Las concentraciones de apoproteína B (apo B) y de apoproteína AI (apo A-I), se determinaron por inmunonefelometría (BN Pro Spec nephelometer, Dade Behring Marburg GmbH, Ge.). En el laboratorio de endocrinología, la precisión y exactitud de las determinaciones de lípidos, son evaluadas periódicamente por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, GA (CDC, por sus siglas en inglés). Las concentraciones de insulina en suero se determinaron por radioinmunoanálisis (Coat-A-count; Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo en nuestro laboratorio son inferiores al 10%. Todas las mediciones bioquímicas se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología del INCICH. El presente proyecto cumple los requisitos del comité institucional de ética e investigación de nuestro Instituto.

13.7.5.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el programa SPSS V.23. Para determinar las diferencias de las variables cuantitativas se realizará prueba de t de Student para datos independientes, para las variables cualitativas se realizará prueba de Chi-cuadrada.

Las diferencias en la proporción de la frecuencia de metilación se determinaron empleando la prueba exacta de Fisher.

Todos los análisis estadísticos fueron a dos colas considerando un nivel de significancia α de 0.05 para considerarse como estadísticamente significativo.

13.7.6.- Consideraciones éticas e institucionales

El presente estudio, se apega a la Declaración de Helsinki sobre los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, a los lineamientos establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-004-SSA3-2012 Del expediente clínico y la NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos) y a los lineamientos del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” para la investigación en seres humanos.

Todos participantes fueron enrolados voluntariamente, se les explicó claramente el protocolo y todos aceptaron participar firmando una carta de consentimiento informado.

La totalidad de los datos personales de los participantes fueron manejados con confidencialidad y la información de los participantes en el presente protocolo se encuentra almacenada en equipos protegidos.

14.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

14.1.- Extracción de ADN genómico

Se tomaron 15 ml de sangre periférica de cada individuo en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de esta muestra se extrajo el ADN genómico (ADNg) por medio de la técnica de expulsión salina (Miller A. 1998). La integridad

del ADN fue verificada en geles de agarosa al 1% teñidos con Midori green (agente intercalante de ADN).

14.2.- Cuantificación de ADNg

La cuantificación del ADN se realizó con el equipo automatizado nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer), a una longitud de onda de 260-280nm.

14.3.- Modificación del ADNg y tratamiento con bisulfito de sodio

El tratamiento con bisulfito permite discriminar entre secuencias metiladas y no metiladas ya que modifica las citosinas no metiladas a uracilos, mientras que las citosinas metiladas son resistentes a la reacción, por lo que permanecen sin cambios.

Entre 300-400 ng de ADN fueron tratados con bisulfito usando el kit EpiTect Bisulfite (Qiagen, valencia, CA; Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el ADN modificado fue purificado a través de las columnas EpiTect spin column (Qiagen). Tras la utilización de buffers y varios pasos de centrifugación el ADN tratado se sometió a varios lavados para remover todas las trazas de bisulfito de sodio, posteriormente se agregaron 30 µl de buffer de elusión al ADN y, cuando no se trabajó el paso inmediato posterior a esta actividad, se almacenó a -80° C.

En los anexos, se describe a detalle la estrategia de modificación y tratamiento del ADN con bisulfito.

14.4.- Amplificación de la región promotora por PCR específica de metilación (MSP)

El estado de metilación de la región estudiada en el promotor, se determinó por PCR específica de metilación (MSP). Para esto, se estudiaron 10,000 p.b. en el promotor de los genes de IL-17 e IL-27 con el fin de localizar islas CpG; se diseñaron dos sets de iniciadores específicos para cada uno de los genes estudiados, uno para la

secuencia metilada y otro para la secuencia no metilada, empleando el software MethPrimer (Li LC et al. 2002).

Para validar el diseño de estos iniciadores, y como control de la eficiencia del tratamiento con bisulfito, se empleó un control de ADN humano metilado y un ADN humano no metilado (EpiTec PCR Control DNA set, Qiagen) como controles positivo y negativo respectivamente.

Así, para cada muestra se llevaron a cabo dos reacciones de PCR, la de metilación y de la no metilación. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% empleando el agente intercalante de ADN, bromuro de etidio.

En las figuras 8 y 9, se muestra el análisis en la secuencia de las regiones promotoras que abarca 10,000 p.b. de los genes IL-17A e IL-27, en donde se observa, en color celeste sombreado, la isla CpG estudiada para cada gen.

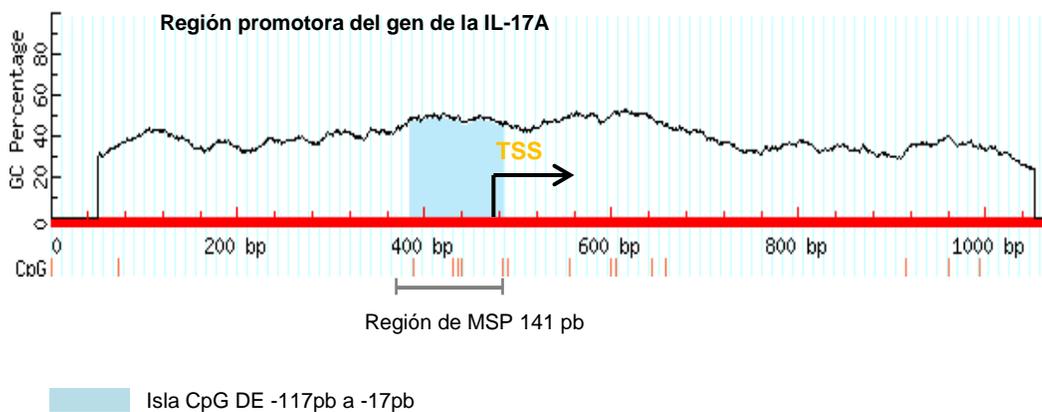


Figura 8. Predicción de islas CpG, en el promotor del gen de la IL-17A. Es posible apreciar la posición relativa respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS). La región de análisis de metilación por MSP abarca de -101 bp a +39 bp (141 pb)

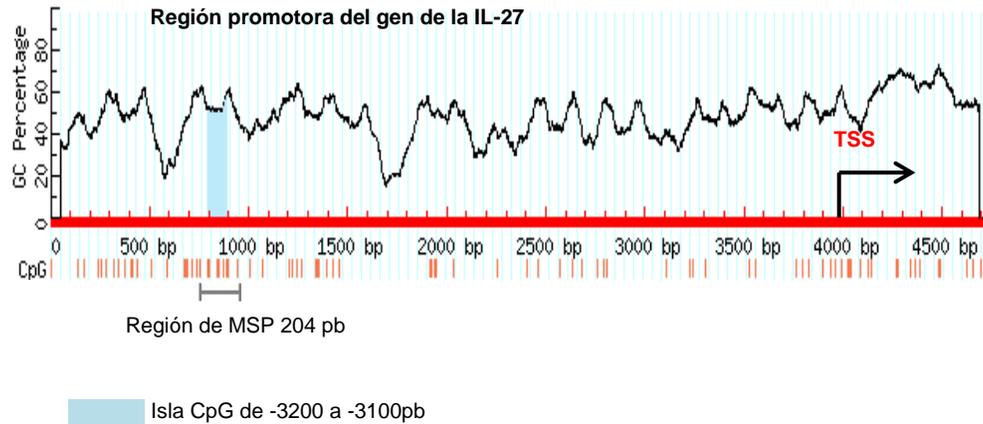


Figura 9. Predicción de islas CpG, en el promotor del gen de la IL-27. Es posible apreciar la posición relativa respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS). La región de análisis de metilación por MSP abarca -3296 bp a -3105 bp (204 pb)

La secuencia de los iniciadores que flanquean los sitios CpG, así como el tamaño del fragmento a estudiar, según lo arrojado por el software empleado, se describen en la tabla 3.

Gen	Secuencia del iniciador	Tamaño del amplicón
IL-17A	M-Forward 5' TTTTATGATTTTATTGGGGGC 3'	138pb
	M-Reverse 5' ATAAACAAAATATAACGCTATCGTC 3'	
	UM-Forward 5' TTTTTTATGATTTTATTGGGGGT 3'	141 pb.
	UM-Reverse 5' ATAAACAAAATATAACACTATCATC 3'	
IL-27	M-Forward 5' TTAGGTTGTAGTGTAGTGGTGCG 3'	202 pb
	M-Reverse 5' AAATCACGAAATCAAAAATCGA 3'	
	UM-Forward 5' TTAGGTTGTAGTGTAGTGGTGTGA 3'	204pb
	UM-Reverse 5' AAAATCACAAAATCAAAAATCAAA 3'	

Tabla 3. Secuencias de iniciadores empleados para estudiar la isla CpG en el promotor de los genes IL-17A e IL-27

15.- RESULTADOS.

Se estudiaron 100 individuos de cada subgrupo de estudio, cuyas características demográficas y parámetros bioquímicos se muestran en la Tabla 4 y 5.

Como era esperable, en el sexo masculino fue más frecuente la presentación de la EAC prematura (EACp). Es interesante resaltar que en los individuos con AS y EACp se aprecia un incremento de los principales factores de riesgo cardiovascular, en comparación con el grupo control. Respecto a los parámetros bioquímicos, los niveles de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, todos ellos relacionados con el metabolismo de los lípidos fueron significativamente más bajos en la EACp en comparación con los individuos con SA y los sujetos control.

La frecuencia de metilación en el estudio de los promotores de IL-17A e IL-27 en pacientes con EAC prematura, los individuos con SA y los controles se muestran en la Tabla 5.

Algunas imágenes de los geles de agarosa al 2%, obtenidos de las muestras de un grupo de pacientes, estudiadas por MSP para ambas citocinas, se muestran en las figuras 10 y 11.

Los ensayos de MSP que incluyen una isla CpG en la región -101 pb a +39 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) para IL-17A y una isla CpG en la región -3296 pb a -3105 pb respecto al TSS para IL-27 mostraron una distribución similar en la frecuencia de metilación de ambos genes en los tres grupos de estudio ($p > 0.05$).

Tabla 4. Características demográficas de la población.

	Control (n= 135)	AS (n= 109)	EACp (n= 104)	ρ
Edad (años)	53.1 ±8.8	62.2 ±7.2	55.3 ±7	<0.0001
Sexo (% hombres)	43	54.1	91.3	<0.0001
IMC (kg/m²)	25.1 ±2.7	29.2 ±3.6	28.8 ±3.8	<0.0001
Circunferencia de cintura (cm)	85.8 ±9	97.5 ±10.5	99.2 ±9.1	<0.0001
Obesidad (%)	0.0	37.6	34.6	<0.0001
Grasa abdominal total (cm²)	356.6 ±119.8	484.6 ±142.7	438.3 ± 126.2	<0.0001
Grasa abdominal subcutánea (cm²)	243.8 ±92.7	298.1 ±105.8	255.2 ±94	<0.0001
Grasa abdominal visceral (cm²)	112.6 ±51.3	186.4 ±71.7	183.2 ±72.8	<0.0001
Tabaquismo (%)	20.7	17.6	14.4	<0.0001
Hipertensión (%)	5.2	58.7	64.4	<0.0001

Los datos se muestran como media ± SD o porcentaje. Los valores de ρ fueron calculados mediante una prueba ANOVA para variables continuas y una prueba χ^2 de Pearson para variables categóricas. AS, aterosclerosis subclínica, EAC.

Tabla 5. Comparación de parámetros bioquímicos en la población de estudio

	Control (n= 135)	AS (n= 109)	EACp (n= 104)	p
CT (mg/dL)	191.6 ±28.1	197.9 ±37.8	155.3 ±37.6	<0.0001
CT >200 mg/dL (%)	37.8	50.5	11.5	<0.0001
HDL-C (mg/dL)	58 [40-94]	43.8 [18-97.5]	36.3 [20-65.7]	<0.0001
LDL-C (mg/dL)	115.2 ±27.2	122.3 ±32.9	88.5 ±32.4	<0.0001
LDL-C >130 mg/dL (%)	27.4	41.3	10.7	0.010
Triglicéridos (mg/dL)	97.8 [40-148]	154.1 [65.3-961]	160.6 [62.1-421.5]	<0.0001
Hipertrigliceridemia (%)	243.8 ±92.7	298.1 ±105.8	255.2 ±94	<0.0001
ApoA (mg/dL)	154.2 [93.3-418.9]	133.7 [68.2-285.7]	113 [69.1-169.7]	<0.0001
ApoB (mg/dL)	84 [93.3-418.9]	98 [68.2-285.7]	71 [69.1-169.7]	<0.0001
Lipoproteínas	8.2 [2-62]	4 [2-127]	5.1 [0.0-108]	0.284
Adiponectina	10.4 [0.0-53]	8.2 [42-164]	5.1 [1.6-27.3]	<0.001
SM (%)	0.0	52.3	58.7	<0.0001
DM T2 (%)	0.0	23.9	35.3	<0.0001
Glucosa (mg/dL)	86 [70-108]	95 [73-303]	92 [61-290]	<0.0001
HOMA-IR	2.5 [0.4-7.3]	4.7 [0.4-22.9]	5 [1.24-31.8]	<0.0001
AST (IU/L)	19 [7-106]	23 [6-125]	26 [1-95]	<0.0001
ALT (IU/L)	24 [13-56]	26 [13-88]	27 [9-84]	0.005
FA (IU/L)	73 [30-171]	82 [27-382]	71 [35-281]	0.078
GGT (IU/L)	19 [7-286]	26 [9-259]	33 [10-428]	<0.0001
Creatinina	0.8 [0.48-5.1]	0.8 [0.5-1.6]	1 [0.5-2.1]	<0.0001
Ácido úrico	4.9 [0.8-9.7]	5.8 [2.2-9.2]	6.4 [0.1-10.4]	<0.0001

Los datos son expresados como ± SD o media y rango intercuartílico. Los valores de p fueron calculados usando una prueba ANOVA o Kruskal Wallis para variables continuas y una prueba de χ^2 de Pearson para variables categóricas. AS, aterosclerosis subclínica; EACp, EAC prematura; SM, síndrome metabólico; DM T2, diabetes mellitus tipo 2; AST, aspartato transaminasa; ALT, alanina transaminasa; FA, fosfatasa alcalina; GGT, Gamma-glutamil transpeptidasa

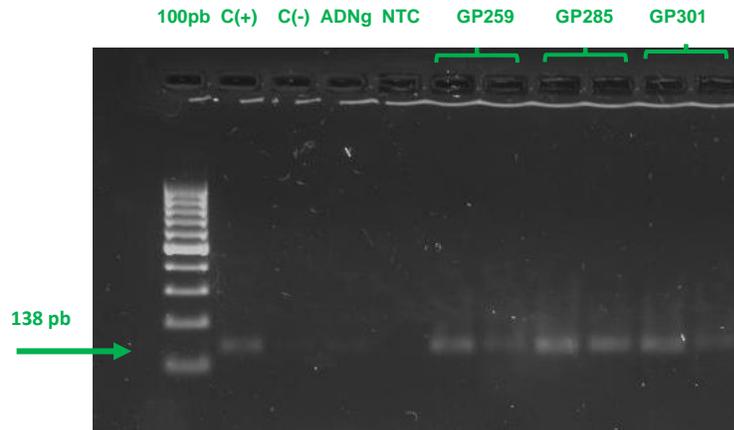


Figura 10. Gel de agarosa al 2% de muestras de un grupo de pacientes, estudiadas por MSP, para la IL-17. C(+) control positivo; C(-) control negativo; ADNg, ADN genómico; NTC control no tratado.

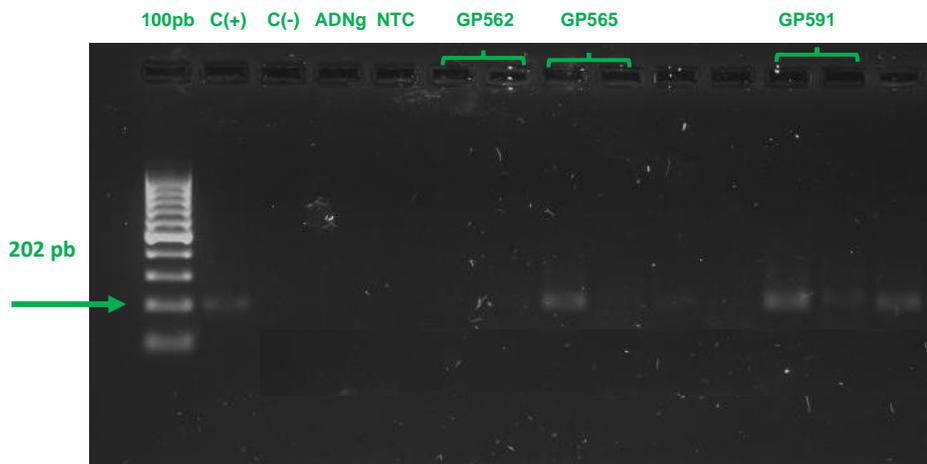


Figura 11. Gel de agarosa al 2% de muestras de un grupo de pacientes, estudiadas por MSP, para la IL-27. C(+) control positivo; C(-) control negativo; ADNg, ADN genómico; NTC control no tratado.

Tabla 6. Frecuencia de metilación del promotor de IL-17A e IL-27.

Grupo de estudio	IL-17A		ρ	IL-27		ρ
	Metilado n (%)	No metilado n (%)		Metilado n (%)	No metilado n (%)	
AS	109 (100)	0 (0.0)	>0.05	109 (100)	0 (0.0)	>0.05
EACp	104 (100)	0 (0.0)	>0.05	104 (100)	0 (0.0)	>0.05
Control	135 (100)	0 (0.0)		132 (97.8)	3 (2.2)	

a: Prueba exacta de Fisher

16.- DISCUSIÓN

Desde que 1939 Weddington acuñó el concepto de “epigenética” para describir los mecanismos por los cuales, a partir de un único genoma, los organismos desarrollan y se diferencian, la importancia y relevancia de estos mecanismos y su implicación en el proceso salud-enfermedad, ha cobrado un interés notable, puesto que existe evidencia de su importante implicación en diversas patologías como el cáncer, las enfermedades autoinmunes, los trastornos psiquiátricos, enfermedades neurodegenerativas y la EAC.

Estos mecanismos, no se encuentran ausentes en la génesis y desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, como en la EAC, en la que los mismos, se han visto implicados en las diferentes etapas de la misma enfermedad. El proceso de metilación, como mecanismo regulador durante el proceso inflamatorio que implica a citocinas como la IL-17A e IL-27 en EAC no se ha elucidado, por lo que se consideró abordarlo, dado que, como muestran diversos estudios, ambas citocinas muestran un papel paradójico al ejercer un efecto proinflamatorio o antiinflamatorio.

Desde esta perspectiva, el presente trabajo explora el estado de metilación en las citocinas IL-17A e IL-27 en pacientes con EACp, SA e individuos controles individuales en población mexicana en muestras de sangre periférica. De acuerdo con la tabla 5 no fue posible detectar diferencias significativas entre el estado de

metilación en las dos islas CpG del promotor del gen en ambas citocinas por esta estrategia experimental.

Lo anterior debe ser tomado con suma cautela debido a las razones que se expondrán a continuación.

Primeramente, las islas CpG estudiadas fueron seleccionadas debido a su cercanía con el sitio de inicio de la transcripción, considerando que podrían estar más directamente involucradas en la regulación de la expresión del producto del gen, sin embargo, no son las únicas regiones en ambos promotores que poseen islas CpG, las cuales podrían estar implicadas en la regulación epigenética de dichos genes y por tanto, estar vinculadas al riesgo de EAC.

En este sentido, Shen y cols. analizaron cambios en la metilación del ADN y en la estructura de la cromatina, mostrando como se activa la expresión génica de citocinas proinflamatorias en células mononucleares de sangre periférica de pollos de engorda, estimuladas durante tres horas con LPS. Ellos, observan demetilación del gen IL-6 en las regiones CpG 302, 191 y -264, así como el sitio CpG 371 del gen $TNF\alpha$, después del tratamiento con LPS ($p < 0.05$), mientras que los patrones de metilación en la región promotora del gen IL-1 β no se vio afectada. Esta evidencia pone de manifiesto que estas marcas epigenéticas que regulan la expresión génica de moléculas implicadas en el proceso inflamatorio son susceptibles a modificarse por diversos estímulos, enfoque que este trabajo no posee, pero que permite poner de manifiesto la necesidad de realizar, como un paso posterior, un análisis cuantitativo que permita comprender si existe una participación real del estado de metilación del promotor de estos genes en la EAC.

Los resultados obtenidos, pueden ser explicados por otra causa que aumenta la complejidad del estudio: la naturaleza biológica de la muestra.

Los perfiles de metilación del genoma humano son específicos para cada tejido; realizar el análisis de los niveles globales de metilación de todo el genoma implica un costo elevado, por lo que se propone emplear perfiles de metilación específicos en tejidos de sustitución, como la sangre periférica. Para este estudio se utilizó el

ADN de leucocitos de sangre periférica, empleado de manera habitual para el mapeo epigenético, cuando acceder al tejido diana supone un obstáculo. La principal ventaja de emplear sangre periférica es que, además de obtener ADN de manera muy eficiente, el mismo posee una alta calidad que permite emplearlo en estudios como el de este trabajo, por lo que se está convirtiendo en un método muy extendido. Se ha sugerido que los procesos inmunológicos asociados a la inflamación en diferentes enfermedades pueden alterar el patrón de metilación en las subpoblaciones de leucocitos, lo cual exige un mayor conocimiento del origen y la naturaleza del ADN de leucocitos de sangre periférica para confirmar que este se puede utilizar como sustituto del ADN específico de tejido para determinar los patrones de metilación de un gen con una expresión de difícil acceso, tal como lo efectuara Peng y cols, que exploraron el estado de metilación en el promotor de los genes ABCG1, HMGCR y GALNT2 logrando asociarla con características clínicas y metabólicas en una cohorte de 85 individuos con EAC y en 54 individuos como grupo de comparación o control (Peng P et al. 2014).

Algunos estudios han logrado evidenciar que en muestras de placas aterosclerosas o muestras de sangre periférica, es menos frecuente pero más focal observar diversos sitios donde se observa hipermetilación en sujetos con EAC, con una alta significación estadística. Es posible que nuestro grupo estudio pudiera haber observado diferencias significativas entre la población de este trabajo, si se hubiesen estudiado más sitios CpG en el promotor de los genes estudiados.

Nuestros resultados son un primer paso en la elucidación del papel de la regulación por metilación de genes implicadas en inflamación, en la génesis y desarrollo de la EAC si se considera que algunos estudios, que han analizado el estado de metilación de genes considerados críticos en la EAC, han mostrado discrepancias en abordajes preliminares por ejemplo ABCA1, ABCG1, ESR1, F2RL3, IL-3 y SOD3, y su estatus de metilación ha sido confirmado de manera independiente (Bell 2011, Fernández 2017).

Otros estudios han reportado el estado de metilación del ADN con hallazgos controvertidos utilizando diversos métodos experimentales en poblaciones

étnicamente diversas. Sharma y cols. mostraron que, en 287 sujetos indios, la metilación global del ADN fue mayor en muestras periféricas de sangre de pacientes con EAC diagnosticados angiográficamente que en los controles [Sharma y cols. 2008]. Además, Kim et al estudiaron en 286 participantes inscritos en una cohorte de factores de riesgo para ECV en una población china de Singapur y encontraron una mayor metilación global de secuencias Alu y repeticiones de satélites 2 en hombres; sin embargo, en mujeres de 45 a 74 años no se detectó asociación en el estado global de metilación del ADN [Kim et al. 2010]. Además, Bressler y cols. analizaron 600 participantes provenientes de autopsias por causas no relacionadas con enfermedades cardiovasculares 300 casos correspondieron a individuos con las puntuaciones más altas de lesiones elevadas (suma de los porcentajes del área superficial de la íntima detectada en la arteria coronaria derecha y en la mitad izquierda de la aorta abdominal y torácica que albergaban placas fibrosas, lesiones complicadas y lesiones calcificadas) y 300 individuos como grupo control que no presentaron lesiones elevadas. Los autores no detectaron un estado diferente de la metilación global del ADN hepático en esta cohorte subclínica [Bressler et al. 2011].

Retomando evidencia del estudio de Peng et al. estudiaron el estado de metilación de tres genes implicados en las vías de metabolismo de lípidos; 85 pacientes con EAC y 54 sujetos sin EAC confirmados por angiografía; al analizar la región promotora de ABCG1, GALNT2 y HMGCR en la población china Han, los autores demostraron que el promotor del gen GALNT2 y ABCG1 estaba hipermetilado, asociándolo un mayor riesgo de EAC. Pero en particular, el estatus de metilación del gen HMGCR no se asoció con el estado de metilación del ADN del promotor y el riesgo de desarrollar EAC [Peng et al. 2014].

Una de las características de nuestro estudio, que resalta en comparación con los estudios previamente mencionados y le proporciona una gran fortaleza, es la inclusión de un grupo de sujetos con aterosclerosis subclínica, y un grupo de control evaluado mediante tomografía computada, y no mediante angiografía, que podría ser un sesgo clínico en la selección del grupo control. Además, la estratificación de

la población se descartó como un posible factor de confusión. Estas características representan las principales fortalezas de nuestro estudio.

Como hemos observado, al solo estudiar una región CpG en ambos genes y solo un marcador epigenético (metilación del ADN), es necesario tomar estos datos con cautela, considerando que otros mecanismos epigenéticos podrían participar en la regulación de la expresión génica, lo que afecta los niveles de proteínas en estas citocinas.

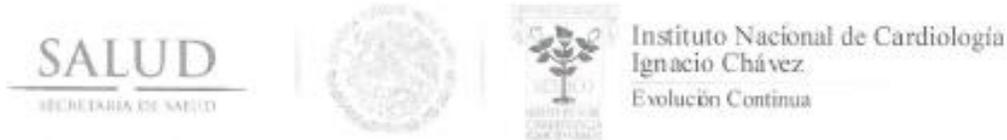
Lo anterior nos permite reflexionar sobre un último punto a discutir: la técnica de análisis empleada. La técnica de MSP, aunque es una estrategia experimental que permite conocer rápidamente el estado de metilación de prácticamente cualquier región que contenga sitios CpG, con una sensibilidad del 0.1% de alelos metilados (Ku 2011), sin embargo, es un método de análisis cualitativo, que no permite apreciar diferencias expresadas en porcentajes específicos por sitios CG del estado de metilación de los promotores, diferencias que podrían ser cruciales en la regulación de la expresión de los genes estudiados, lo que es posible lograr con otros abordajes de tipo cuantitativo como qPCR específica de metilación para el análisis del estado de metilación de los promotores, la secuenciación con bisulfito o la pirosecuenciación.

17.- CONCLUSIONES

Aunque no fue posible determinar diferencias significativas entre el estado de metilación en el promotor de los genes de las citocinas IL-17A e IL-27 en los grupos de estudio, mediante el empleo de la estrategia de MSP, esto no evidencia que el mecanismo de regulación de la expresión de estos genes por metilación no se encuentra implicado; por el contrario, dado que una serie de factores analizados contribuye a influenciar este tipo de mecanismo de regulación, ello da pie a continuar analizando las regiones promotoras estudiadas en ambos genes incluyendo otras islas CpG y/o el empleo de otras estrategias que permitan elucidar otras marcas epignéticas en la génesis y desarrollo de la EAC.

18.- ANEXOS

18.1- Carta de aceptación del proyecto por parte del Comité de Investigación del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".



DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

"2015, Año de Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D.F., a 27 de octubre de 2015

Dr. José Manuel Rodríguez Pérez
Departamento de Biología Molecular
Presente.

Dr. Rodríguez:

El Comité de Investigación en sesión reglamentaria revisó el protocolo:
Análisis de metilación en el promotor de los genes de IL-17, IL-24, IL-27 como biomarcadores en enfermedad arterial coronaria, en el que usted funge como responsable, y resolvió:

- Aprobarlo y turnarlo al Comité de Ética en Investigación
- Aprobarlo, no requiere sanción del Comité de Ética en Investigación
- Solicitar su revisión y nuevo envío
- Rechazarlo

COMENTARIOS:

La aceptación definitiva del protocolo queda sujeta al dictamen aprobatorio del Comité de Ética en Investigación.

Atentamente,

EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

Dr. Gilberto Vargas Alarcón
Subdirector de Investigación Básica y Tecnológica.

18.2.- Carta de aprobación del proyecto por parte del Comité de Investigación y de Ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.



Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez
Evolución Continua

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

“2015, Año de Generalísima José María Morelos y Pavón”

México, D.F., a 30 de noviembre de 2015.

Dr. José Manuel Rodríguez Pérez
Investigador en Ciencias Médicas D
Departamento de Biología Molecular
Presente.

Doctor Rodríguez:

Me permito informar a usted, que su propuesta de proyecto de investigación titulada: **Análisis de metilación en el promotor de los genes de IL-17, IL-24, IL-27 como biomarcadores en enfermedad arterial coronaria**, ha sido revisada y aprobada con el número **15-947**, por los Comités de Investigación y de Ética en Investigación, en su sesiones ordinarias del 27 de octubre y 17 de noviembre de 2015, respectivamente.

Así mismo se revisó y aprobó la siguiente documentación:

- ✚ Carta de Consentimiento Informado para Paciente (Investigación Genética), en español.
- ✚ Carta de Consentimiento Informado para el Paciente (Investigación Bioquímica y Tomografía), en español.
- ✚ Carta de Consentimiento Informado para el Participante Sano (Investigación Bioquímica y Tomografía), en español.

Le envío un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Jesús Vargas Barrón
Director de Investigación.

c.c.p. Subdirección de Investigación Básica y Tecnológica
Jefatura de Trabajo Social
Expediente

JVB'ehg

18.3.- Técnica de conversión y tratamiento del ADN con bisulfito de sodio.

La modificación del ADNg se realizó mediante el kit comercial EpiTect Bisulfite (Qiagen, Inc, Valencia, CA). El tratamiento del ADNg con este kit consistió en incubar el ADNg con bisulfito de sodio, dando como resultado la modificación de residuos de citosina no metilados en uracilo y dejando aquellos residuos de citosina metilada sin cambios. Este es un paso crítico en la determinación del estado de metilación, ya que deben modificarse en su totalidad los residuos de citosina no metilados presentes en el DNA.

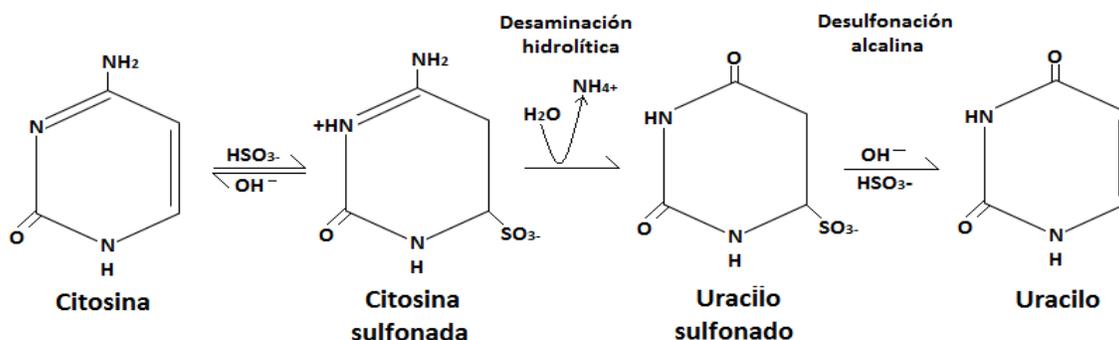


Figura 12. Mecanismo de reacción, de la conversión de nucleótidos de citosina a uracilo mediante el tratamiento de ADNg con bisulfito de sodio. El ADN se purifica y se somete a una modificación química mediante el uso de bisulfito de sodio, mediante una reacción de sulfonación que convierte todos los residuos de citosina no metilada a uracilo. La citosina metilada, en la que un grupo metilo se encuentra unido al carbono 5 de la molécula, no puede ser modificada ya que el grupo metilo actúa como protección de la misma e impide la reacción de sulfonación. Tomado y modificado de Ku et al., 2011

La modificación del ADN utilizando el Kit EpiTect Bisulfite comprende unos sencillos pasos: la modificación de citosinas no metiladas mediante bisulfito de sodio; la unión del ADN modificado de cadena sencilla a la membrana de una de la columna de centrifugación; lavado; desulfonación del DNA unido a la membrana; lavado del DNA unido a la membrana para eliminar el agente de desulfonación; y la elución del ADN modificado de la columna. El ADN eluido es adecuado para todas las técnicas

que actualmente se utilizan para el análisis de la metilación del ADN y se basa en reacciones de sulfonación y desulfonación.

Se modificaron 2 µg de ADNg con bisulfito de sodio. Para ello, se descongeló el ADNg a ser modificado. Se disolvieron las alícuotas requeridas de la mezcla de bisulfito de sodio adicionando 800 µL de agua libre RNasa para cada alícuota. Se mezclaron mediante vórtex, hasta que la mezcla de bisulfito de sodio quedó completamente disuelta (esto puede tardar hasta 5 minutos). Cuando no se disolvió bien la mezcla de bisulfito de sodio y agua, se incubó a 60 °C y se agitó nuevamente.

Las reacciones de bisulfito de sodio se prepararon en tubos de PCR de 200 µL en un volumen final de 140 µL colocando ADNg (volumen variable, con un máximo de 20 µL), agua libre de ARNasas (volumen variable), 85 µL de la mezcla de bisulfito de sodio (disuelta previamente) y 35 µL de buffer protector de ADN, cada reactivo se colocó en el orden descrito. Se cerraron los tubos de PCR, se homogenizó la reacción realizando una breve agitación con vórtex, todo a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla de reacción de ADNg con bisulfito de sodio se sometió a tratamiento térmico, utilizando un termociclador, programándolo de la siguiente forma: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, incubación a 60°C por 25 minutos, desnaturalización a 95°C por 5 minutos, incubación a 60°C por 85 minutos (1 h 25 min), desnaturalización a 95°C por 5 min, incubación a 60°C por 175 min (2 h 55 min) y finalmente la reacción se mantuvo a 20°C por tiempo indefinido (no más de 12 horas).

Se centrifugaron brevemente los tubos que contenían las reacciones con bisulfito de sodio y a continuación se transfirieron a tubos limpios de 1.5 mL. Se adicionaron 560 µL del regulador BL, se mezcló mediante agitación suave con vórtex y se centrifugó brevemente. En una gradilla se colocaron las columnas de centrifugación spin EpiTect con sus respectivos tubos colectores. Se transfirió la mezcla obtenida anteriormente a la columna correspondiente, se centrifugó a máxima velocidad durante un minuto (13,000 g), el filtrado y el tubo colector se desecharon y se colocaron las columnas en un tubo colector limpio. Posteriormente, se llevó a cabo la desulfonación, adicionando 500 µL del regulador BD a cada columna y se incubó

durante 15 min a temperatura ambiente (15-25 °C). Se centrifugaron las columnas a máxima velocidad durante un minuto, se desechó el filtrado, se secó la boca del tubo colector en una gasa y se colocaron las columnas nuevamente en su tubo colector. Se lavó el ADN modificado con bisulfito agregándose 500 µL del regulador BW a cada columna y centrifugando a máxima velocidad durante un minuto; se desechó el filtrado, se secó la boca del tubo colector en una gasa y se colocaron las columnas nuevamente en sus tubos colectores. El paso anterior se repitió una vez más y posteriormente se realizó una centrifugación adicional a máxima velocidad durante un minuto para eliminar cualquier líquido residual, por último, se colocaron las columnas con las tapas abiertas en un tubo limpio para microcentrífuga de 1.5 mL y se incubaron las columnas durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la evaporación de cualquier líquido residual. A continuación, se eluyó el ADN adicionando 40 µL de agua grado biología molecular (a 60°C) en el centro de la membrana de cada columna, se dejó incubar por 20 min a temperatura ambiente para posteriormente realizar la elución del ADN purificado, por centrifugación a máxima velocidad durante un minuto. Se volvieron a colocar 20 µL de agua grado biología molecular (60°C) a la membrana dejando incubar por 20 min y eluyendo por centrifugación a máxima velocidad por un minuto. El ADN purificado se cuantificó en nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer), y se obtuvieron sus purezas de 260/230 y 260/280. El ADN modificado con bisulfito se almacenó a -20 °C hasta su uso.

18.4.- Interpretación de las figuras 10 y 11.

La técnica de MSP (PCR específica de metilación) es una técnica cualitativa, por lo que, para lograr visualizar los amplicones obtenidos de la reacción y elucidar el estatus de metilación de la región estudiada en cada gen, se efectuaron geles de agarosa al 2%.

Una vez que el ADN_g fue tratado con bisulfito de sodio, se sometió una misma muestra por duplicado a la reacción de MSP con dos sets de primers específicos para cada uno de los genes estudiados, que eran correspondientes a la secuencia metilada y a la secuencia no metilada. Para validar el diseño de los primers y como control de la eficiencia del tratamiento con bisulfito se empleó un control de ADN humano metilado y un ADN humano no metilado (EpiTec PCR Control DNA set, Qiagen) como controles positivo y negativo respectivamente.

En la figura 11, se muestra un gel de agarosa al 2% que corresponde a las reacciones de MSP de muestras para la IL-17A. En el primer carril del gel, podemos apreciar los marcadores de peso molecular. El segundo carril contiene el control positivo de metilación con ADN humano tratado con bisulfito; obsérvese la banda de amplificación que corresponde al peso molecular de 138 pb esperado. En el tercer carril corresponde al control negativo de metilación con ADN humano tratado con bisulfito; dado que este ADN no se encuentra metilado, no se observa banda de amplificación. El cuarto carril posee ADN_g humano que no ha sido sometido al tratamiento con bisulfito; es posible observar que no hay banda de amplificación. En el quinto carril solo se colocó agua con el fin de evaluar posibles contaminaciones. A partir del sexto carril, se pueden apreciar, por duplicado, las muestras problema.

En la figura 12, se muestra un gel de agarosa al 2% que corresponde a las reacciones de MSP de muestras para la IL-27A. En el primer carril del gel, podemos apreciar los marcadores de peso molecular. El segundo carril contiene el control positivo de metilación con ADN humano tratado con bisulfito; obsérvese la banda de amplificación que corresponde al peso molecular de 202 pb esperado. En el tercer carril corresponde al control negativo de metilación con ADN humano tratado con bisulfito; dado que este ADN no se encuentra metilado, no se observa banda

de amplificación. El cuarto carril posee ADN humano que no ha sido sometido al tratamiento con bisulfito; es posible observar que no hay banda de amplificación. En el quinto carril solo se colocó agua con el fin de evaluar posibles contaminaciones. A partir del sexto carril, se pueden apreciar, por duplicado, las muestras problema.

19.- BIBLIOGRAFÍA

1. Navarro V, Shi L. **The Political Context of Social Inequalities and Health.** Soc Sci Med. 2001;53(3):481-491
2. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). **Principales causas de mortalidad.** Consultado el 11 de enero de 2018 en: <http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/registros/vitales/mortalidad/>
3. **Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos 2017.** Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI).
4. Instituto Nacional de Salud Pública, México. **Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016).** Secretaría de Salud
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). **Enfermedades cardiovasculares, nota descriptiva, enero 2015.** Consultado el 11 de enero de 2018 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
6. Secretaría de Salud. **Infografía. Día Mundial del Corazón 2015.** Consultado el 12 de enero de 2018 en: <http://www.gob.mx/salud/articulos/infografia-dia-mundial-del-corazon-2015?state=published>
7. Sánchez-Arias AG, Bobadilla-Serrano ME, Dimas-Altamirano B, Gómez-Ortega M, González-González G. **Enfermedad cardiovascular: primera causa de morbilidad en un hospital de tercer nivel.** Rev Mex Cardiol 2016; 27 (s3): s98-s102
8. Fundación Española del Corazón. **Enfermedades cardiovasculares.** Consultado el 11 de enero de 2018 en: <http://www.fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares.html>
9. Rosas-Peralta M, Arizmendi-Uribe E, Borrayo-Sánchez G. **¿De qué fallecen los adultos en México? Impacto en el desarrollo económico y social de la nación. La carga global de los padecimientos cardiovasculares.** Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2017;55(1):98-103

10. Organización Panamericana de la salud. **Estrategia mundial sobre alimentación saludable, actividad física y salud (DPAS). Plan de implementación en América Latina y el Caribe 2006-2007.** Washington, DC: OPS, 2006.
11. Bray GA. **Etiology and pathogenesis of obesity.** Clin Cornerstone 1999;2:1-15
12. Lee M, Aronne LJ. **Weight management for type 2 diabetes mellitus: global cardiovascular risk reduction.** Am J Cardiol 2007;19: 68-79.
13. Martínez-Palomino G, Vallejo M, Huesca C, Álvarez LE, Paredes G, Lerma GC. **Factores de riesgo cardiovascular en una muestra de mujeres jóvenes mexicanas.** Arch Cardiol Mex 2006;76(4):401-407.
14. Koh-Banerjee P, Wang Y, Hu F, Spiegelman D, Willett W, Rimm E. **Changes in body weight and body fat distribution as risk factors for clinical diabetes in US men.** Am J Epidemiol 2004;159:1150-1159.
15. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. **Progress and challenge in translating the biology of atherosclerosis.** Nature. 2011 May 19; 473(7347):317-25.
16. Stoll G, Bendszus M. **Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization.** Stroke. 2006; 37:1923-32
17. Schram MT, Stehouwer CD. **Endothelial dysfunction, cellular adhesion molecules and the metabolic syndrome.** Horm Metab Res. 2005;37 Suppl 1:49-55
18. Stokes KY. **Microvascular responses to hypercholesterolemia: the interactions between innate and adaptive immune responses.** Antioxid Redox Signal. 2006;8:1141-51.
19. Huo Y, Ley K. **Adhesion molecules and atherogenesis.** Acta Physiol Scand. 2001;173:35-43. 6.

20. Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB, et al. **Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease.** Am Heart J. 1996;132:1-8
21. Hansson GK. **Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.** N Engl J Med. 2005;352:1685-95
22. Tobias P, Curtiss LK. **Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Paying the price for pathogen protection: toll receptors in atherogenesis.** J Lipid Res. 2005;46:404-11. 41.
23. Akira S, Takeda K. **Toll-like receptor signalling.** Nat Rev Immunol. 2004;4:499-511
24. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. **A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor deficient mice.** J Clin Invest. 1998;101:353-63. 26.
25. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, et al. **Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice.** Circulation. 2003;107:1009-16. 27.
26. Barter P. **The inflammation: lipoprotein cycle.** Atheroscler Suppl. 2005;6:15-20.
27. Koh KK, Han SH, Quon MJ. **Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions.** J Am Coll Cardiol. 2005;46:1978-85.
28. Tedgui A & Mallat Z. **Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways.** Physiol Rev. 2006; 86: 515-581.
29. Laslett LJ, Alagona Jr P, Clark III BA, et al. **The world wide environment of cardiovascular disease: prevalence, diagnosis, therapy, and**

policy issues: a report from the American College of Cardiology. J Am Coll Cardiol 2012;60: S1–S49.

30. Hansson GK, Robertson AK, Sodeberg-Naucler C. **Inflammation and atherosclerosis.** Annu Rev Pathol. 2006; 1: 297-329
31. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. **Progress and challenge in translating the biology of atherosclerosis.** Nature. 2011 May 19; 473(7347):317-25
32. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, Wensley F, Higgins JP, Lennon L, Eiriksdottir G, Rumley A, Whincup PH, Lowe GD, Gudnason V. **Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review.** PLoS Med. 2008 Apr 8;5(4):e78.
33. Tedgui A, Mallat Z. **Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways.** Physiol Rev. 2006 Apr;86(2):515-81.
34. Vargas-Alarcón G, Ángeles-Martínez J, Villarreal-Molina T, Alvarez-León E, Posadas-Sánchez R, Cardoso-Saldaña G, Ramírez-Bello J, Pérez-Hernández N, Juárez-Rojas JG, Rodríguez-Pérez JM, Fragoso JM, Posadas-Romero C. **Interleukin-17A Gene Haplotypes are Associated with Risk of Premature Coronary Artery Disease in Mexican Patients from the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Study.** PLoS One. 2015; 10(1): e0114943.
35. Posadas-Sánchez R, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Coral-Vázquez RM, Roque-Ramírez B, Llorente L, Lima G, Flores-Dominguez C, Villarreal-Molina T, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G. **Interleukin-27 polymorphisms are associated with premature coronary artery disease and metabolic parameters in the Mexican population: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) Mexican study.** Oncotarget. 2017 Sep 8; 8(38): 64459–64470.
36. Leeper NJ, Kullo IJ, Cooke JP. **Genetics of peripheral artery disease.** Circulation. 2012 Jun 26;125(25):3220-8.

37. Yan MS, Marsden PA. **Epigenetics in the Vascular Endothelium: Looking From a Different Perspective in the Epigenomics Era.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Nov;35(11):2297-306.
38. Rose G. **Familial patterns in ischaemic heart disease.** *Br J Prev Soc Med.* 1964 Apr;18:75-80.
39. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. **Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor.** *Immunity.* 1995 Dec;3(6):811-21.
40. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. **IL-17 and Th17 Cells.** *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517
41. Robert M, Miossec P. **Effects of Interleukin 17 on the cardiovascular system.** *Autoimmun Rev.* 2017 Sep;16(9):984-991
42. Gaffen SL. **Structure and signalling in the IL-17 receptor family.** *Nat Rev Immunol.* 2009 Aug;9(8):556-67
43. Xu S & Cao X. **Interleukin-17 and its expanding biological functions.** *Cell Mol Immunol.* 2010 May;7(3):164-74.
44. Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM. **Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells.** *J Biol Chem.* 2007 May 4;282(18):13447-55
45. de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, Idu MM, van Maldegem F, Aten J, van der Wal AC. **Differential expression of interleukin-17 family cytokines in intact and complicated human atherosclerotic plaques.** *J Pathol.* 2010 Mar;220(4):499-508.
46. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. **IL-17 stimulates the production and expression**

of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. J Immunol. 1998 Apr 1;160(7):3513-21.

47. Erbel C, Dengler TJ, Wangler S, Lasitschka F, Bea F, Wambsganss N, Hakimi M, Böckler D, Katus HA, Gleissner CA. **Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability.** Basic Res Cardiol. 2011 Jan;106(1):125-34
48. Takatori H, Kanno Y, Watford WT, Tato CM, Weiss G, Ivanov II, Littman DR, O'Shea JJ. **Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22.** J Exp Med. 2009 Jan 16;206(1):35-41
49. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. **IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: subtle and contextual roles.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015 Feb;35(2):258-64
50. Gong F, Liu Z, Liu J, Zhou P, Liu Y, Lu X. **The paradoxical role of IL-17 in atherosclerosis.** Cell Immunol. 2015 Sep;297(1):33-9.
51. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. **IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells.** Immunity. 2002 Jun;16(6):779-90
52. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. **Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation.** Annu Rev Immunol. 2007;25:221-42.
53. Devergne O, Hummel M, Koeppen H, Le Beau MM, Nathanson EC, Kieff E, Birkenbach M. **A novel interleukin-12 p40-related protein induced by latent Epstein-Barr virus infection in B lymphocytes.** J Virol. 1996 Feb;70(2):1143-53.
54. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. **The inhibitory cytokine IL-35**

contributes to regulatory T-cell function. Nature. 2007 Nov 22;450(7169):566-9.

55. Crabé S, Guay-Giroux A, Tormo AJ, Duluc D, Lissilaa R, Guilhot F, Mavoungou-Bigouagou U, Lefouili F, Cognet I, Ferlin W, Elson G, Jeannin P, Gauchat JF. **The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling.** J Immunol. 2009 Dec 15;183(12):7692-702.
56. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, Phillips JH, McClanahan TK, de Waal Malefyt R, Kastelein RA. **WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27.** J Immunol. 2004 Feb 15;172(4):2225-31.
57. Wang RX1, Yu CR, Mahdi RM, Egwuagu CE. **Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells.** J Biol Chem. 2012 Oct 19;287(43):36012-21
58. Stumhofer JS, Tait ED, Quinn WJ 3rd, Hosken N, Spudy B, Goenka R, Fielding CA, O'Hara AC, Chen Y, Jones ML, Saris CJ, Rose-John S, Cua DJ, Jones SA, Elloso MM, Grötzinger J, Cancro MP, Levin SD, Hunter CA. **A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling.** Nat Immunol. 2010 Dec;11(12):1119-26
59. Shimozato O, Sato A, Kawamura K, Chiyo M, Ma G, Li Q, Tagawa M. **The secreted form of p28 subunit of interleukin (IL)-27 inhibits biological functions of IL-27 and suppresses anti-allogeneic immune responses.** Immunology. 2009 Sep;128(1 Suppl):e816-25
60. Dibra D, Cutrera J, Xia X, Kallakury B, Mishra L, Li S. **Interleukin-30: a novel antiinflammatory cytokine candidate for prevention and treatment of inflammatory cytokine-induced liver injury.** Hepatology. 2012 Apr;55(4):1204-14
61. Rousseau F, Basset L, Froger J, Dinguirard N, Chevalier S, Gascan H. **IL-27 structural analysis demonstrates similarities with ciliary neurotrophic factor (CNTF) and leads to the identification of antagonistic variants.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Nov 9;107(45):19420-5.

62. Hall AO, Silver JS, Hunter CA. **The immunobiology of IL-27**. Adv Immunol. 2012;115:1-44.
63. Yoshida H, Nakaya M, Miyazaki Y. **Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense**. J Leukoc Biol. 2009; 86: 1295–1303
64. Yoshida H & Hunter CA. **The immunobiology of interleukin-27**. Annu Rev Immunol. 2015;33:417-43.
65. Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. **Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment**. J Immunol. 2003; 170: 4886–4890.
66. Artis D, Villarino A, Silverman M, He W, Thornton EM, Mu S, Summer S, Covey TM, Huang E, Yoshida H, Koretzky G, Goldschmidt M, Wu GD, de Sauvage F, Miller HR, Saris CJ, Scott P, Hunter CA. **The IL- 27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity**. J Immunol. 2004; 173: 5626–5634.
67. Yoshimoto T, Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K. **IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation**. J Immunol. 2007; 179: 4415–4423.
68. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, Lee J, de Sauvage FJ, Ghilardi N. **Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells**. Nat Immunol. 2006; 7: 929–936.
69. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJ, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA. **Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system**. Nat Immunol. 2006; 7: 937–945.

70. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL. **A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells.** *Nat Immunol.* 2007; 8: 1380–1389.
71. Hirase T, Hara H, Miyazaki Y, Ide N, Nishimoto-Hazuku A, Fujimoto H, Saris CJ, Yoshida H, Node K. **Interleukin 27 inhibits atherosclerosis via immunoregulation of macrophages in mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; 305: H420–H429
72. Jin W, Zhao Y, Yan W, Cao L, Zhang W, Wang M, Zhang T, Fu Q, Li Z. **Elevated circulating interleukin-27 in patients with coronary artery disease is associated with dendritic cells, oxidized low-density lipoprotein, and severity of coronary artery stenosis.** *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 506283
73. Fu H, Tang YY, Ouyang XP, Tang SL, Su H, Li X, Huang LP, He M, Lv YC, He PP, Yao F, Tan YL, Xie W, Zhang M, Wu J, Li Y, Chen K, Liu D, Lan G, Zeng MY, Zheng XL, Tang CK. **Interleukin-27 inhibits foam cell formation by promoting macrophage ABCA1 expression through JAK2/STAT3 pathway.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Oct 3;452(4):881-7
74. Koltsova EK, Kim G, Lloyd KM, Saris CJ, von Vietinghoff S, Kronenberg M, Ley K. **Interleukin-27 receptor limits atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice.** *Circ Res.* 2012 Oct 26;111(10):1274-85.
75. Posadas-Sánchez R, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Coral-Vázquez RM, Roque-Ramírez B, Llorente L, Lima G, Flores-Dominguez C, Villarreal-Molina T, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G. **Interleukin-27 polymorphisms are associated with premature coronary artery disease and metabolic parameters in the Mexican population: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) Mexican study.** *Oncotarget.* 2017 Mar 15;8(38):64459-64470
76. Gregersen I, Sandanger Ø, Askevold ET, Sagen EL, Yang K, Holm S, Pedersen TM1, Skjelland M, Krohg-Sørensen K, Hansen TV, Dahl TB, Otterdal K, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A, Halvorsen B. **Interleukin 27 is increased in carotid atherosclerosis and promotes NLRP3 inflammasome activation.** *PLoS One.* 2017 Nov 27;12(11):e0188387

77. López-Bautista F, Posadas-Romero C, Cardoso-Saldaña G, Juárez-Rojas JG, Medina-Urrutia A, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Vargas-Alarcón G, Posadas-Sánchez R. **Association of vitamin D deficiency with coronary artery disease in Mexican population: Genetics of atherosclerotic disease (GEA) study.** Gac Med Mex. 2017;153(5):566-574.
78. Waddington CH. **An Introduction to Modern Genetics.** New York: Macmillan; 1939
79. Morgan DK, Whitelaw E. **The case for transgenerational epigenetic inheritance in humans.** Mamm. Genome. 2008; 19 (6):394-7
80. Allis CD & Jenuwein T. **The molecular hallmarks of epigenetic control.** Nat Rev Genet. 2016 Aug;17(8):487-500
81. Wang Y, Liang Y, Lu Q. **MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets in human diseases.** Clin. Genet. 2008; 74 (4):307-15
82. Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S. **Histone modifications and nuclear architecture: a review.** J. Histochem. Cytochem. 2008; 56 (8):711-21.
83. Posadas-Sánchez R & Vargas-Alarcón G. **Innate Immunity in Coronary Disease. The Role of Interleukin-12 Cytokine Family in Atherosclerosis.** Rev Invest Clin. 2018;70(1):5-17
84. Rodríguez Dorantes M, Téllez Ascencio N, Cerbón MA., López & Cervantes, A. (2004). **Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica.** Rev Invest Clín 2004; Vol. 56(1):56-71
85. Dolinoy DC, Jirtle RL. **Environmental epigenomics in human health and disease.** Environ Mol Mutagen 2008; 49: 4-8.
86. Klose RJ, Bird AP. **Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.** Trends Biochem Sci 2006; 31: 89-97.

87. Marmorstein R, Trievel RC. **Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities.** Biochim Biophys Acta 2009;1789(1):58-68.
88. Hargreaves DC, Crabtree GR. **ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms.** Cell Res 2011;21(3):396-420.
89. Lusser, A. & J. T. Kadonaga. **Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines.** Bioessays (2003), vol. 25, pp. 1192-1200.
90. Laurent BC, Treich I, Carlson M. **The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation.** Genes Dev 1993; 7: 583-91.
91. Khavari PA, Peterson CL, Tamkun JW, Mendel DB, Crabtree GR. **BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription.** Nature 1993; 366: 170-4.
92. Winston F, Carlson M. **Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection.** Trends Genet 1992; 8: 387-91.
93. Mahmoudi T, Verrijzer C P. **Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins.** Oncogene 2001;20(24):3055-66.
94. Roberts CW, Orkin SH. **The SWI/SNF complex-chromatin and cancer.** Nat Rev Cancer 2004;4(2):133-42.
95. Dahiya A, Wong S, Gonzalo S, Gavin M, et al. **Linking the Rb and Polycomb pathways.** Mol Cell 2001;8(3):557-69
96. Dávalos-Salas MI & Recillas-Targa F. **La vía Rb/E2F y la familia de proteínas represoras polycomb en el desarrollo de cáncer.** (2011). TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 14(1), 38-50

97. Lau NC, Lim L P, Weinstein EG, Bartel DP, et al. **An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans***. *Science* 2001;294(5543):858-62.
98. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. **MicroRNAs**. *Cancer J* 2008;14(1):1-6.
99. Golbabapour S, Abdulla MA, Hajrezaei M. **A concise review on epigenetic regulation: insight into molecular mechanisms**. *Int J Mol Sci*. 2011;12(12):8661-94.
100. Turunen MP, Aavik E, Ylä-Herttuala S. **Epigenetics and atherosclerosis**. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Sep;1790(9):886-91.
101. Jurkowska, R.Z.; Jurkowski, T.P.; Jeltsch, A. **Structure and function of mammalian DNA methyltransferases**. *Chembiochem* 2011, 12, 206–222.
102. Sakai, Y.; Suetake, I.; Shinozaki, F.; Yamashina, S.; Tajima, S. **Co-expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a2 and Dnmt3L in gonocytes of mouse embryos**. *Gene Expr. Patterns* 2004, 5, 231–237.
103. Metivier, R.; Gallais, R.; Tiffoche, C.; Le Peron, C.; Jurkowska, R.Z.; Carmouche, R.P.; Ibberson, D.; Barath, P.; Demay, F.; Reid, G.; et al. **Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter**. *Nature* 2008, 452, 45–50.
104. Robert, M.F.; Morin, S.; Beaulieu, N.; Gauthier, F.; Chute, I.C.; Barsalou, A.; MacLeod, A.R. **DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells**. *Nat. Genet.* 2003, 33, 61–65.
105. Chen, T.; Li, E. **Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals**. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006, 301, 179–201.

106. Mortusewicz, O.; Schermelleh, L.; Walter, J.; Cardoso, M.C.; Leonhardt, H. **Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102, 8905–8909.
107. Suetake, I.; Shinozaki, F.; Miyagawa, J.; Takeshima, H.; Tajima, S. **DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction**. J. Biol. Chem. 2004, 279, 27816–27823.
108. Weaver JR; Susiarjo M; Bartolomei MS. **Imprinting and epigenetic changes in the early embryo**. Mamm. genome 20:532-43, 2009.
109. Li E; Beard C & Jaenisch R. **Role for DNA methylation in genomic imprinting**. Nature 366, (6453): 362-5, 1993.
110. Reik W; Dean W; Walter J. **Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development**. Science, 293:1089-93, 2001.
111. Li, E. **Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development**. Nat. Rev. Genet., 3(9):662-73, 2002.
112. Disteche CM, Berletch JB. **X-chromosome inactivation and escape**. J Genet. 2015 Dec;94(4):591-9.
113. Chaligné R, Heard E2. **X-chromosome inactivation in development and cancer**. FEBS Lett. 2014 Aug 1;588(15):2514-22.
114. Ahn J. & Lee J. **X chromosome: X inactivation**. Nature Education (2008) 1(1):24
115. Galupa R, Heard E. **X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation**. Curr Opin Genet Dev. 2015 Apr;31:57-66.
116. Oberlander TF1, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. **Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses**. Epigenetics. 2008 Mar-Apr;3(2):97-106.
117. Collas P, Noer A, Timoskainen S. **Programming the genome in embryonic and somatic stem cells**. J Cell Mol Med. 2007 Jul-Aug;11(4):602-20.

118. Chen CH¹, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. **Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart.** *Science*. 2008 Sep 12;321(5895):1493-5
119. Ordovás JM, Smith CE. **Epigenetics and cardiovascular disease.** *Nat Rev Cardiol*. 2010 Sep;7(9):510-9
120. Webster AL, Yan MS, Marsden PA. **Epigenetics and cardiovascular disease.** *Can J Cardiol*. 2013 Jan;29(1):46-57
121. Martínez SR, Gay MS, Zhang L. **Epigenetic mechanisms in heart development and disease.** *Drug Discov Today*. 2015 Jul; 20(7):799-811
122. Illingworth RS, Bird AP. **CpG islands--'a rough guide'.** *FEBS Lett*. 2009 Jun 5;583(11):1713-20.
123. Cedar H, Bergman Y. **Programming of DNA methylation patterns.** *Annu Rev Biochem*. 2012;81:97-117
124. Baccarelli A, Wright R, Bollati V, Litonjua A, Zanobetti A, Tarantini L, Sparrow D, Vokonas P, Schwartz J. **Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation.** *Epidemiology*. 2010 Nov;21(6):819-28
125. Friso S, Pizzolo F, Choi SW, Guarini P, Castagna A, Ravagnani V, Carletto A, Pattini P, Corrocher R, Olivieri O. **Epigenetic control of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension.** *Atherosclerosis*. 2008 Aug;199(2):323-7
126. Shen J, Liu Y, Ren X, Gao K, Li Y, Li S, Yao J, Yang X. **Changes in DNA Methylation and Chromatin Structure of Pro-inflammatory Cytokines Stimulated by LPS in Broiler Peripheral Blood Mononuclear Cells.** *Poult Sci*. 2016 Jul 1;95(7):1636-45
127. Shen J, Wu S, Guo W, Liang S, Li X, Yang X. **Epigenetic regulation of pro-inflammatory cytokine genes in lipopolysaccharide -stimulated peripheral blood mononuclear cells from broilers.** *Immunobiology*. 2017 Feb;222(2):308-315.
128. Stenvinkel P, Karimi M, Johansson S, Axelsson J, Suliman M, Lindholm B, Heimbürger O, Barany P, Alvestrand A, Nordfors L, Qureshi AR, Ekström TJ, Schalling M.

Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? J Intern Med. 2007 May;261(5):488-99

129. Shuto T, Furuta T, Oba M, Xu H, Li JD, Cheung J, Gruenert DC, Uehara A, Suico MA, Okiyoneda T, Kai H. **Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells.** FASEB J. 2006 Apr;20(6):782-4.
130. Wilson AG. **Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases.** J Periodontol. 2008 Aug;79(8 Suppl):1514-9
131. Hai Z & Zuo W. **Aberrant DNA methylation in the pathogenesis of atherosclerosis.** Clin Chim Acta. 2016 May 1;456:69-74
132. Ding Z, Liu S, Wang X, Deng X, Fan Y, Sun C, Wang Y, Mehta JL. **Hemodynamic shear stress via ROS modulates PCSK9 expression in human vascular endothelial and smooth muscle cells and along the mouse aorta.** Antioxid Redox Signal. 2015 Mar 20;22(9):760-71
133. Kim M, Long TI, Arakawa K, Wang R, Yu MC, Laird PW. **DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk.** PLoS One. 2010 Mar 15;5(3):e9692
134. Yu Q, Zhou B, Zhang Y, Nguyen ET, Du J, Glosson NL, Kaplan MH. **DNA methyltransferase 3a limits the expression of interleukin-13 in T helper 2 cells and allergic airway inflammation.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 10;109(2):541-6
135. Wang X, Cao Q, Yu L, Shi H, Xue B, Shi H. **Epigenetic regulation of macrophage polarization and inflammation by DNA methylation in obesity.** JCI Insight. 2016 Nov 17; 1(19): e8774
136. Wang P, Shen C, Diao L, Yang Z, Fan F, Wang C, Liu X, Sun X, Dong Z, Zhu H, Ma X, Cao Q, Zhao X, Ma D, Zou Y, Hu K, Sun A, Ge J. **Aberrant hypermethylation of aldehyde dehydrogenase 2 promoter upstream sequence in rats with experimental myocardial infarction.** Biomed Res Int. 2015;2015:503692

137. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang CH, Stampfer M. **Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial.** JAMA. 2004 Feb 4;291(5):565-75.
138. Glier MB, Green TJ, Devlin AM. **Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease.** Mol Nutr Food Res. 2014 Jan;58(1):172-82
139. Green TJ, Skeaff CM, McMahon JA, Venn BJ, Williams SM, Devlin AM, Innis SM. **Homocysteine-lowering vitamins do not lower plasma S-adenosylhomocysteine in older people with elevated homocysteine concentrations.** Br J Nutr 103: 1629-1634, 2010.
140. Sharma P, Garg G, Kumar A, Mohammad F, Kumar SR, Tanwar VS, Sati S, Sharma A, Karthikeyan G, Brahmachari V, Sengupta S. **Genome wide DNA methylation profiling for epigenetic alteration in coronary artery disease patients.** Gene. 2014 May 10;541(1):31-40
141. Yang XL, Tian J, Liang Y, Ma CJ, Yang AN, Wang J, Ma SC, Cheng Y, Hua X, Jiang YD. **Homocysteine induces blood vessel global hypomethylation mediated by LOX-1.** Genet Mol Res. 2014 May 16;13(2):3787-99
142. Kim CS, Kim YR, Naqvi A, Kumar S, Hoffman TA, Jung SB, Kumar A, Jeon BH, McNamara DM, Irani K. **Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc.** Cardiovasc Res. 2011 Dec 1;92(3):466-75.
143. Zhang D, Chen Y, Xie X, Liu J, Wang Q, Kong W, Zhu Y. **Homocysteine activates vascular smooth muscle cells by DNA demethylation of platelet-derived growth factor in endothelial cells.** J Mol Cell Cardiol. 2012 Oct;53(4):487-96.
144. Yideng J, Jianzhong Z, Ying H, Juan S, Jinge Z, Shenglan W, Xiaoqun H, Shuren W. **Homocysteine-mediated expression of SAHH, DNMTs, MBD2, and DNA hypomethylation potential pathogenic mechanism in VSMCs.** DNA Cell Biol. 2007 Aug;26(8):603-11.
145. Wei L, Liu S, Su Z, Cheng R, Bai X, Li X. **LINE-1 hypomethylation is associated with the risk of coronary heart disease in Chinese population.** Arq Bras Cardiol. 2014 May;102(5):481-8

146. M. Barton. **Cholesterol and atherosclerosis: modulation by oestrogen.** *Curr Opin Lipidol* 24 (2013) 214-220.
147. Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, Milliken EE, Issa JP. **Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system.** *Cardiovasc Res.* 1999 Sep;43(4):985-91.
148. Kim J, Kim JY, Song KS, Lee YH, Seo JS, Jelinek J, Goldschmidt-Clermont PJ, Issa JP. **Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence.** *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jan;1772(1):72-80
149. Min J, Weitian Z, Peng C, Yan P, Bo Z, Yan W, Yun B, Xukai W. **Correlation between insulin-induced estrogen receptor methylation and atherosclerosis.** *Cardiovasc Diabetol.* 2016 Nov 10;15(1):156.
150. Niu PP, Cao Y, Gong T, Guo JH, Zhang BK, Jia SJ. **Hypermethylation of DDAH2 promoter contributes to the dysfunction of endothelial progenitor cells in coronary artery disease patients.** *Transl Med.* 2014 Jun 16;12:170
151. Li LC, Dahiya R. **MethPrimer: designing primers for methylation PCRs.** *Bioinformatics.* 2002 Nov;18(11):1427-31
152. Peng P, Wang L, Yang X, Huang X, Ba Y, Chen X, Guo J, Lian J, Zhou J. **A preliminary study of the relationship between promoter methylation of the ABCG1, GALNT2 and HMGCR genes and coronary heart disease.** *PLoS One.* 2014 Aug 1;9(8):e102265.
153. García-Cardona MC, Huang F, García-Vivas JM, López-Camarillo C, Del Río Navarro BE, Navarro Olivos E, Hong-Chong E, Bolaños-Jiménez F, Marchat LA. **DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin resistance.** *Int J Obes (Lond).* 2014 Nov;38(11):1457-65.
154. Hossain MB, Li H1, Hedmer M, Tinnerberg H1, Albin M, Broberg K. **Exposure to welding fumes is associated with hypomethylation of the F2RL3 gene: a cardiovascular disease marker.** *Occup Environ Med.* 2015 Dec;72(12):845-51.

155. Xu L, Zheng D, Wang L, Jiang D, Liu H, Xu L, Liao Q, Zhang L, Liu P, Shi X, Wang Z, Sun L, Zhou Q, Li N, Huang Y, Le Y, Ye M, Shao G, Duan S. **GCK gene-body hypomethylation is associated with the risk of coronary heart disease.** Biomed Res Int. 2014;2014:151723.
156. Pink M, Ratsch BA, Mardahl M, Durek P, Polansky JK, Karl M, Baumgrass R, Wallner S, Cadenas C, Gianmoena K, Floess S, Chen W, Nordstroem K, Tierling S, Olek S, Walter J, Hamann A, Syrbe U. **Imprinting of Skin/Inflammation Homing in CD4+ T Cells Is Controlled by DNA Methylation within the Fucosyltransferase 7 Gene.** J Immunol. 2016 Oct 15;197(8):3406-3414.
157. Li LC, Dahiya R. **MethPrimer: designing primers for methylation PCRs.** Bioinformatics. 2002 Nov;18(11):1427-31