



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Médicas y Odontológicas y de la Salud

Facultad de Química

Investigación Clínica Experimental en Salud

Bioquímica Clínica

“Evaluación del haplotipo de riesgo para lupus eritematoso sistémico localizado en la región Xq28 y su papel en la metilación del ADN en pacientes pediátricos”

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q. FELIPE MUÑOZ GONZÁLEZ

Director de tesis

Dra. Cecilia Contreras Cubas

Instituto Nacional de Medicina Genómica

(INMEGEN)

Ciudad Universitaria, CDMX. Octubre 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	9
1.1. Lupus Eritematoso Sistémico	9
1.2 Diagnóstico Clínico de Lupus Eritematoso Sistemico	9
1.3 Epidemiología	10
1.5 Características Clínicas	11
1.6 Etiopatogenia	11
1.7 Características genéticas de LES	12
1.7.2 Haplotipo de riesgo Xq28	15
1.7.2.1 Cinasa Asociada al Receptor de Interleucina-1: IRAK1	16
1.7.2.2 Proteína de Unión a sitios CpG Metilados: MECP2	17
1.7.2.2.1 MeCP2 como regulador de la transcripción.	18
1.8 Epigenética de LES: Metilación de ADN en LES	20
2. Hipótesis	22
3. Justificación	22
4. Objetivos	22
4.1 Objetivo General	22
4.2 Objetivos Particulares	22
5. Metodología	23
5.2 Población de estudio	23
5.2.1 Criterios de inclusión	23
5.2.2 Criterios de exclusión	23
5.3 Extracción de ADN	23
5.4 Discriminación alélica por sonda TaqMan	24
5.5 Protocolo del microarreglo Infinium DNA Methylation 450k de Illumina	24
5.6 Análisis Bioinformático de los Datos Obtenidos	24
5.6.1 Análisis del estado de metilación en las posiciones genómicas	24
5.6.2 Filtrado y normalización de datos con el paquete ChAMP (“The Chip Analysis Methylation Pipeline”)	25
5.6.3 Análisis de sitios CpGs o DMPs	25
5.6.4 Análisis de las Regiones Diferencialmente Metiladas (DMRs)	26

5.6.5	Análisis de Enriquecimiento de Vías.....	27
5.6.6	Corrección por tipo celular	27
6.	RESULTADOS	28
6.1	PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	28
6.2.	CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS PACIENTES	28
6.3	Resultados Globales.....	29
6.4	Comparativo entre HomC vs HomNC (mixto).....	30
6.4.1	Controles de Calidad	30
6.4.2	RESULTADOS ANÁLISIS DE SITIOS CpGs o DMPs.....	32
6.4.3	DISTRIBUCIÓN DE SITIOS CpG o DMPs	34
6.4.4	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO JERARQUICO NO SUPERVISADO	35
6.4.5	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DMRs.....	35
6.4.6	ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE VÍAS	37
6.4.7	CÁLCULO DE POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA	38
6.5	Comparativo HomC vs HomNC (mujeres).....	42
6.5.1	Controles de Calidad	42
6.5.2	RESULTADOS ANÁLISIS DE SITIOS CpG O DMPs	43
6.5.3	DISTRIBUCIÓN DE SITIOS CpG O DPMs	45
6.5.4	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO JERARQUICO NO SUPERVISADO	46
6.5.5	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DMRs.....	47
6.5.6	ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE VÍAS	48
6.5.7	CÁLCULO DE POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA	51
6.6	Comparativo HetC vs HomNC (mujeres)	54
6.6.1	Controles de Calidad	54
6.6.2	RESULTADOS ANÁLISIS DE SITIOS CpG O DMPs	55
6.6.3	DISTRIBUCIÓN DE SITIOS CpG o DPMs	57
6.6.4	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO JERARQUICO NO SUPERVISADO	58
6.6.5	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DMRs.....	58
6.6.6	ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE VÍAS	58
6.6.7	CÁLCULO DE POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA	58
7.	DISCUSIÓN	61
7.1	DISCUSIÓN DE RESULTADOS GLOBALES.....	61
7.2	GRUPO HomC vs HomNC (MIXTO)	62

7.3 GRUPO DE HomC vs HomNC (MUJERES)	68
7.4 GRUPO DE HetC VS HomNC (MUJERES)	74
8. CONCLUSIONES	76
9. PERSPECTIVAS	76
10. REFERENCIAS	77

Abreviaturas

ACTG1: Actin Gamma 1 (Gama actina 1)
ACTN2: Actinin Alpha 2 (Alfa actina 2)
AK090788: Long Non-Coding esiRNA AK090788
AK093114: Long Non-Coding esiRNA AK093114
AMPc: Adenosin Monofosfato ciclico
BAFF: B-Cell-Activating Factor (Factor de activación de células B)
BMIQ: Beta-Mixture Quantile Normalisation method
BST2: Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2
CCDC105: Coiled-Coil Domain-Containing Protein 105
CD3: Clúster de Diferenciación 3
CD40: Clúster de diferenciación 40
CD40L: Ligando de CD40
ChAMP: The Chip Analysis Methylation Pipeline: Algoritmo para análisis de la metilación en microarreglos
CI: Complejos Inmunes
CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMN: Célula Mononuclear
CREB: AMPc Responsive Element Binding Protein
CTNNA1: catenin alpha 1 (alfa catenina 1)
CXorf21: Chromosome X Open Reading Frame 21
FCERIA: IgE Fc Receptor Subunit Alpha
GO: Gene Ontology (Ontología Genica)
HetC: Heterocigote Carrier (Portador Heterocigoto)
HLA: human leukocyte antigens (Antígenos leucocitarios humano)
HomC: Homocigote Carrier (Portador Homocigoto)
HomNC: Homocigote Carrier (NoPortador Homocigoto)
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1
IFI44L: Interferon-Induced Protein 44-Like
IFN-1: Interferón tipo 1
IFN- γ : Interferón gamma
IFN- α : Interferón alfa
IGF1R: (Insulin-like growth factor 1 receptor)
IL-7: Interleucina-7
IRAK1: Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1 (quinasa 1 asociada al receptor de interleucina-1)
IRF5: Factor regulador del interferón 5
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
lncRNA: RNA largo no codificante
MAPK: mitogen-activated protein kinase (proteína quinasa activada por mitogenos)
MBD: Methyl binding domain (Dominio de unión a metil)
MECP2: Methyl-CpG Binding Protein 2 (Proteína 2 de unión a CpG Metilado)
Min: minuto
MMP9: metalo-peptidasa 9 de matriz
mRNA: RNA mensajero

MX1: MX dynamin like GTPase 1
MyD88: Myeloid Differentiation Primary Response 88
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLRC5: NLR Family CARD Domain Containing 5
NR3C4: Androgen nuclear receptor variant 2
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man
PD-1: Proteína de muerte celular programada 1
PDE10A: Phosphodiesterase 10A
PDGFRA: platelet derived growth factor receptor alpha
PLSCR1: Phospholipid Scramblase 1
PSMA1: Proteasome 20S Subunit Alpha 1
PSMD14: Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 14
QKI: QKI, KH Domain Containing RNA Binding
RA: Reactivo Analítico
RFWD2: E3 ubiquitin-protein ligase RFWD2 isoform α
SDHAP3: Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A pseudogene 3
SHFM1: Split-Hand/Foot Deformity 1
SLC1A6: Solute Carrier Family 1 Member 6
SLEDAI: Systemic Lupus erythematosus disease activity index
SNV: Single Nucleotide Variant
STAT1: Transductor de señales y activador de la transcripción
THRB: Thyroid hormone receptor beta
TLR: Receptor tipo toll
TMEM187: Trans-membrane Protein 187
UBE2L3: Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 L3
UCSC: Universidad de California en Santa Cruz
VCL: Codificante de Vinculina
VGLL3: Vestigial Like Family Member 3
WT1: Proteína tumoral de Wilms 1
ZAP-70: Zeta Chain of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70

Índice de Figuras

Figura 1. Haplotipo Xq28.

Figura 2. Vías de señalización de TLRs en donde participan IRAK4/IRAK1.

Figura 3. Representación esquemática del gen MECP2 humano.

Figura 4. MECP2, función dual en la regulación génica.

Figura 5. Desregulación de citocinas en el Síndrome de Rett.

Figura 6. Resultados Globales de Metilación HomC vs HomNC (Mixto)

Figura 7. Resultados Globales de Metilación HomC vs HomNC (Mujeres)

Figura 8. Resultados Globales de Metilación HetC vs HomNC (Mujeres)

Figura 9. Control de calidad en muestras estudiadas por microarreglos HomC vs HomNC (Mixto).

Figura 10. Distribución de la metilación HomC vs HomNC (Mixto).

Figura 11. Heat Map con análisis de agrupamiento no supervisado HomC vs HomNC (Mixto).

Figura 12. Poblaciones celulares calculadas HomC vs HomNC (Mixto).

Figura 13. Control de calidad en muestras estudiadas por microarreglos HomC vs HomNC (Mujeres).

Figura 14. Distribución de la metilación HomC vs HomNC (Mujeres).

Figura 15. Heat Map con análisis de agrupamiento no supervisado HomC vs HomNC (Mujeres).

Figura 16. Poblaciones celulares calculadas HomC vs HomNC (Mixto)

Figura 17. Control de calidad en muestras estudiadas por microarreglos HetC vs HomNC (Mujeres)

Figura 18. Distribución de la metilación HetC vs HomNC (Mujeres).

Figura 19. Poblaciones celulares calculadas HetC vs HomNC (Mixto).

Figura 20. Zona génica de CCDC105 anotada el en ensamble GRCh37 - hg19.

Figura 21. Zona génica de PSOARSIC3 anotada el en ensamble GRCh37 - hg19.

Figura 22. Zona génica del gen LOC102723373 anotada el en ensamble GRCh37 - hg19.

Figura 23. Reconocimiento antigénico THC-TCR implicado en metilación Homc vs HomNC (Mujeres).

Figura 24. Mecanismo general de Presentación antigénica.

Índice de Tablas

Tabla 1. Criterios de diagnóstico definidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) para el diagnóstico de LES.

Tabla 2. Genes asociados a LES que se asocian de manera diferente según el sexo del portador.

Tabla 3. Descripción de la Cohorte de 24 pacientes pediátricos con LES.

Tabla 4. 20 CpGs con la mayor metilación diferencial HomC vs HomNC (Mixto).

Tabla 5. DMRs para el grupo portador HomC vs HomNC (Mixto).

Tabla 6. Vías enriquecidas con los genes identificados diferencialmente metilados en el grupo HomC vs HomNC (Mixto).

Tabla 7. Lista general de enfermedades representadas con los genes identificados diferencialmente metilados en el grupo HomC vs HomNC (Mixto).

Tabla 8. Lista de enfermedades específicas enriquecidas con los genes identificados diferencialmente metilados en el grupo HomC vs HomNC (Mixto).

Tabla 9. Poblaciones celulares calculadas por paciente de LESp de los grupos HomC y HomNC (Mixto).

Tabla 10. Resumen de las poblaciones celulares calculadas del comparativo HomC vs HomNC (mixto) de LESp.

Tabla 11. 20 CpGs con la mayor metilación diferencial HomC vs HomNC (Mujeres).

Tabla 12. Regiones genómicas diferencialmente metiladas (DMR) HomC vs HomNC (Mujeres).

Tabla 13. Vías enriquecidas con los genes identificados diferencialmente metilados en el grupo HomC vs HomNC (Mujeres).

Tabla 14. Lista de enfermedades específicas enriquecidas con los genes diferencialmente metilados identificados en el grupo HomC vs HomNC (Mujeres).

Tabla 15. Lista de enfermedades generales enriquecidas con los genes identificados diferencialmente metilados identificados en el grupo HomC vs HomNC (Mujeres).

Tabla 16. Lista de Gene Ontology (Ontología Genética) de los genes identificados diferencialmente metilados en el grupo HomC vs HomNC (Mujeres).

Tabla 17. Poblaciones celulares calculadas por paciente de LESp de los grupos HomC y HomNC (mujeres).

Tabla 18. Resumen de las poblaciones celulares calculadas del comparativo HomC vs HomNC (mujeres) de LESp.

Tabla 19. Lista de sitios CpGs con la mayor metilación diferencial HetC vs HomNC (Mujeres).

Tabla 20. Poblaciones celulares calculadas por paciente de LESp de los grupos HetC y HomNC (mujeres).

Tabla 21. Resumen de las poblaciones celulares calculadas del comparativo HetC vs HomNC (mujeres) de LESp.

1. Introducción

1.1. Lupus Eritematoso Sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónico-degenerativa, la cual se caracteriza por la producción de autoanticuerpos que reconocen diversas estructuras celulares como el núcleo, proteínas, lípidos y componentes del citoplasma, además del ADN. Dentro de estos autoanticuerpos destacan los anti-ADN de doble cadena (ds-DNA, por sus siglas en inglés: double stranded DNA) y los antinucleares (ANAs)¹ que son utilizados en la clínica como parte importante en el diagnóstico de esta enfermedad. Se considera que la gran diversidad de cuadros clínicos que se pueden presentar en LES se debe en gran parte a esta gran variedad de auto-anticuerpos.²

El LES se presenta de manera más común en mujeres que en hombres, con una relación mujer:hombre de 9:1 en adultos³. Sin embargo, esta relación varía a lo largo de la vida, ya que se reporta una relación 4:3 cuando el inicio se da en la primera década de la vida, cambiando a 4:1 en la segunda década, para pasar a 9:1 en la etapa adulta como es principalmente conocido en LES, para finalmente disminuir a una relación 5:1 cuando el inicio se da después de los 50 años^{4,5}.

De acuerdo con la edad de inicio de la enfermedad, el LES se clasifica en LES pediátrico (LESp) cuando el individuo debuta con la enfermedad antes de los 16 años, y LES adulto (LESa) cuando la enfermedad se manifiesta después de esta edad. La diferencia en la presentación, evolución clínica y manifestaciones inmunológicas entre pacientes con LESP y LESa es mínima, siendo los síntomas focalizados en daño renal y del sistema nervioso los que presentan mayor complicación en los pacientes pediátricos, presentándose generalmente con un curso clínico más graves en estos⁶.

En cuanto a LES en la población mexicana, aún y cuando existen escasos estudios, Coronado-Alvarado y colegas han reportado que los pacientes con LESP presentan un mayor número de síntomas como mayor daño renal, mayor lesión cutánea, vasculitis, daño pulmonar y cardiovascular, además de un mayor número de infecciones en comparación con los pacientes adultos. Otra característica importante es que los niños reciben más fármacos durante el tratamiento y su mortalidad es mayor con respecto a la de los adultos⁷.

1.2 Diagnóstico Clínico de Lupus Eritematoso Sistemico

Los criterios para diagnosticar a una persona con LES se basan en los 11 criterios establecidos en 1997 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR por sus siglas en inglés: American College of Rheumatology). Para que una persona sea diagnosticada con LES debe de presentar 4 de estos 11 criterios, donde uno de ellos debe de ser la presencia de anticuerpos ANAs. Los criterios se enlistan en la **Tabla 1**.

Criterio	Características
Eritema malar	Eritema fijo, plano o alto, sobre las eminencias malares, que no suele afectar a los surcos nasogenianos.
Eritema discoide	Placas eritematosas con descamación queratósica adherente, puede haber cicatrices atróficas.
Fotosensibilidad	Erupción cutánea a causa de una reacción exagerada a la luz solar.
Úlceras orales	Úlceración nasofaríngea, por lo común indolora.
Artritis	Artritis no erosiva que afecta a dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por dolor a la palpación.

Serositis	<ul style="list-style-type: none"> • Pleuritis: claro antecedente de dolor pleurítico, frote o signos de derrame pleural. • Pericarditis: comprobada por electrocardiograma, frote o signos de derrame pericárdico.
Transtornos renales	<ul style="list-style-type: none"> • Proteinuria persistente mayor a 0.5 g/día o mayor de 3. • Cilindros celulares: pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.
Transtornos neurológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Convulsiones: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; p. ej., uremia, cetoacidosis, desequilibrio electrolítico. • Psicosis: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; p. ej., uremia, cetoacidosis, o desequilibrio electrolítico
Transtornos hematológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia hemolítica: con reticulocitosis • Leucopenia: menos de 4,000/mm³ en dos o en más ocasiones • Linfopenia: menos de 1,500/mm³ en dos o más ocasiones • Trombocitopenia: menos de 100.000/mm³ en ausencia de fármacos que produzcan esta alteración
Transtornos inmunológicos	<p>Anti-ADN: título anormal de anticuerpos contra ADN nativo, o bien:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anti-Sm: presencia de anticuerpos contra antígeno nuclear Sm • Hallazgo positivo de anticuerpos antifosfolípidicos (AFL) basado en: <ul style="list-style-type: none"> - Nivel sérico anormal de anticuerpos anticardiolipina IgG o IgM - Resultado p+ositivo para anticoagulante lúpico utilizando un método estándar, o - Falso positivo en pruebas serológicas de sífilis (VDRL), que persiste por lo menos durante 6 meses y se confirma por pruebas de Treponema pallidum o prueba de absorción de anticuerpo treponémico fluorescente (FTA-Abs)
Anticuerpos antinucleares (ANAs)	Un título anormal de ANA (>1/320) por inmunofluorescencia o análisis equivalente en cualquier momento y en ausencia de medicamentos relacionados con el síndrome de lupus de origen farmacológico

Tabla 1. Criterios de diagnóstico definidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) para el diagnóstico de LES.

Aunque los criterios de la ACR siguen siendo la base del diagnóstico, también hay que señalar que se han realizando actualizaciones a estos, incluyendo la actividad del LES, como por ejemplo la realizada en el 2012 por el grupo Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC), en la cual se validaron los criterios de clasificación de la ACR y que resultó en un menor número de diagnósticos erróneos, también se mejoró su sensibilidad (97% SLICC vs 83% ACR) pero tuvo una menor especificidad (84% SLICC vs 96% ACR)⁸.

1.3 Epidemiología

Entre el 10 al 20% de los pacientes con LES son diagnosticados en la niñez y en la etapa juvenil (≤ 16 años)⁹. En comparación con los pacientes con LESa, en los pacientes con LESp hay una mayor prevalencia de síntomas clínicos graves, como nefritis lúpica (NL), afectación neuropsiquiátrica y citopenias^{10,11} y debido a esto hay una mayor mortalidad asociada¹². La incidencia anual reportada para LESp en el programa de salud MEDICAID de EE.UU es de 2.22 por 100,000 niños, mientras que la prevalencia reportada en este mismo programa es de 9.73 por 100,000 niños de 3 a 18 años¹³, adicionalmente se reporta que la edad promedio de diagnóstico reportada es de 13 años.¹⁴

En un esfuerzo por establecer la relación entre edad de inicio y las manifestaciones clínicas en pacientes con LES, Webb y colegas estudiaron una cohorte multiétnica, observando que la presencia de los alelos de riesgo de susceptibilidad a LES aumenta la probabilidad de un inicio de la enfermedad en edad pediátrica sobre todo en pacientes afroamericanos (25%), la cual no es significativa en hispanos y europeos americanos¹⁵. Sin embargo, los autores concluyen que se presenta un fenotipo de LES más grave en pacientes con inicio temprano de LES, independientemente del género, origen étnico y la duración de la enfermedad, por lo que el estudio de otros factores además de los genéticos, tales como los epigenéticos de LES en edad pediátrica podrían ser importantes. Por otro lado, en un estudio multiétnico realizado recientemente, se evaluó la asociación de la presencia de loci de riesgo para NL y la aparición de la enfermedad en edad pediátrica y adulta. Los autores generaron dos modelos predictores de riesgo poligénico que consideran loci del sistema del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés: Human Leukocyte Antigen) y sin loci de HLA, observando la mayor asociación en individuos de origen europeo con inicio de la enfermedad en edad pediátrica aplicando el modelo que contiene los loci de HLA (OR=1.55; 95% CI 1.07, 2.25; P=0.03)¹⁶. Lo anterior, sugiere que, si bien la aparición de la enfermedad en la niñez resulta en un curso clínico más grave, e incluso en complicaciones como la NL, existen factores genéticos propios de cada población, así como la interacción genes y medio ambiente que seguramente se ven reflejados en la regulación epigenética.

1.5 Características Clínicas

En un estudio en el que se evaluaron las características clínicas de las principales enfermedades autoinmunes en la población mexicana, se identificaron diferencias regionales en cuanto a la prevalencia de estas, siendo la CDMX y Yucatán las entidades de mayor prevalencia; además se identificó una fuerte influencia de factores socio-ambientales como uso de anticonceptivos, hábito de fumar, deficiencia de vitamina D, infecciones múltiples, obesidad y estatus socioeconómico¹⁷.

La presentación del LESp varía en las poblaciones de acuerdo al origen étnico^{18,19,20,21,22}. Los hispanos, los afroamericanos y los asiáticos presentan una mayor gravedad de la enfermedad, como por ejemplo el daño renal y/o daño en sistema nervioso, en comparación con los pacientes de origen caucásico^{4,23,5}. Cabe mencionar que la mayoría de los datos disponibles a largo plazo provienen de países desarrollados con acceso casi universal a la atención médica y un mayor nivel educativo, ambos vinculados a un mejor resultado. Un estudio reciente de la India ha demostrado una supervivencia a cinco años del 77.5%, que es mucho menor que lo que se informa en los países desarrollados.²⁴

Por otra parte, la manifestación de la enfermedad en edades tempranas sugiere una mayor contribución del componente genético en los casos pediátricos. En un estudio realizado en el Hospital de Especialidades y Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS),²⁵ se evaluaron diferentes factores de riesgo en pacientes mexicanos con LES comparándolos con individuos sanos; los resultados mostraron que los factores genéticos, como el antecedente heredo-familiar de LES o enfermedad de tejido conjuntivo en familiares de primer grado, continúan siendo factores asociados al desarrollo de esta enfermedad.

1.6 Etiopatogenia

Se ha propuesto que el LES se desarrolla principalmente por el reconocimiento de una gran variedad de autoantígenos nucleares por células del sistema inmune, lo cual es el origen del daño tisular. Varios factores ambientales como la exposición a la luz ultravioleta (UV), toxinas, e infecciones conducen a

daño celular, apoptosis y el deterioro del mecanismo de depuración de cuerpos apoptóticos, causando su reconocimiento tanto por el sistema inmune innato como adaptativo.^{26,27,28} Los auto-anticuerpos que reconocen a estos antígenos nucleares derivan en la generación de complejos proteicos llamados complejos inmunes (CI). Un mecanismo deficiente de la eliminación de los CI provoca una deposición de éstos en órganos susceptibles como los riñones.²⁹ También se ha propuesto que la interacción prolongada del sistema inmune con los CI resulta en la aparición de manifestaciones clínicas y un posterior daño tisular, lo cual podría ser provocado por una gran variedad de ácidos nucleicos que pueden activar a los sensores específicos relacionados con la vía del interferón tipo I (IFN-I)³⁰.

Uno de los factores ambientales más importantes es la contaminación ambiental, la cual actúa como factor que predispone al desarrollo del LES. Se ha reportado que en pacientes con LESp existe una asociación entre los puntajes más altos del Índice de Actividad de la Enfermedad del Lupus Eritematoso Sistémico (SLEDAI) y un aumento en la exposición a partículas ambientales³¹. Otro estudio realizado en Canadá encontró que los aumentos en las partículas finas se correlacionan con la presencia de anti-dsDNA y cilindros celulares renales, estas últimas estructuras generadas en procesos patológicos³². También en otros dos estudios canadienses realizados por separado, se encontró que las elevaciones en la contaminación del aire por partículas finas se vinculan con el desarrollo de enfermedades autoinmunes sistémicas, que incluyen dermatomiositis, polimiositis, esclerodermia, LES, Sjögren y enfermedad indiferenciada del tejido conectivo^{33,34}.

1.7 Características genéticas de LES

A la fecha, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés: Genome Wide Association Studies) han identificado más de 100 loci de susceptibilidad para LES, dentro de los que destacan aquellos localizados en genes de la vía del receptor de células B (BCR, por sus siglas en inglés: B Cell Receptor), la vía de señalización de IFN y las proteínas relacionadas con el sistema del complemento. Todas estas vías de señalización son cruciales en la inmunidad inata y se conoce que juegan un papel importante en la patogénesis del LES tanto en niños como en adultos³⁵.

Una característica importante del LESp es la deficiencia de las proteínas del complemento C1, C3 y C4. Pacientes con deficiencia en la proteína del complemento C1 usualmente presentan LES en edades tempranas, en proporciones similares de mujer: hombre, con síntomas graves y manifestaciones cutáneas prominentes³⁶. Algunos defectos en las proteínas C1 están relacionados con mutaciones puntuales, variantes de un solo nucleótido (SNVs, por sus siglas en inglés: Single Nucleotide Variant) y delección génica parcial.^{37,38,39} Más del 90% de los pacientes con deficiencia homocigota de anticuerpos C1q (perteneciente a la familia de proteínas del complemento) presentan síntomas parecidos a LES: 95% con eritema, 42% con glomerulonefritis, y 18% con alteraciones del sistema nervioso central. Adicionalmente, el 70% de los pacientes con deficiencia de C1q presentan títulos elevados de anticuerpos.

El marcado predominio femenino de esta enfermedad se atribuyó inicialmente a las hormonas sexuales como variantes en los genes *FCERIA*, Osteopontina, *HLA-1*, *HLA-2*, *IRF5*, *TLR7*, *TLR8*, *UBE2L3*, *NR3C4*, *IRAK1*, *MECP2*, *KIAA1542* y *CXorf21* que se expresan de manera diferencial entre sexos (**Tabla 2**). Por otra parte, entre los factores endógenos que predisponen a LES encontramos algunos genes relacionados con la presentación de antígenos como los del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), genes relacionados con apoptosis, genes relacionados con la función de linfocitos T y B y los que tienen relación con la expresión de citocinas y el complemento^{40,41,42}.

Por otra parte, Armstrong y colegas presentaron nuevos hallazgos de SNVs localizadas en los genes *KLRG1*, interleucina 16 (*IL-16*), receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo T, receptor tipo toll *TLR-8* y *CASP-10*, asociados tanto a LESa como a LESp.⁴³ Sin embargo, no todos los genes de riesgo reportados en LESa han sido validados en LESp. Por ejemplo, en el estudio realizado por Kisiel y colegas, el alelo C de la variante genética rs2234693 localizada en el gen del receptor de estrógeno 1 (*ESR1*) se asoció con LESp, mientras que el alelo A de rs4986938 del gen *ESR2* mostró una asociación con LESa⁴⁴. Otras variantes como la N673S localizada en P-selectina (*SELP*) y la variante C203S localizada en la cinasa asociada al receptor interleucina-1 (*IRAK1*) mostraron una asociación significativa con LESp⁴⁵. De manera similar, la variante genética localizada en el promotor (GT)_n del gen *HMOX1* y las variantes -308G/A y -238G/A del factor de necrosis tumoral alfa (*TNF-α*), se asociaron con inicios de LES en la infancia en una población mexicana^{46,47}. En la tabla 2 se muestran algunos genes que se han asociado a LES que se expresan de manera diferencial de acuerdo con el sexo del portador.

Gen	Cromosoma	Función	Expresión por genero	Referencia
<i>FCERIA</i>	1q23	Juega un papel importante en asma y enfermedades alérgicas	Femenino	48
<i>SPP1</i>	4q22	Involucrado en formación ósea y en sistema inmune	Masculino	49
<i>HLA-1</i>	6p21	Presentación de antígenos endógenos	Masculino	50
<i>HLA-2</i>	6p21	Presentación de antígenos exógenos	Masculino	50
<i>IRF5</i>	7q32	Regula producción de IFN. Activado por las rutas de TLR y MyD88.	Masculino	50
<i>TLR7</i>	Xp22	Reconocimiento viral ssRNA, inducción de IFN tipo 1.	Preferentemente Masculino	51, 52
<i>TLR8</i>	Xp22	Reconocimiento viral ssRNA, inducción de IFN tipo 1.	Femenino	52,53
<i>UBE2L3</i>	22q11	Participa en las funciones del sistema inmune y señalización de hormonas sexuales.	Preferentemente femenino	54, 55
<i>NR3C4</i>	Xq12	Participa en señalización de hormonas sexuales	Preferentemente femenino	56
<i>IRAK1^a</i>	Xq28	Participa en sistema inmune y mecanismos epigenéticos	Preferentemente femenino	57
<i>MECP2^a</i>	Xq28	Participa en mecanismos epigenéticos	Preferentemente femenino	58
<i>KIAA1542</i>	11p15	Posiblemente en respuesta a IFN	Femenino	50, 59
<i>CXorf21</i>	Xp21	Desconocido	Preferentemente femenino	60

Tabla 2. Genes asociados a LES que se expresan de manera diferente según el sexo del portador. Se describen sus funciones. Tomada y adaptada de Christou *et al*⁶¹. IFN: interferón; ssRNA: RNA de cadena simple. ^a Forman un bloque en desequilibrio de ligamiento.

En LES, varios genes relacionados con el sistema inmune se expresan diferencialmente entre sexos. Fan H. *et al.* reportaron que la expresión de 26 genes en las células B está regulada negativamente en mujeres con LES en comparación con los hombres con LES⁶¹. Es importante destacar que tres de los genes mencionados por Fan (*LTF*, *CAMP* y *DEVA4*) están implicados en la respuesta inmune y son

regulados negativamente después del tratamiento con estrógenos en ratones⁶¹. También un estudio de perfil de expresión, Kosmara *et al.* identificaron seis genes que se expresaron diferencialmente en hombres con LES en comparación con mujeres con LES, pero no en hombres sanos versus mujeres sanas, destacando un papel potencial en el dimorfismo sexual de la enfermedad⁶².

Recientemente, se descubrió que el factor de transcripción VGLL3 está regulado positivamente en mujeres con LES en comparación con pacientes masculinos con LES. Este factor regula la expresión de varios genes que participan en el desarrollo de LES, como *BAFF*, *MMP9*, *IL-7* e *ICAM-1*, y promueve respuestas de IFN-I a través de mecanismos independientes de las hormonas sexuales femeninas⁶³. En cuanto al papel que juegan las hormonas en el desarrollo del LES, existe evidencia de un bucle de retroalimentación entre el estrógeno (E2) y los IFNs, lo que resalta la complejidad de los mecanismos reguladores. Por ejemplo, en ratones hembra *NZB * NZW F1* propensos a lupus, IFN- α o IFN- γ actúan de forma sinérgica con el estrógeno para aumentar la expresión de estradiol y los genes que responden al IFN, lo cual sugiere que tanto los genes inducibles por IFN como los estrógenos tienen un papel patogénico en LES⁶⁴.

Por otro lado, el gen *IRF5*, que está asociado con un mayor riesgo de desarrollo de LES tanto en hombres como en mujeres, presenta una sobre-expresión en ratones propensos a lupus, tanto en condiciones basales como después del tratamiento con estrógenos regulando, a su vez, la expresión de IFN-I⁶⁵.

Cabe resaltar que varios genes de la vía de señalización de la vía de IFN-I se han asociado de manera significativa a LES. El IFN-I derivado de células inmunes innatas tiene un papel principal en una serie de enfermedades autoinmunes sistémicas.⁶⁶ En un estudio en el que se realizó un análisis de microarreglos de expresión en células mononucleares de sangre periférica (CMNs) de pacientes con LESp se observó que > 95% de los niños con LES presentaban 15 genes significativamente sobre-regulados, de los cuales 14 son genes relacionados a la vía de IFNs, corroborando así el importante papel que juegan los IFNs en la patogénesis del LES⁶⁷. Si bien los IFN-I pueden activar al sistema inmune adaptativo, los autoanticuerpos derivados de células B y los complejos inmunes, también pueden estimular las células dendríticas plasmacitoides (CDp) para producir IFN-I.⁶⁸

La actividad del IFN- α sérico es un factor de riesgo hereditario del LES y se ha sugerido una interacción génica entre la tirosina cinasa 2 (*TYK2*)⁶⁹ y el factor regulador del interferón 5 (*IRF5*). Por su parte, *TYK2* se une al complejo receptor para la señalización del IFN-I, mientras que *IRF5* induce la expresión génica del IFN-I y está situado en la vía transmisora de señales a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés: Pattern Recognition Receptors) como los receptores tipo Toll y NOD relacionados a infecciones virales y bacterianas.

De manera interesante, en un estudio realizado en población mestiza mexicana, nuestro grupo de trabajo reportó un haplotipo localizado en *IRF5* con una asociación significativa (OR=10.46) para LES, observando que este haplotipo se encuentra en las frecuencias más elevadas a nivel mundial en mestizos mexicanos y aún más elevada en indígenas del grupo étnico Mazateco⁷⁰. Por otro lado, estudios de meta-análisis realizados con estudios de microarreglos de expresión a partir de CMNs de pacientes con LES, muestran una fuerte expresión del IFN-I. Así, la gran asociación entre LES y los genes de la vía de IFN sugiere que la respuesta del hospedero frente a la infección viral puede ser importante en la patogenia de LES⁷¹.

1.7.2 Haplotipo de riesgo Xq28

En un estudio multiétnico, Kaufman y colegas reportaron un haplotipo de riesgo para LES, conformado por SNVs localizadas en la región Xq28, la cual se encuentra conformada principalmente por los genes *MECP2* e *IRAK1*^{72,73}. Esta región resulta de especial interés ya que estos dos genes se encuentran involucrados en mecanismos importantes en la etiopatogenia del LES como son la metilación de ADN y cambios en histonas que afectan la conformación de la cromatina, así como la vía de IFN-I, la cual es clave en la respuesta inmune innata^{57,58}. En un estudio realizado en nuestro grupo de trabajo, observamos que en la población mexicana la estructura del haplotipo difiere de la previamente reportada por Kaufman en población hispana, en la cual el haplotipo está conformado principalmente por los genes *TMEM187*, *MECP2* e *IRAK1*, mientras que, en la mestiza mexicana esta formado por SNVs localizadas principalmente en los genes *IRAK1* y *MECP2* (Fig. 1).

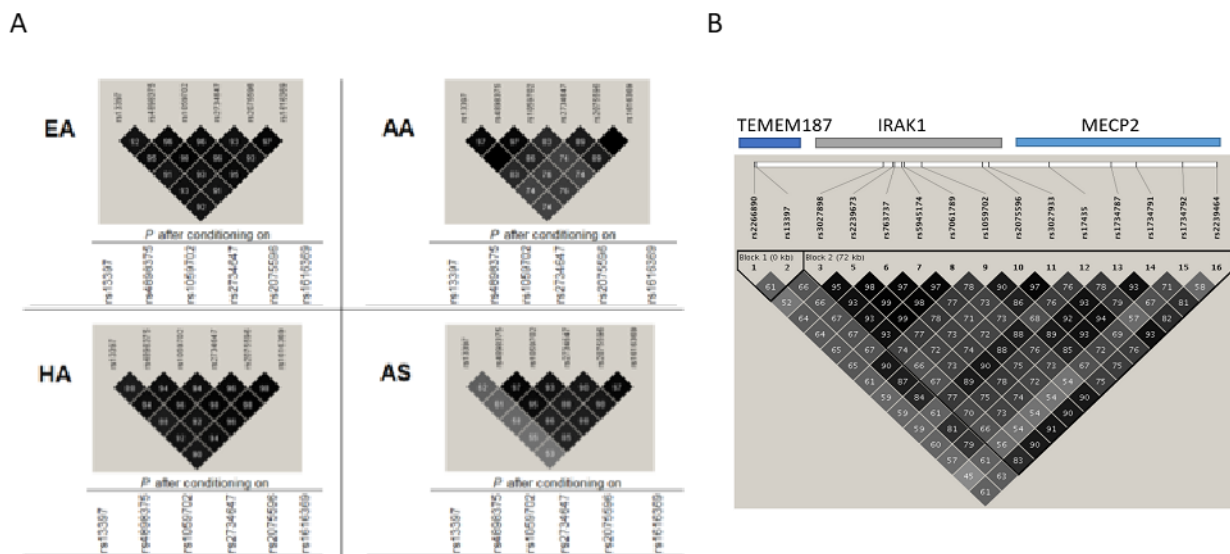


Figura 1. Estructura genética del haplotipo de riesgo Xq28. A. Gráfica de disequilibrio de ligamiento calculado por Kaufman y colegas en 4 de cuatro grupos étnicos hispanos (HA), afro-americanos (AA); asiáticos (AS) y europeo-americanos (EA); tomada y modificada de ⁷⁴. B. Gráfica de LD en la población mexicana, el haplotipo de riesgo Xq28 para LES se localiza principalmente en los genes *IRAK1* y *MECP2*.

Lo anterior pudiera ser un reflejo de la ancestría específica de la población mexicana, consecuencia de una selección positiva de estos alelos como parte de eventos como epidemias, llevando a la fijación de estos alelos como se ha observado para otro alelos en genes de la respuesta inmune en la población mexicana^{70,75}.

De manera interesante, Kaufman y colegas encontraron que los individuos portadores del haplotipo de riesgo presentan una disminución en la expresión de ARNm de la isoforma 2 de *MECP2* en células T^{57,74}, lo cual se podría reflejar en cambios en la metilación de ADN, característico en pacientes con LES, ya que *MECP2* juega un papel preponderante en este mecanismo. En pacientes mexicanos se encontró un resultado similar. Adicionalmente, en estudios en los que se utilizaron ratones transgénicos para *MECP2*, los cuales presentan el gen *MECP2* humano completo y expresan MeCp-2 a niveles de aproximadamente 2 veces más con respecto al del tipo silvestre, se determinó el impacto de la sobreexpresión de este en la regulación epigenética. En particular se ha demostrado que la

sobreexpresión de MECP2 altera la expresión génica en las células T estimuladas. Esto incluye la sobreexpresión de Eif2c2 que regula la expresión de múltiples microRNAs (como miR-21) y la histona desmetilasa Jhdm1d.⁵⁷

Por su parte, Kaufman y colegas identificaron que el alelo menor de la SNV rs1059702, localizada en *IRAK1*, resulta en una sustitución de serina por fenilalanina en el aminoácido 196. Previamente, se documentó que esta sustitución incrementa la actividad de NF- κ B in vitro, al observarse un incremento de la autofosforilación de IRAK1⁷⁶. Cabe destacar que el alelo menor de rs1059703 (L532S), localizado en el exón 12 de *IRAK1*, también confiere un incremento en la actividad de NF- κ B in vitro,⁷⁶ y que los alelos menores de rs1059702 y rs1059703, se han asociado con desarrollo de sepsis⁷⁷ y un mayor riesgo de esclerosis sistémica⁷⁸.

1.7.2.1 Cinasa Asociada al Receptor de Interleucina-1: IRAK1

Las cinasas asociadas al receptor de interleucina-1 (IRAK) son una familia de cinasas serina/treonina que son componentes clave para la vía de señalización de los TLRs y del receptor de interleucina-1 (IL-1R)⁷⁹, las cuales son fundamentales en la respuesta a patógenos por la vía de IFN-I, ante el reconocimiento de un patrón molecular asociado a patógenos (PAM, por sus siglas en inglés: Pathogen-Associated Molecular patterns). Existen cuatro miembros en la familia IRAK, pero solo IRAK1 e IRAK4 tienen actividad de cinasa. Tras la unión del agente patógeno a TLR / IL-1R, el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) es reclutado rápidamente e IRAK1 interactúa con este a través de su dominio de muerte. La unión a MyD88 une IRAK1 con IRAK4 y facilita la fosforilación de IRAK1 por IRAK4 en la treonina-209 (Thr-209) y Thr-387, permitiendo así la autofosforilación de IRAK1. Posteriormente, IRAK1 hiperfosforilado, se disocia del complejo receptor de MyD88. Esta disociación es una condición previa para la señalización río abajo, que eventualmente activa a NF- κ B y la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK)⁸⁰ (Fig. 2).

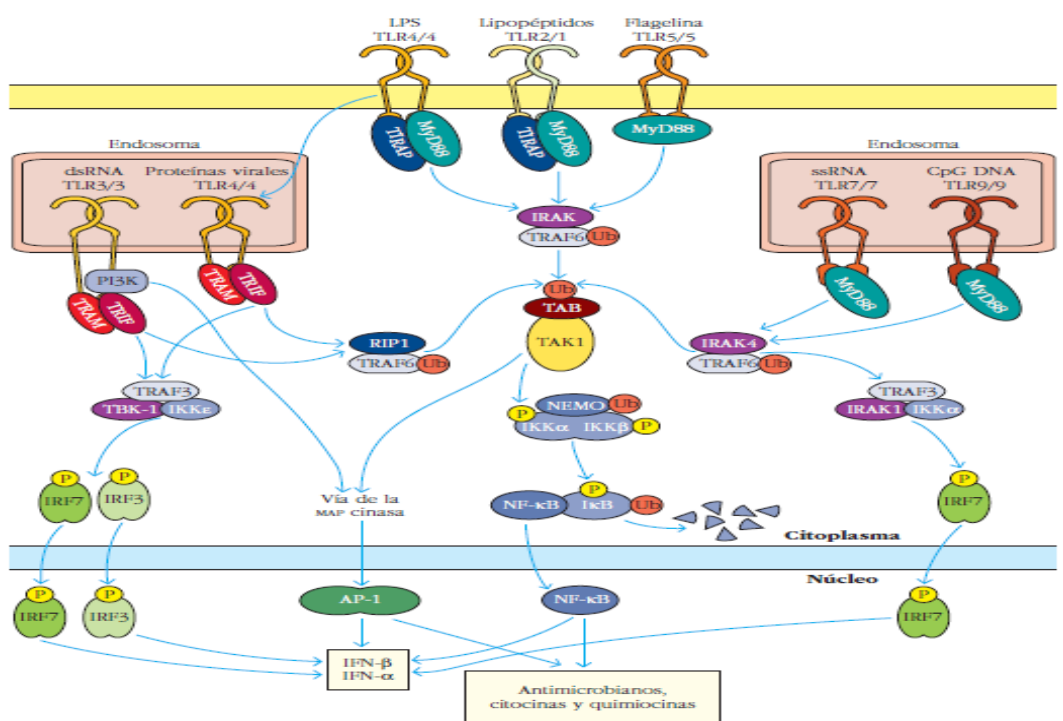


Figura 2. Vías de señalización de TLRs en las que participan IRAK1/IRAK4. Existe una gran variedad de agentes patógenos reconocidos por el sistema inmune innato a través de la vía de los TLRs. Ante la unión de un agente patógeno específico, se desencadena una respuesta específica. Adaptada de Kuby. Immunology. 7 Ed.⁸¹

Se conoce que la desregulación de TLR/IL-1R puede dar lugar a afecciones patológicas que van desde inflamación crónica hasta trastornos autoinmunes^{79,80}. Por su parte, IRF7 induce la transcripción de genes que codifican para los dos IFN-I, IFN- α e IFN- β , los cuales presentan una potente actividad antiviral. Así, diferentes TLRs pueden activar de modo diferencial factores de transcripción como son NF- κ B, ciertos IRF, o los activados por la vía de MAPK, lo que conduce a proteger contra agentes patógenos invasores.

Como se ha mencionado anteriormente, varios estudios independientes han reportado la asociación a riesgo para LES de SNVs localizadas en el gen *IRAK1*, lo que sugiere un papel crítico de este gen en la patogénesis del lupus^{82,83}. Sin embargo, son aún escasos los estudios funcionales. En este aspecto, Li y colegas investigaron la funcionalidad de IRAK1 principalmente en términos de vías relacionadas con NF- κ B en un modelo murino de lupus⁸⁴. Por otra parte, al evaluar la expresión y actividad de IRAK1 en pacientes con lupus, Zhou y colegas determinaron que la expresión de IRAK1 se asocia positivamente con la producción tanto de células Th17 así como IL-17A en pacientes. Asimismo, cuando las células T CD4 + vírgenes se polarizaron hacia el subconjunto Th17, la inhibición de IRAK1 reprimió significativamente la producción de IL-17A y la expresión génica de los marcadores Th17⁸⁵. Estos resultados, sugieren que las células Th17 y la citocina IL-17 contribuyen de manera importante a la etiología del lupus^{86,87,88,89}.

1.7.2.2 Proteína de Unión a sitios CpG Metilados: MECP2

La proteína de unión a metil-CpG 2 (MECP2) se descubrió como una proteína que se une de manera selectiva al ADN metilado⁹⁰. Variantes localizadas en el gen *MECP2* se identificaron como el principal factor causante del Síndrome de Rett, un trastorno neurológico progresivo grave que afecta casi exclusivamente a las mujeres⁹¹. Aunque el papel de MECP2 ha sido ampliamente estudiado en tejidos nerviosos, aún se sabe poco sobre su función y distribución específica en otros tejidos.

MeCP2 participa en el proceso de regulación transcripcional mediada por la metilación del ADN, y este proceso puede ocurrir de dos maneras: (i) la presencia de una metil-citosina en el sitio de unión de factores de transcripción específicos que dificulte la interacción de estos con el ADN blanco; (ii) los sitios CpG metilados pueden actuar indirectamente, mediante el reclutamiento de proteínas con dominio de unión al ADN metilado (MBD, por sus siglas en inglés: Methyl Binding Domain), como MeCP2^{92,93}. Estas proteínas inducen un estado represivo de la cromatina mediante el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACs, por sus siglas en inglés: Histone Deacetylase), ADN-metiltransferasas (DNMTs, por sus siglas en inglés: DNA Methyltransferase) y otros factores de inhibición de la cromatina que aumentan su condensación y evitan la transcripción^{94,95}.

MeCP2 fue la primera proteína en la que se describió que el dominio MBD se podía unir con alta afinidad a un solo par de sitios metil-CpG^{92,90}. Los estudios *in vitro* mostraron que la unión de alta afinidad de MeCP2 al ADN metilado requiere cuatro o más secuencias A/T adyacentes a los sitios metil-CpG de unión⁹⁶. MeCP2 también contiene: (i) un dominio TRD (por sus siglas en inglés: Transcriptional Repression Domain) mediante el cual ocurre el reclutamiento del complejo represor de la transcripción Sin3-histona desacetilasa⁹⁷ (ver **Figura 3A**); (ii) un dominio con señal de localización nuclear (NLS, por

sus siglas en inglés: Nuclear Localization Signal); y (iii) un dominio C-terminal que participa en las interacciones con el ADN y residuos proteicos⁹⁸ (**Fig. 3**).

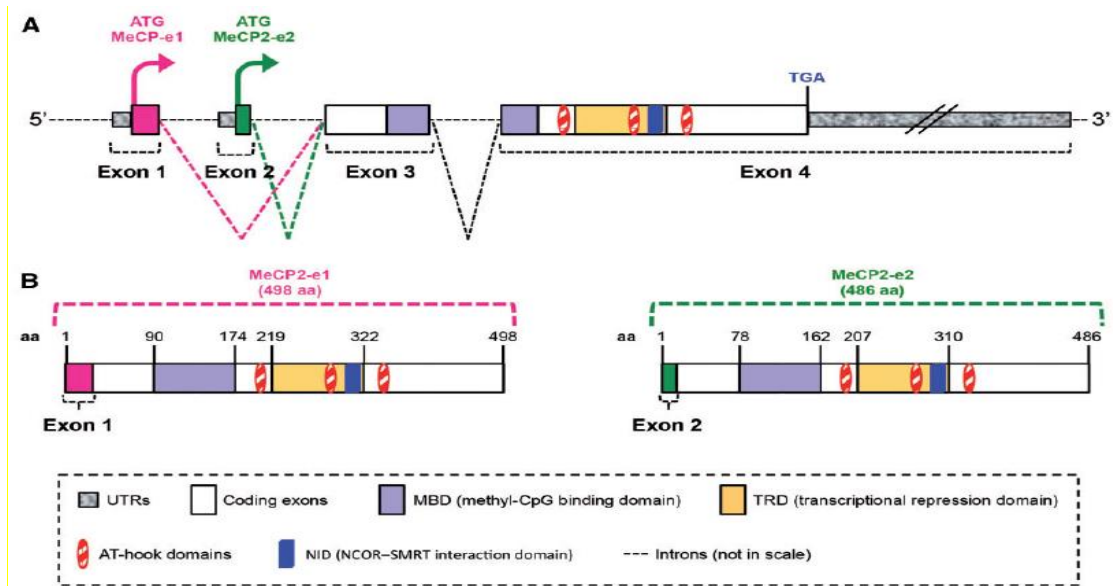


Figura 3. Representación esquemática del gen MECP2 humano. (A) Principales variantes proteicas: MeCP2-e1 (498 aminoácidos) y MeCP2-e2 (486 aminoácidos), producido por empalme alternativo (B). Las dos variantes difieren en su porción N-terminal, que incluye el exón 1 (MeCP2-e1) o el exón 2 (MeCP2-e2). Se representan los principales dominios de MeCP2 y se indica la posición de aminoácidos (aa) de MBD⁹⁹ y TRD¹⁰⁰ para ambas variantes de empalme. Imagen adaptada de¹⁰¹.

Como se mencionó anteriormente, el gen *MECP2* se encuentra localizado dentro de la región Xq28 y está sujeto a la inactivación del cromosoma X en mujeres^{102,103}. Este gen contiene cuatro exones, que codifican dos isoformas de proteínas que se producen mediante empalmes alternativos: MeCP2-e1 (es decir, MECP2B o MeCP2a) y MeCP2-e2 (es decir, MECP2A o MeCP2b). Estas isoformas de empalme difieren en sus regiones N-terminales, aunque incluyen los dos dominios principales, es decir, MBD y TRD. La isoforma más abundante es MeCP2-e1, que incluye el exón 1, mientras que el inicio de la traducción de la isoforma MeCP2-e2 está en el exón 2^{104,105,106} (**Figura 3B**). Cabe mencionar que las dos isoformas MeCP2-e1 y MeCP2-e2 son ubicuas, aunque sus niveles de expresión son más elevados en cerebro⁹⁸.

1.7.2.2.1 MeCP2 como regulador de la transcripción.

Varios estudios describen las interacciones de MeCP2 con represores transcripcionales, lo que ha indicado fuertemente la participación de MeCP2 en el silenciamiento génico^{107,108} (**Fig. 4A**). Sin embargo, la evidencia ha revelado que MeCP2 no funciona solamente como represor transcripcional global.

Los estudios de expresión génica realizados en subregiones cerebrales específicas, es decir, hipotálamo y cerebelo, han revelado cambios en los niveles de expresión de un gran número de genes, la mayoría de los cuales parecen estar regulados positivamente por MeCP2 (**fig. 4B**)^{109,110,111}.

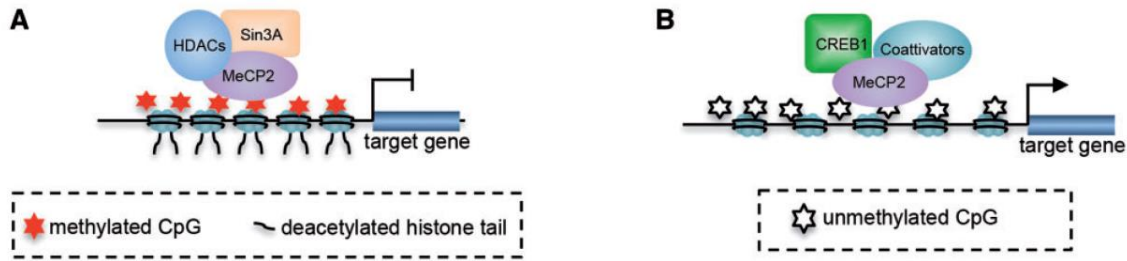


Figura 4. Función dual de MECP2 en la regulación génica. Existe evidencia de su interacción con diferentes complejos regulatorios. (A) MeCP2 media el silenciamiento transcripcional a través de la unión con CpG metilados y el reclutamiento de un complejo que contiene HDAC^{108,112}. (B) MeCP2 activa la transcripción de genes diana en regiones específicas del cerebro y diferentes tipos celulares^{109,110,111}. Imagen adaptada de¹⁰¹.

Estas funciones opuestas podrían explicarse por las interacciones de MeCP2 con cofactores que tienen funciones alternativas, como con la proteína CREB (por sus siglas en inglés: cAMP Response Element-Binding), para la activación transcripcional y con el complejo HDAC/Sin3A (interruptor independiente 3A), para la represión génica¹¹³ (**Figura 4A y 4B**). Sin embargo, una gran cantidad de estudios han respaldado la idea de que la función principal de MeCP2 está relacionada con la represión transcripcional⁹⁷.

En cuanto a la relación de MeCP2 con el sistema inmune, se ha documentado la presencia de un estado proinflamatorio subclínico, previamente no reconocido en el Síndrome de Rett, en ausencia de otras fuentes causales. Lo anterior, aunado a la desregulación sistémica del estrés oxidativo en esta enfermedad^{114,115}, sugieren que MeCP2 es un jugador clave en la regulación de la diferenciación de células Th1, las respuestas mediadas por Th1^{116,117} y la resistencia de las células T reguladoras a la inflamación¹¹⁸. Además, la evidencia emergente indica que la deficiencia de MeCP2 podría conducir a una desregulación de las citocinas, incluidas las citocinas relacionadas con los macrófagos, en ratones nulos de *Mecp2*¹¹⁹ y en niñas con síndrome de Rett¹²⁰ (**Fig. 5**).

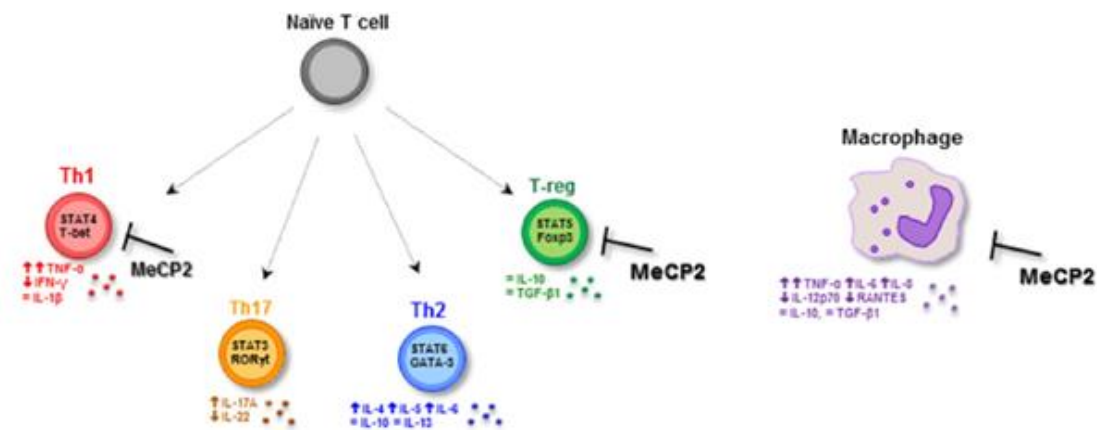


Figura 5. Desregulación de citocinas en el Síndrome de Rett. Los efectos moduladores de MeCP2 se mencionan en Miralvès J. *et al.*¹²¹ y sus referencias. Leyendas: Th1, T helper 1 cell; Th2, célula T helper 2; Th17, célula T helper 17; T-reg, célula T-reguladora. El símbolo ↓, ↑ o = indica una disminución, un aumento o un valor sin cambios significativos de la citocina

examinada frente a los valores de sujetos sanos examinados. Figura adaptada de Felice CD, et al, Rett syndrome: An autoimmune disease?^{122,139-141}. Imagen adaptada de¹⁰¹.

1.8 Epigenética de LES: Metilación de ADN en LES

Existe una creciente evidencia sobre el importante papel que juegan los procesos epigenéticos, como la metilación del ADN, la modificación de histonas y el ARN no-codificante en la patogénesis del LES. En lo que respecta a la metilación de ADN, existen dos características distintivas del metiloma de pacientes con LES, en los que se ha puesto más atención por su relevancia: el primero es la hipometilación del ADN en ciertos genes que llevan a la activación sostenida de la respuesta inmune, y el segundo es la reactivación del cromosoma X inactivo en mujeres.

En LES se han estudiado diferentes alteraciones epigenéticas que repercuten en la función de las células inmunes. Los primeros datos sobre la participación de eventos epigenéticos en LES se generaron investigando las alteraciones a los patrones de metilación del ADN¹²⁸. La evidencia más fuerte que apoya el papel causal de la metilación del ADN en LES proviene de la comparación directa de gemelos discordantes monocigóticos para el desarrollo de LES, que revelaron 49 regiones que exhiben hipometilación del ADN en individuos con LES en comparación con sus gemelos sanos¹²⁹. En otro estudio de Sullivan y colegas¹³⁰, encontraron que la tasa de concordancia para LES en gemelos monocigóticos es del 25% pero solo del 2% en los gemelos dicigóticos, lo que refuerza la idea de que los factores genéticos por sí solos no explican el fenotipo del LES.

Asimismo, las posibles causas de la disminución de la metilación del ADN en las células inmunes de pacientes con LES son múltiples, y estas se apoyan en el estudio de factores ambientales, factores individuales (predisposición genética, edad y actividad enzimática relacionada, dieta, etc.), medicación (p. ej., fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad afectan la metilación del ADN como ciclofosfamida), etc¹³¹⁻¹³³.

Se ha documentado que los pacientes con LES presentan un estado de hipometilación del ADN específico en genes relacionados con la regulación del sistema inmune, así como la expresión anormal de genes relacionados con la metilación. En particular se ha observado una regulación negativa de la ADN metiltransferasa-1 (DNMT1, por sus siglas en inglés: DNA Methyltransferase 1) y de la proteína con dominio de unión-4 a sitios CpG metilados (MBD4, por sus siglas en inglés: Methyl-CpG-Binding Domain Protein 4), y una sobre expresión de MBD2 y MeCP2 en células T CD4+¹³⁴. El estado general de hipometilación en pacientes con LES se reportó de manera inicial en genes específicos de linfocitos T y B, y recientemente se documentó que los linfocitos T CD4 + pero no los CD8 + de pacientes con LES muestran hipometilación de genes en comparación con los controles sanos^{135,136}. El grado de hipometilación se puede correlacionar con la actividad de la enfermedad, y numerosos genes sensibles a la metilación se sobre-expresan en las células T de lupus CD4+, genes de citocinas (IL4¹³⁷, IL6¹³⁸, IL10 e IL13¹³⁹) y moléculas co-estimuladoras (CD70/CD26L¹⁴⁰, CD6¹⁴¹, CD11A¹⁴² y CD40L/CD154¹⁴³). De manera interesante, la hipometilación del ligando CD40 se ha propuesto como un factor de riesgo para LES, así como la de otros genes asociados con la inactivación del cromosoma X en células T CD4+.¹⁴⁴

El papel de las modificaciones epigenéticas en la patogenia del LES fue sugerido por la sobreexpresión de factores tales como la función de los linfocitos antígeno 1 (LFA-1), perforina, CD70 y CD40LG, debido a que se encontró un estado de desmetilación del ADN en la secuencia promotora de estos genes en pacientes con LES. Además, se ha reportado una reducción del contenido de 5-metilcitosina en linfocitos T de pacientes con LES^{145 146 147 144 148}, indicando una relación entre un estado de hipometilación del ADN específico y algunas formas de esta enfermedad autoinmune.

Los eventos epigenéticos han sido implicados en el aumento de la expresión de genes asociados a la respuesta de IFN-I. Un estudio de asociación de epigenoma completo, en el que se compararon pacientes con LES con controles sanos, se encontró que el 85% de los genes diferencialmente metilados presentaron reducción en la metilación de sitios CpG, apoyando resultados de otros estudios que describen niveles bajos de metilación en LES¹⁴⁹. Hallazgos similares han sido reportados, demostrando una reducción de la metilación del ADN y una mayor expresión de ARNm de genes asociados con IFN-I en células B, células T, monocitos y granulocitos¹⁴⁹. La metilación reducida de ADN en los sitios CpG de los genes asociados con IFN-I (*MX1*, *IFIT1*, *PLSCR1*, *IFI44*, *PARP9* y *DTX3L*) también está presente en LESp¹⁵⁰, y de manera similar a LES en adultos, contribuye a aumentar los patrones de expresión génica inducida por IFN-I¹⁵¹.

Con respecto a la metilación de células T cooperadoras (Th o Tc), en células Th2, se ha reportado una reducción de la metilación del ADN para el linaje que define el gen *IL-4* en humanos y ratones, mientras que los genes de citocina Th1, exhiben silenciamiento epigenético^{152,153}. En concordancia con estos hallazgos, las células Th17 en humanos y ratones también exhiben patrones de metilación del ADN disminuidos dentro del grupo de genes de citocinas *IL-17* que definen el linaje^{154,155,156}.

Lo anteriormente expuesto, sugiere que el estudio del estado de metilación en LES es de gran relevancia para poder entender los mecanismos epigenéticos que influyen en la patogénesis y la progresión de esta enfermedad. De manera histórica, se ha puesto mayor relevancia en el estudio de LES en los casos cuyo diagnóstico ocurrió en la edad adulta, lo cual se debe a que representan el mayor número de casos, sin embargo, cada vez se pone más énfasis en el estudio de las enfermedades pediátricas. Por otro lado, se ha puesto mayor énfasis en estudios sobre los factores genéticos en la aparición de LES, tanto en edad adulta como en pacientes pediátricos, pero estos no explican en su mayoría los mecanismos de regulación, progresión y sostenimiento que llevan a la aparición y progresión de LES.

2. Hipótesis

Existe un patrón de metilación de ADN diferencial entre pacientes de LESp portadores y no portadores del haplotipo de riesgo Xq28.

3. Justificación

Se ha descrito un haplotipo de riesgo para LES localizado en la región Xq28 que comprende principalmente los genes *MECP2/IRAK1*, el cual cobra relevancia por la función de estos genes. Mientras que *IRAK1* es un gen clave en la respuesta inmune innata, *MECP2* juega un papel determinante en la metilación del ADN. Los individuos portadores del haplotipo de riesgo presentan una disminución significativa en los niveles de expresión del transcrito de *MECP2* con respecto a los no portadores. Lo anterior, toma importancia, ya que se conoce que en los pacientes con LES se presenta un estado de hipometilación gen específico. Por esta razón, en este trabajo se analizó el patrón de metilación entre pacientes con LESp portadores y no portadores del haplotipo de riesgo, para conocer si la presencia de este influye en los patrones de metilación del ADN, y así poder entender más acerca de los procesos epigenéticos relacionados con la metilación que contribuyan a la aparición de LES en edad temprana.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar si existe un patrón diferencial de metilación entre individuos portadores y no portadores del haplotipo de riesgo Xq28 en pacientes con LESp.

4.2 Objetivos Particulares

- Determinar la presencia o ausencia del haplotipo de riesgo en los pacientes con LESp por medio de discriminación alélica.
- Evaluar el patrón de metilación en pacientes con LESp con y sin el haplotipo de riesgo.
- Identificar las zonas diferencialmente metiladas en individuos con y sin el haplotipo de riesgo en pacientes con LESp.
- Establecer las vías de señalización en las que participan los genes diferencialmente metilados mediante programas bioinformáticos.

5. Metodología

5.1 Estrategia del estudio

El presente es un estudio observacional transversal y retrospectivo, en el que se comparará la metilación del ADN de pacientes con LESp portadores homocigotos (HomC) del haplotipo de riesgo Xq28 con pacientes con LESp no portadores del haplotipo (HomNC). También se realizó la comparación con pacientes con LESp portadores del haplotipo Xq28 en forma heterocigota (HetC).

5.2 Población de estudio

Se incluyó un total de 24 pacientes diagnosticados con LESp, los cuales fueron clasificados en tres grupos a partir de la genotipificación de 17 variantes que conforman el haplotipo de riesgo Xq28: 12 homocigotos portadores del haplotipo (HomC:Homozygous Carriers), 6 heterocigotos (HetC:Heterozygous Carriers) y 6 homocigotos no portadores del haplotipo (HomNC:Homozygous NoCarriers). El estudio contó con la autorización de los comités de ética, bioseguridad e investigación del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN S XXI) y del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

5.2.1 Criterios de inclusión

Pacientes mexicanos con LESp diagnosticados antes de los 16 años de edad que cumplieran con al menos 4 de los 11 criterios de la clasificación establecida por la ACR (por sus siglas en inglés: American College of Rheumatology).¹⁵⁷ Los pacientes fueron captados en el CMN S XXI; cada paciente fue evaluado por un médico reumatólogo o inmunólogo, una vez obtenido el consentimiento informado de los padres o tutores del paciente, así como el asentimiento de cada paciente.

5.2.2 Criterios de exclusión

Pacientes con antecedentes de cualquier otra enfermedad crónica concomitante y que recibieran alguna transfusión en los últimos tres meses. También se excluyeron pacientes bajo tratamiento hormonal o cuando la muestra no contara con la calidad deseada de ADN.

5.3 Extracción de ADN

Se llevó a cabo a partir de 5 ml de sangre periférica utilizando el estuche comercial Puregene Blood Core Kit C (Qiagen). Primero, se agregó la solución de lisis RBC (por sus siglas en inglés: Red Blood Cell) a la muestra y así eliminar la mayor cantidad posible de eritrocitos, haciendo los lavados pertinentes para obtener un paquete celular lo más blanco posible. Después se agregaron 3.0 ml de solución de lisis celular WLCB (por sus siglas en inglés: White Cell Lysis Buffer), agitando de manera vigorosa en el vortex. Se agregó 1.0 mL de solución de precipitación de proteínas PPS (por sus siglas en inglés: Precipitation Proteins Solution), mezclando con el vortex por 30 segundos. Se centrifugó a 3500 rpm para recuperar el sobrenadante que contiene el ADN, el cual se transfirió a un tubo de 15 ml para agregar

isopropanol al 100% en una relación 1:1, agitando por inmersión hasta que se observó el aglomerado de ADN en suspensión. Se centrifugó a 3500 rpms durante 15 minutos para obtener el botón de ADN, el cual posteriormente se lavó con etanol al 70% para realizar la deshidratación del botón celular. Se realizó una centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos y se dejó secar el ADN a temperatura ambiente, y posteriormente se resuspendió en 300 µl de buffer TE. Finalmente, se cuantificó la concentración de ADN en el equipo Nanodrop (ND-1000) para la evaluación de la calidad del ADN purificado. Se consideraron valores de absorbancia 230, 260 y 280 nm, calculándose las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 en el rango de 1.8 y 2.0.

5.4 Discriminación alélica por sonda TaqMan

El ensayo de discriminación alélica se realizó mediante la metodología de sonda TaqMan para genotipificación de 17 SNVs: rs2266890 y rs13397 localizadas en *TMEM187*; rs3027898, rs3027901, rs2239673, rs763737, rs3027907, rs5945174, rs7061789, y rs1059702 localizadas en *IRAK1*; y rs2075596, rs3027933, rs17435, rs1734787, rs1734791, rs1734792 y rs2239464 localizadas en *MECP* (Thermo Fisher Scientific). Dicho procedimiento se llevó a cabo mediante la actividad de la 5' exonucleasa de la Taq Polimerasa sobre las sondas específicas para cada alelo, las cuales están marcadas con un fluoróforo específico para cada uno de los alelos de interés. Para una reacción se utilizaron: 25ng de ADN de cada muestra, TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) y la sonda correspondiente SNP Genotyping Assay (40x). Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador ABI PRISM 7900HT y VIIA 7 (Applied Biosystems), utilizando el siguiente termociclaje: Desnaturalización inicial: 95°C por 5 a 10 mn, 30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 30 s; extensión a 72°C por 30s.

5.5 Protocolo del microarreglo Infinium DNA Methylation 450k de Illumina

El protocolo fue realizado por la Unidad de Microarreglos del INMEGEN de acuerdo con lo descrito extensamente en la base UCSC para los procedimientos de *Infinium DNA Methylation 450K*¹⁵⁸. El protocolo consta de una etapa de conversión de bisulfito del ADN genómico, una etapa de hibridación de las microesferas, una etapa de extensión de única base, seguida de lavados múltiples y lectura mediante el sistema *Illumina HiScan System*, el cual usa un láser de excitación para los fluoróforos y un escaneo de alta resolución de la señal de fluorescencia emitida. Al final del proceso, se obtuvieron los archivos IDAT que son generados directamente por el *software Genome Studio* y se utilizan para la normalización de las muestras.

5.6 Análisis Bioinformático de los Datos Obtenidos

5.6.1 Análisis del estado de metilación en las posiciones genómicas

Para este análisis se utilizaron varios paquetes dentro del entorno de programación por línea de comandos de R-Bioconductor, tales como *ChAMP*, *BMIQ*^{159,160,161,162}, los cuales están relacionados con el análisis bioinformático del metiloma utilizando el microarreglo *Infinium Illumina DNA Methylation 450K* y con el manejo de la gran cantidad de datos generados.

5.6.2 Filtrado y normalización de datos con el paquete ChAMP (“The Chip Analysis Methylation Pipeline”)

Las funciones `champ.load()` y `champ.filter()`, ambas del paquete ChAMP, permiten realizar un filtrado de datos que no cubren los criterios de calidad para el análisis, cuyos pasos se detallan a continuación:

- 1) Con el primer filtro se eliminan aquellas sondas con un valor de detección predeterminado $p > 0.01$, utilizando el valor p de detección almacenado en el archivo `.idat`, por lo que con esta información, con la función `champ.import`, se genera una matriz de datos. Se analiza cada sonda, y si el valor de $p > 0.01$, se considera como sonda fallida. De esta manera, se obtiene la fracción de sondas fallidas por muestra. Si alguno de estos valores es alto ($p > 0.1$), se puede considerar eliminar esa muestra del análisis. Si la proporción de sondas fallidas de una determinada muestra está por encima de un umbral particular ($p = 0.1$), esta muestra será descartada del análisis.
- 2) Utilizando ChAMP se filtran las sondas con un valor de número de perlas < 3 (superficie del microarreglo) en al menos el 5% de las muestras por sonda.
- 3) Se filtran todas las sondas que no sean sitios CpG contenidos en su conjunto de datos.
- 4) Con ChAMP se filtran todas las sondas relacionadas con SNVs. La lista SNVs incluidas en este análisis proviene del trabajo de Zhou y colegas en 2016¹⁶³. Esta opción de ChAMP también permite elegir algunas poblaciones reportadas en caso de que conozcamos nuestra población de estudio y este en la base de datos de Zhou.
- 5) Se eliminan las sondas no específicas. Para este fin, por configuración predeterminada, ChAMP filtra todas las sondas no específicas y que hibridan varias veces (multi-hit). La lista de sondas multi-hit proviene del trabajo de Nordlund *et al*¹⁶⁴.
- 6) Se realizó el filtrado de todas las sondas ubicadas en los cromosomas X y Y¹⁶⁵. Es importante señalar que en el presente trabajo cuando se analizan muestras de grupos mixtos se excluyen las sondas en cromosomas sexuales, esto se aplica en el comparativo de la sección 6.2, mientras que se incluyen cuando todas las muestras son del mismo sexo, como en el comparativo en las secciones 6.3 y 6.4 por ser todas las pacientes mujeres.

Finalmente, se utilizó la normalización con el algoritmo `myNorm` de Infinium DNA Methylation 450K que consiste en una normalización al interior de cada microarreglo, en la cual inicialmente se separa la señal de las sondas Infinium tipo I de las sondas Infinium tipo II e igualmente se separa la señal de las sondas que corresponden a forma metilada de las de señal no metilada. Por lo tanto, se evita la interferencia producida por mezclar en la normalización todos los tipos de sondas de la plataforma. Este proceso requiere de los archivos IDAT y ha mostrado controlar posibles variaciones técnicas, sin conllevar a una pérdida de sensibilidad de dicha plataforma de metilación de ADN para el epigenoma humano^{161,166,167,168}.

5.6.3 Análisis de sitios CpGs o DMPs

Los sitios diferencialmente metilados (DMP, por sus siglas en inglés: Differentially Methylated Positions), son el resultado más común al analizar datos de metilación mediante la técnica de microarreglos. Para calcular la metilación diferencial se utiliza la función `champ.DMP()` del paquete CHAMP. Esta función utiliza los valores beta de cada sonda particular y hace la comparación estadística entre los grupos en

los que se quiere determinar el cambio en la metilación. Los valores beta (β) son la estimación del nivel de metilación utilizando la relación de intensidades entre alelos metilados y no metilados: $\beta = M / (M + U + a)$. El valor β se encuentra entre 0 y 1, donde 0 significa un sitio CpG sin metilar y 1, un sitio CpG completamente metilado.

La función `champ.DMP()` implementa el paquete `limma` para calcular el valor p para la metilación diferencial utilizando un modelo lineal. La función `champ.DMP()` hace una comparación de contraste entre dos fenotipos, por ej. HomC vs HomNC. Cada comparación devuelve una matriz de datos que contiene aquellas sondas diferencialmente metiladas de manera significativa. Dentro de los parámetros obtenidos en la matriz de datos se encuentran el valor p, el estadístico t y la diferencia en la metilación media logFC entre dos grupos (sólo para covariables categóricas). También incluye la anotación para cada sonda, el valor beta promedio para el grupo de muestra y el valor beta delta para los dos grupos utilizados en la comparación.

Con la finalidad de conocer la contribución del haplotipo Xq28 en la metilación diferencial del ADN en pacientes con LESp, se presentarán los análisis comparando a los tres grupos portadores (HomC;mixto, HomC;mujeres y HetC) contra el grupo no portador HomNC. De esta forma se evaluará la influencia del haplotipo Xq28 en los perfiles de metilación. El primer comparativo HomC vs HomNC (mixto) ofrecerá el efecto máximo de la presencia del haplotipo, el cual será cuantificado mediante los sitios diferencialmente metilados (DMPs) evaluado mediante gráficas tipo volcán y mapas de calor. También se evaluará con estos CpGs diferencialmente metilados el impacto que pudiera tener en diferentes vías bioquímicas los cambios en la metilación detectados. Lo anterior nos podrá sugerir los cambios clínicos que pudieran derivarse de los cambios en los patrones de metilación.

El mismo análisis será realizado para los otros dos comparativos. Cabe mencionar que en el segundo comparativo, HomC vs HomNC (mujeres), nos podrá ofrecer un panorama más focalizado de los cambios en los patrones de metilación y sus posibles efectos clínicos en el género femenino, en el cual existe un sesgo muy importante en la prevalencia de LES tanto en adultos como en pacientes pediátricos.

Por último, el comparativo HetC vs HomNC (mujeres) nos podrá ofrecer una visión del efecto menor del haplotipo, ya que se esperaría que el efecto en los patrones de metilación sean menores a los de los primeros dos grupos.

5.6.4 Análisis de las Regiones Diferencialmente Metiladas (DMRs)

Las regiones diferencialmente metiladas (DMRs, por sus siglas en inglés: Differentially Methylated Regions) son segmentos extendidos del genoma que muestran una alteración cuantitativa en los niveles de metilación del ADN entre dos grupos. La función `champ.DMR` calcula y da como resultado una matriz de datos de sondas agrupadas en DMRs, con el valor p correspondiente. El número requerido para definir una DMR es de 7 sitios CpG diferencialmente metilados.

Hay tres algoritmos DMR implementados dentro de ChAMP: `Bumphunter` (utilizado por default por ChAMP y el empleado en este trabajo), `ProbeLasso` y `DMRcate`¹⁶⁹. El algoritmo `Bumphunter` primero agrupa todas las sondas en pequeños grupos (o regiones), luego aplica el método de permutación aleatoria para estimar los DMR candidatos. Como resultado, se obtiene una matriz de datos que contiene todos las DMRs detectadas, con su longitud, grupos y número de sitios CpG anotados.

5.6.5 Análisis de Enriquecimiento de Vías

Para realizar el análisis de enriquecimiento de vías, se utilizó la base de datos DAVID¹⁵⁴. Esta base de datos está diseñada en torno al "DAVID Gene Concept", un método basado en la evidencia de la teoría de gráficos para aglomerar identificadores de genes/proteínas específicas de especies y sus anotaciones de una variedad de recursos genómicos públicos (por ejemplo, NCBI, PIR, SWISS-PROT, GO, OMIM, PubMed, KEGG, BIOCARTA, AffyMetrix, TIGR, Pfam, BIND, MINT, DIP, etc.). Agrupa decenas de millones de identificadores de más de 65,000 especies en 1.5 millones de registros únicos de proteínas/genes. La agrupación de dichos identificadores permite la aglomeración de una gran variedad de anotaciones funcionales y de secuencia, lo que enriquece enormemente el nivel de información biológica disponible para un gen dado (por ejemplo, ID de secuencia de genes, dominios funcionales de proteínas, ontología de genes, vías, asociaciones de enfermedades, descripciones generales de genes, interacciones proteína-proteína, literatura, homólogos, etc.).

5.6.6 Corrección por tipo celular

El método de corrección por tipo celular desarrollado por Houseman *et. al*¹⁷⁰. en 2012, se utiliza para inferir las poblaciones celulares de 6 tipos de leucocitos (linfocitos T CD4+, CD8+, linfocitos B, células NK, granulocitos y monocitos) en una muestra de sangre periférica mediante el análisis estadístico de los patrones de metilación detectados mediante el microarreglo de metilación de la marca Illumina. Se identificaron varios DMRs que pueden utilizarse como biomarcadores confiables de los tipos específicos de glóbulos blancos humanos, los cuales pueden ser analizados por separado en cada una de las poblaciones a estudiar. Housman *et al.* implementaron un tipo de calibración por regresión multivariante de alta dimensión para estimar la distribución de glóbulos blancos. También hay que señalar que este método fue posteriormente validado mediante el análisis de los patrones de metilación de células purificadas mediante citometría de flujo.

Este algoritmo se puede utilizar mediante el paquete de R Refbase, el cual está integrado en el pipeline de la librería ChAMP. El paquete arroja una matriz compuesta de valores B corregidos según las poblaciones celulares específicas de cada muestra y corrige en caso de que exista una población celular enriquecida, lo cual podría sesgar el cálculo de la metilación diferencial entre dos grupos que se quieren comparar.

6. RESULTADOS

6.1 PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se incluyeron pacientes con LESp, a los cuales se les determinó el genotipo de 17 SNVs que habían sido previamente asociadas con el riesgo para desarrollar LES. Estas SNVs se localizan en la región Xq28, la cual comprende a los genes *MECP2*, *IRAK1* y *TMEM-187*, conformando un haplotipo. Debido a que el transcrito de *MECP2* se encuentra disminuido en individuos portadores del haplotipo y debido a que es un regulador transcripcional que juega un papel determinante en la metilación de ADN, se decidió evaluar el posible efecto de la presencia del haplotipo Xq28 en los perfiles de metilación del ADN, utilizando un microarreglo de metilación.

6.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS PACIENTES

En el presente trabajo se incluyeron 24 pacientes con LESp, entre 4 y 15 años de edad, todos ellos con ancestría mestiza mexicana. Se incluyó un mayor número de mujeres (75% mujeres) para guardar la mayor proporción del sexo femenino en la presencia de LES, lo cual también permitió realizar un comparativo exclusivo con pacientes femeninos.

De los 24 pacientes con LESp, 12 fueron identificados como portadores homocigotos del haplotipo Xq28 (HomC; edad promedio 10.8 años) de los cuales 50% fueron mujeres; 6 son portadores heterocigotos (HetC; 11.1 años edad promedio) todas mujeres; y 6 son no portadores (HomNC: edad promedio 13.3 años, todas mujeres). No se encontró una diferencia significativa en la edad entre los grupos a comparar ($p < 0.05$).

Código de la Muestra ¹	Sexo	Presencia de Haplotipo Xq28 ²	Edad de Diagnostico
LHomNC-0818-F	Femenino	HomNC	10.6
LHomNC-0896-F	Femenino	HomNC	11.8
LHomNC-0875-F	Femenino	HomNC	14.0
LHomNC-0908-F	Femenino	HomNC	12.3
LHomNC-0932-F	Femenino	HomNC	15.7
LHomNC-0366-F	Femenino	HomNC	15.3
LHetC-0838-F	Femenino	HetC	10.8
LHetC-0854-F	Femenino	HetC	15.3
LHetC-0869-F	Femenino	HetC	4.8
LHetC-0893-F	Femenino	HetC	13.4
LHetC-0917-F	Femenino	HetC	SD
LHetC-0920-F	Femenino	HetC	SD
LHomC-0015-F	Femenino	HomC	11.9
LHomC-0324-F	Femenino	HomC	5.2
LHomC-0851-F	Femenino	HomC	13.3
LHomC-0935-F	Femenino	HomC	13.3
LHomC-1025-F	Femenino	HomC	SD
LHomC-1105-F	Femenino	HomC	14.6

LHomC-1046-M	Masculino	HomC	SD
LHomC-0654-M	Masculino	HomC	4.6
LHomC-1082-M	Masculino	HomC	14.6
LHomC-0718-M	Masculino	HomC	14.0
LHomC-0938-M	Masculino	HomC	15.8
LHomC-0270-M	Masculino	HomC	11.5

Tabla 3. Descripción de la cohorte de 24 pacientes pediátricos con LES. L: LES; HomNC/HetC/HomC, número de muestra y sexo. HomNC (Homocigoto No Portador). HetC (Heterocigoto Portador), HomC (Homocigoto portador). SD: se desconoce.

Los genotipos fueron determinados por medio de la genotipificación de 17 SNVs que conforman al haplotipo Xq28.

6.3 Resultados Globales

Con la finalidad de evaluar el patrón de metilación en pacientes con LESp con y sin el haplotipo de riesgo, se determinaron los perfiles de metilación de ADN obtenido a partir de sangre periférica de tres grupos de pacientes pediátricos con LESp:

- 1) HomC vs HomNC (mixto); pacientes con LESp portadores de haplotipo en forma homocigota vs pacientes con LESp sin el haplotipo. Se incluyen pacientes femeninos y masculinos.
- 2) HomC vs HomNC (mujeres); pacientes con LESp portadores de haplotipo en forma homocigota vs pacientes con LESp sin el haplotipo. Se incluyen solamente pacientes femeninos.
- 3) HetC vs HomNC (mujeres); pacientes con LESp portadores de haplotipo en forma heterocigota vs pacientes con LESp sin el haplotipo. Se incluyen solamente pacientes femeninos.

A continuación, se presentan los resultados para cada uno de los tres grupos en el siguiente orden:

- 1) Controles de calidad de las muestras
- 2) Resultados globales de los valores de Beta
- 3) Sitios CpG con mayor diferencia y su distribución genómica
- 4) DMRs con mayor diferencia obtenidos
- 5) Análisis de enriquecimiento de vías
- 6) Cálculo de poblaciones celulares en sangre

6.4 Comparativo entre HomC vs HomNC (mixto)

El primer comparativo que se realizó fue entre pacientes con LESP portadores de haplotipo en forma homocigota vs pacientes con LESP sin el haplotipo **HomC vs HomNC (mixto)**, en el cual se incluyeron pacientes de ambos sexos.

6.4.1 Controles de Calidad

El procesamiento de los datos se realizó como se describe en la Metodología (secciones 5.4 y 5.9), calculando los valores beta (β) de metilación a partir de los datos crudos en formato IDAT mediante el programa ChAMP. En este paso se descartaron sondas que corresponden a SNVs reportadas en diferentes poblaciones para evitar la variación genética que pudiera influir en la detección de sitios diferencialmente metilados, sitios no CpG. También se eliminaron aquellas sondas que no obtuvieron un valor $p > 0.01$. Después de haber aplicado estos filtros, se eliminaron 77,734 sondas de las 485,512 sondas iniciales, quedando finalmente con 407,778 sondas para los análisis consecuentes.

Posteriormente, se analizó la distribución de los valores β calculados para cada muestra, observando un patrón de distribución de los valores β bimodal, detectando una mayor intensidad en los valores extremos, lo cual es un patrón característico de acuerdo con lo reportado por *Illumina* (**Fig. 9A**). En la figura **Fig. 9 B**, se muestra el gel de integridad de las muestras procesadas y en la figura **Fig. 9 C** el diagrama de escala multidimensional (MDS, por sus siglas en inglés: Multi-Dimensional Scaling) en el que se muestra la similitud de los valores Beta de metilación de cada muestra; los valores cercanos a cero reflejan un nivel de calidad similar entre las lecturas mediante una matriz de proximidad, los valores extremos se consideran anómalos. Debido a que se confirma el valor aberrante de la muestra LHomC-1105 se decidió eliminarla del análisis. Las muestras estudiadas restantes muestran calidad adecuada para los análisis dadas por medianas de intensidades metiladas y no metiladas en el rango esperado.

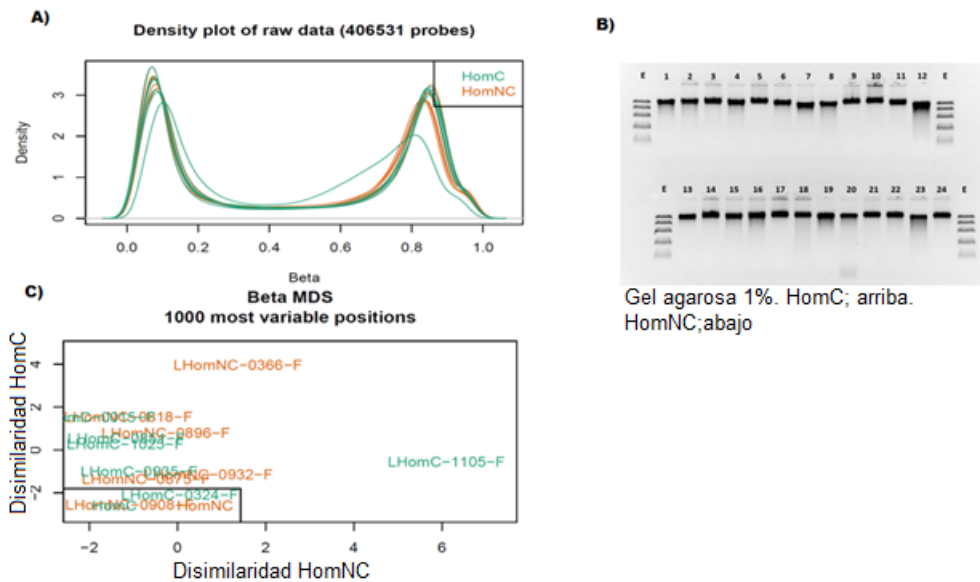


Figura 9. Control de calidad en muestras estudiadas por microarreglos HomC vs HomNC (Mixto). **A)** Gráfica de la distribución de los valores β de las muestras evaluadas mediante el paquete ChAMP. El eje de las abscisas muestra los valores β , equivalentes al nivel de metilación, y el eje de las ordenadas muestra la densidad de sondas del microarreglo en cada nivel de metilación. Se detectó una muestra (LHomC-1105) presenta una distribución atípica de los valores β por lo que se descartó esta muestra. **B)** Gel de agarosa al 1% que muestra la integridad del ADN de las 24 muestras. **C)** Diagrama de Escala multidimensional (MDS; Multi-dimensional scaling) muestra la similitud de los valores Beta de metilación de cada muestra. Los valores cercanos a cero reflejan un nivel de calidad similar entre las lecturas mediante una matriz de proximidad, los valores extremos se consideran anómalos. Se eliminó a la muestra LHomC-1105 del análisis ya que mostró un patrón diferente al resto de las muestras.

Una vez que las muestras presentaron los controles de calidad deseados, se realizó el análisis global de los valores de Beta. En este análisis se evalúa la modificación de los patrones de metilación entre los grupos de comparación. Se observó que tomando los sitios CpG diferencialmente significativos, la comparación los niveles globales de metilación de ADN del grupo LES portador Xq28 (HomC) con el grupo no portador (HomNC) no mostraron diferencias significativas (HomC 0.2178 ± 0.007 SD vs. HomNC 0.5334 ± 0.0755 SD, valor $p > 0.24$) ver **Fig. 6**.

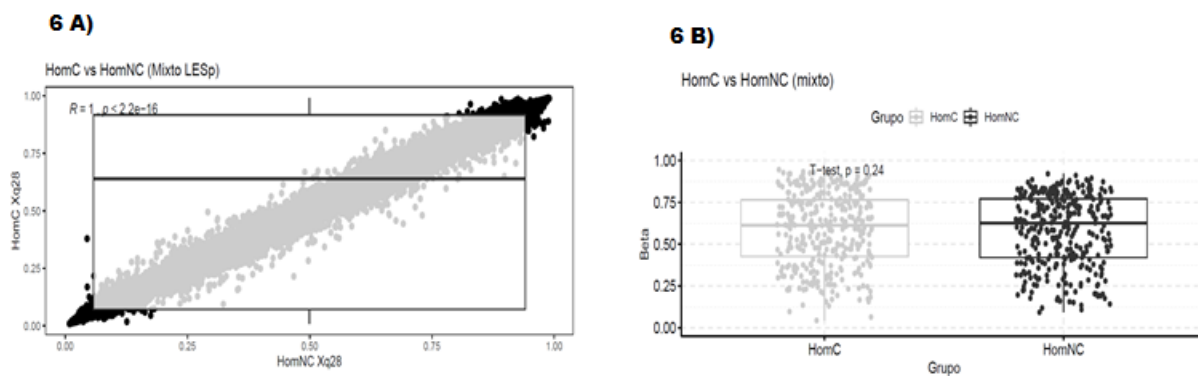


Figura 6. Resultados Globales de valores Beta entre HomC vs HomNC (Mixto). **A).** Scatterplot de los valores beta del grupo LESP HomC vs valores beta del grupo HomNC, en el grupo Mixto (utilizando 406,531 sitios después del filtrado de calidad). El coeficiente de correlación 0.99951 refleja que la metilación global de cada grupo tiene magnitudes similares. **B).** Boxplot comparativo de los valores Beta de metilación entre el grupo portador y no portador del grupo Mixto $p=0.39$, el valor de p no significativo refleja que no hay diferencia significativa en la metilación global entre grupos.

De esta manera, en la **Fig 6** se compara la metilación global en cada grupo y se puede observar que no existen cambios globales en la metilación, o al menos por los detectados por el microarreglo 450K. Se puede entonces mencionar que el haplotipo Xq28 no ejerce un cambio de metilación de ADN de una manera generalizada en el genoma, comparando entre portadores y no portadores del haplotipo en pacientes con LESP, sino que como veremos en las siguientes secciones, se detectan cambios específicos de *loci* concretos que se pueden encontrar enriquecidos en ciertas vías.

6.4.2 RESULTADOS ANÁLISIS DE SITIOS CpGs o DMPs

Posteriormente, se identificaron los sitios CpG que mostraron mayor diferencia en metilación entre los individuos portadores del haplotipo (HomC) y no portadores (HomNC), así como su distribución genómica.

Utilizando los parámetros mencionados en la sección de métodos, con el análisis DMPs, utilizando una gráfica tipo volcán, se obtuvieron **319** sondas diferencialmente metiladas con un valor $p < 0.01$ (**Fig. 7**), las cuales se tabularon en archivo anexo 1 del presente documento (Anexo digital 1).

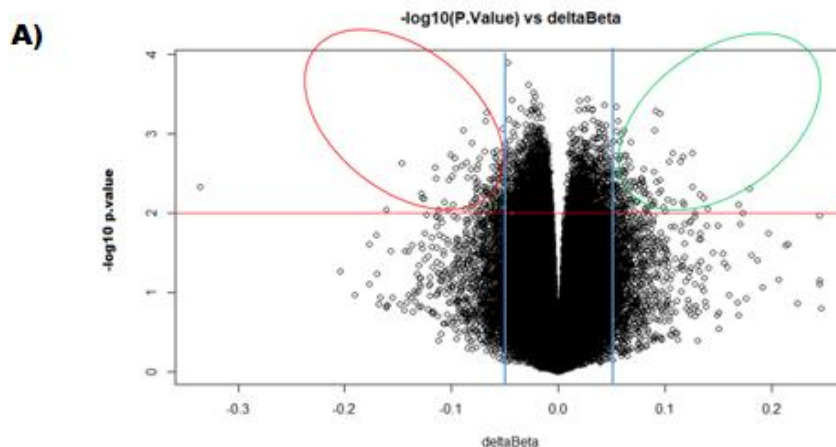


Figura 7. Gráfica tipo volcán en la que se muestra la distribución de los sitios CpGs o DMPs diferencialmente metilados. Los valores positivos de deltaBeta corresponden a los sitios a CpG hipermetilados debido a la presencia del haplotipo Xq28. Los valores negativos corresponden a los sitios hipometilados. La línea roja representa al $-\log_{10}$ del valor de corte $p=0.01$. Los valores positivos reflejan sitios CpG en donde hay un valor Beta mayor en los grupos portadores del haplotipo Xq28, mientras valores negativos reflejan una pérdida en la metilación en el grupo portador, eje de las abscisas. En el eje de las ordenadas se muestran los valores de p del comparativo para cada sitio CpG. Se eligió el valor de $p=0.01$ ($-\log=2$) como valor de corte, esto como un valor más astringente ante el valor de $p=0.05$, el cual podría enmascarar falsos positivos.

Con la finalidad de conocer los sitios que presentaron una mayor metilación diferencial por la presencia del haplotipo de riesgo Xq28, se decidió tomar los 10 sitios con mayor hiper- e hipometilación. En la **tabla 4** se muestran las DMPs con una mayor metilación diferencial, tanto hiper- como hipometiladas, así como información general sobre estos sitios.

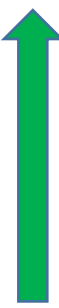
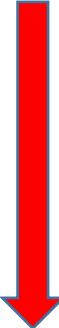
CpG	P. Valor	adj. P.Val	HomNC_AVG	HomC_AVG	Delta Beta	CHR	Gen	Región	CGI	Región-cgi	Sentido de metilación
cg24405174	0.005	0.66	0.48	0.66	0.18	7	PL-5283	TSS1500	shore	TSS1500-shore	
cg26500457	0.008	0.66	0.73	0.90	0.17	11	CRTAM	Body	opensea	Body-opensea	
cg10144400	0.009	0.66	0.36	0.51	0.14	16		IGR	island	IGR-island	
cg16720578	0.006	0.66	0.22	0.35	0.14	14		IGR	shelf	IGR-shelf	
cg05767404	0.006	0.66	0.31	0.44	0.13	1	C1orf150	Body	opensea	Body-opensea	
cg14577707	0.005	0.66	0.61	0.73	0.13	4		IGR	opensea	IGR-opensea	
cg01228271	0.002	0.66	0.72	0.85	0.13	3		IGR	shelf	IGR-shelf	
cg01115380	0.008	0.66	0.34	0.46	0.12	6		IGR	shelf	IGR-shelf	
cg02380802	0.002	0.66	0.50	0.62	0.12	16		IGR	shore	IGR-shore	
cg14883993	0.007	0.66	0.65	0.77	0.12	19	NFIC	Body	opensea	Body-opensea	
cg07194839	0.007	0.66	0.45	0.34	-0.11	10	EBF3	Body	shore	Body-shore	
cg07044276	0.009	0.66	0.76	0.65	-0.11	1		IGR	opensea	IGR-opensea	
cg14785464	0.004	0.66	0.49	0.38	-0.11	21	HLCS	TSS200	island	TSS200-island	
cg15686782	0.003	0.66	0.49	0.38	-0.12	7	MAD1L1	Body	opensea	Body-opensea	
cg07018435	0.007	0.66	0.72	0.59	-0.13	1		IGR	opensea	IGR-opensea	
cg05475109	0.006	0.66	0.32	0.19	-0.13	8		IGR	shore	IGR-shore	
cg08681904	0.006	0.66	0.38	0.25	-0.13	8		IGR	island	IGR-island	
cg15969227	0.002	0.66	0.46	0.31	-0.15	6		IGR	opensea	IGR-opensea	
cg11886187	0.009	0.66	0.22	0.06	-0.16	17		IGR	shore	IGR-shore	
cg22355889	0.005	0.66	0.38	0.04	-0.34	11	ELMOD1	TSS1500	shore	TSS1500-shore	

Tabla 4. 20 CpGs con la mayor metilación diferencial HomC vs HomNC (Mixto). Se muestran los 10 CpGs o DMPs más hiper e hipometilados. La lista completa se puede visualizar en el **Anexo 1**. El análisis se llevó a cabo con el paquete my_DMP de ChAMP. Se detectaron en total 319 DMPs diferencialmente metilados con un cambio mayor al 5%: 160 DMPs hipermetilados y 159 DMPs hipometilados. Flecha Verde: Sitios hipermetilados; Flecha Roja: Sitios Hipometilados. CpG: Sitio CpG. HomNC_AVG: promedio del valor beta del sitio CpG en el grupo No portador homocigoto. HomC_AVG: promedio del valor beta del sitio CpG en el grupo portador homocigoto. Delta Beta: Diferencia aritmética entre el grupo HomC meno HomNC. CHR: Cromosoma. Región: Región dentro del gen. CGI: Región dentro la Isla CpG. IGR: Región Inter Génica.

Se observó una mayor hipermetilación en regiones intergénicas (IGR) (6 de 10 sitios CpG), comportamiento que también se observó en los sitios con mayor hipometilación (flecha roja), en donde 6 de 10 sitios CpGs se encuentran en zonas IGR. Estos cambios en zonas IGR podría sugerir que es estas zonas podrían existir cambios en los patrones de metilación que pudieran tener un impacto en los niveles de transcrito con posible significancia clínica, en donde mayores niveles de transcrito podrían generar sobreproducción de proteína, generando el inicio de proceso patológico. Por el contrario, una disminución en la cantidad de transcrito también podría desencadenar procesos patológicos por pérdida de la función.

6.4.3 DISTRIBUCIÓN DE SITIOS CpG o DMPs

Posteriormente, se determinó la distribución de los sitios CpGs diferencialmente metilados en el genoma. En la **Figura 10 A** se observa la distribución de estos sitios por cromosoma, mientras que en la **Figura 10 B** la distribución de los sitios CpGs en las regiones genómicas.

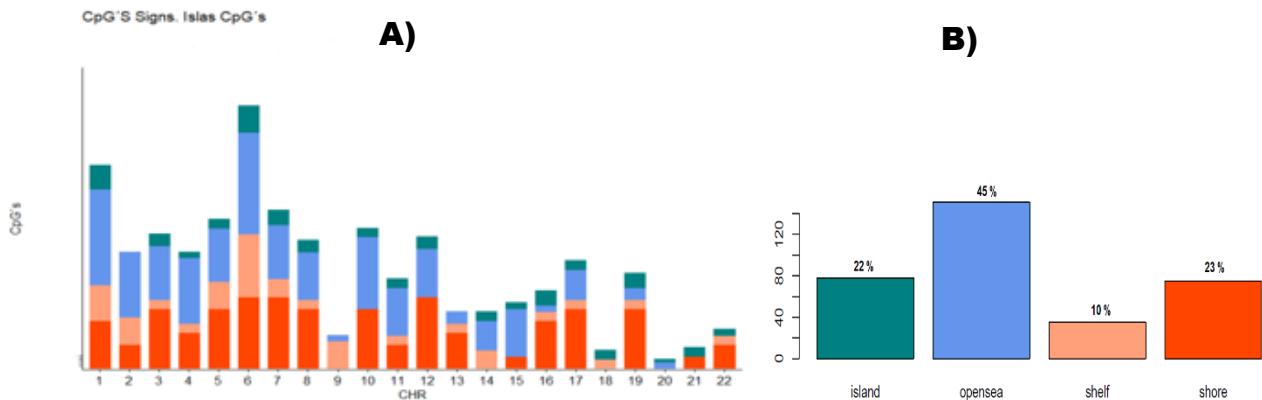


Figura 10. Distribución cromosómica y genómica de los sitios CpG diferencialmente metilados en el comparativo HomC vs HomNC (Mixto). A. Gráfica de barras que muestra la distribución de los sitios CpG o DMPs diferencialmente metilados en los distintos cromosomas, así como su localización con respecto a la isla CpG próxima. Verde: Isla CpG; Azul: Opensea, Marron: Shelf, Rojo: Shore. B) Gráfica de barras que muestra la distribución de los sitios CpG diferencialmente metilados con respecto a la isla CpG próxima. 45% de los cambios se concentran en zonas Opensea, 23% en shore, 22% en zonas island y solo el 10% en zonas shelf.

En cuanto a los cromosomas que presentaron una mayor diferencia en el perfil de metilación, destacó el cromosoma 6, principalmente en las regiones opensea y shore, seguido del cromosoma 1, el cual presenta los perfiles con mayor metilación diferencial en las mismas regiones genómicas. De hecho, este mismo patrón de mayores cambios en la metilación, opensea (45%), shore (23%), island (22%) y shelf (10%), se observan en general en todos los cromosomas. El hecho que la región opensea sea la que presente los mayores cambios de metilación, podría deberse a que esta es una zona con baja densidad de sitios CpG que se encuentran distantes al centro de las islas CpG, las cuales son típicamente más densas. Se podría investigar posteriormente la asociación de estos cambios específicos del estado de metilación de estos CpGs con la regulación en la expresión de transcritos de regiones intergenicas mayormente asociadas con la codificación de RNA largos no codificantes.

Por otro lado, al ser el cromosoma 6 el que presentó el mayor número de sitios con metilación diferencial, resulta interesante ya que este está enriquecido con genes que codifican para el MHC, esenciales en la regulación del sistema inmune.

Cabe mencionar que en el análisis de distribución cromosómica se excluyeron los cromosomas sexuales ya que al incluir tanto pacientes femeninos como masculinos, se evita el sesgo atribuible por la diferencia de sexos.

6.4.4 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO JERARQUICO NO SUPERVISADO

El agrupamiento jerárquico con los **319** sitios CpGs diferencialmente metilados del comparativo HomCvsHomNC identificó 2 grupos principales: los individuos portadores (HomC) y los no portadores (HomNC) del haplotipo Xq28 (**Figura 11**). Se observa que la mayoría de las muestras del grupo no portador HomNC se agrupan a excepción de una muestra (HomNC-0896). Este comportamiento confirma el efecto diferenciador que ejerce el haplotipo Xq28 en los patrones de metilación, en especial se observa un efecto “máximo” en este comparativo como se observará al comparar los siguientes dos comparativos.

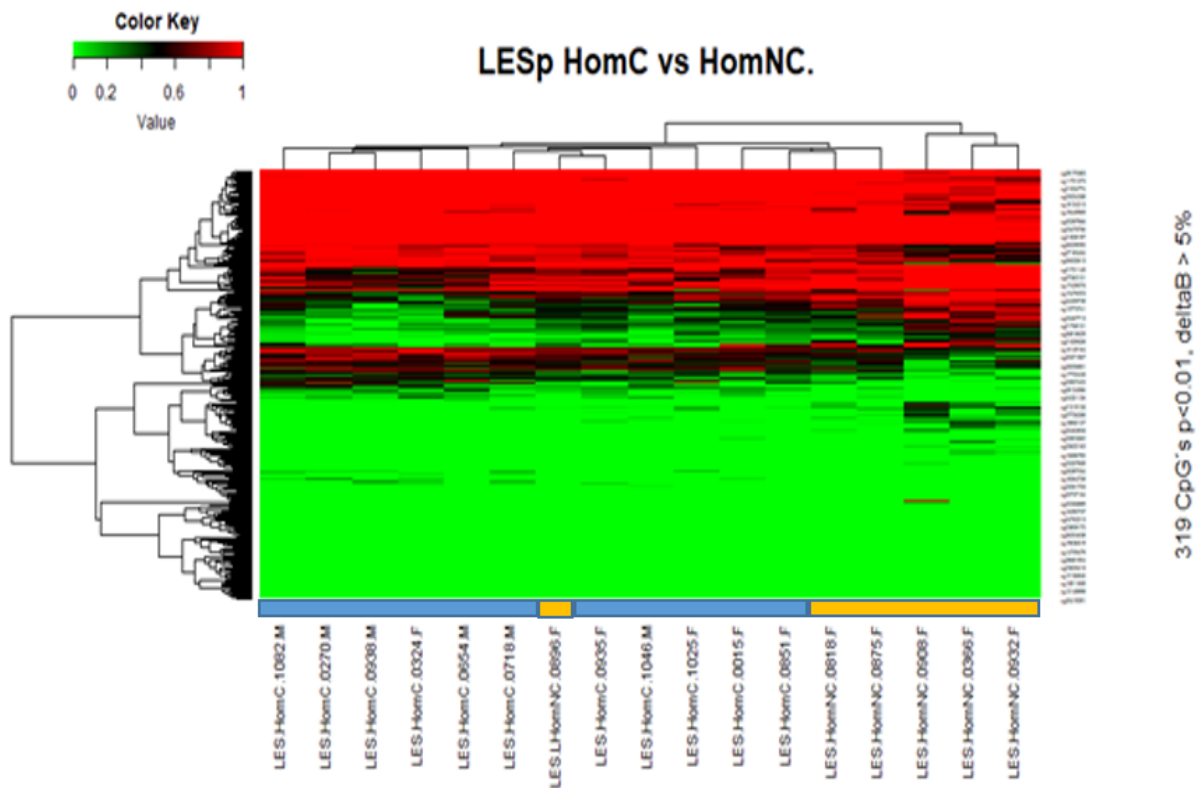


Figura 11. Mapa de calor que muestra el análisis de agrupamiento no supervisado comparando HomC vs HomNC (Mixto). Se muestra el agrupamiento con los 319 sitios CpG diferencialmente metilados entre los portadores (HomC) y no portadores (HomNC) del haplotipo Xq28. En el eje de las abscisas se agrupan las muestras tomando en cuenta las semejanzas y diferencias de cada uno de los sitios CpGs (319) diferencialmente metilados (eje de las ordenadas), de tal forma que representa gráficamente las muestras que se agrupan conjuntamente en función de su metilación. Se realizó la corrección por tipo celular, utilizando el paquete Refbase, para corregir los valores de metilación en función del tipo celular y evitar la sobre representación.

6.4.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DMRs

Una vez que se identificaron los sitios CpG diferencialmente metilados entre el grupo portador HomC y el no portador HomNC, se realizó el análisis de identificación de DMRs de acuerdo con lo explicado en

la sección de la metodología (numeral 5.4.5). No se encontraron DMRs con más de 7 sitios CpGs contiguos, lo cual define a estas regiones, sin embargo, se encontraron DMRs con 3 o más sitios CpG diferencialmente metilados, los cuales se detallan en la **Tabla 5**.

CpG	P. Valor	adj. P.Val	HomNC_ LES_AVG	HomC_ LES_AVG	CHR	MAPINFO	Gen	CGI (ubicación)
cg26842596	0.002	0.661	0.71	0.65	19	15121297	CCDC105	shore
cg12695707	0.002	0.661	0.85	0.76	19	15121333	CCDC105	shore
cg09470638	0.006	0.661	0.83	0.77	19	15121509	CCDC105	shore
cg05923226	0.004	0.661	0.62	0.54	19	15121516	CCDC105	shore
cg03928546	0.002	0.661	0.31	0.26	19	15121591	CCDC105	island
cg17931227	0.002	0.661	0.55	0.50	6	31148370	IGR	island
cg09179646	0.002	0.661	0.63	0.56	6	31148383	IGR	island
cg22291762	0.002	0.661	0.67	0.61	6	31148404	IGR	island
cg26818629	0.006	0.661	0.64	0.59	6	31148516	IGR	island
cg27547543	0.007	0.661	0.69	0.63	6	31148524	IGR	island
cg14036627	0.009	0.661	0.57	0.50	6	31148657	IGR	shore
cg18850127	0.004	0.661	0.56	0.50	7	39170497	POU6F2	opensea
cg15212455	0.003	0.661	0.75	0.68	7	39170539	POU6F2	opensea
cg20302533	0.003	0.661	0.58	0.53	7	39170763	POU6F2	opensea
cg03635442	0.002	0.661	0.39	0.29	8	49427283	IGR	island
cg08681904	0.006	0.661	0.38	0.25	8	49427415	IGR	island
cg05475109	0.006	0.661	0.32	0.19	8	49427684	IGR	shore
cg09744766	0.006	0.661	0.14	0.24	16	53407421	IGR	island
cg27158636	0.007	0.661	0.22	0.33	16	53407423	IGR	island
cg08681685	0.009	0.661	0.44	0.54	16	53407594	IGR	island
cg10144400	0.009	0.661	0.36	0.51	16	53407678	IGR	island
cg02380802	0.002	0.661	0.50	0.62	16	53407808	IGR	shore
cg15244786	0.008	0.661	0.58	0.51	12	54446279	HOXC4	shore
cg08712054	0.007	0.661	0.35	0.30	12	54446576	HOXC4	shore
cg03146625	0.010	0.661	0.56	0.50	12	54448729	HOXC4	shore
cg14285533	0.008	0.661	0.09	0.16	7	63386328	IGR	shore
cg06098368	0.008	0.661	0.18	0.27	7	63386616	IGR	island
cg20067334	0.009	0.661	0.11	0.17	7	63387147	IGR	shore
cg10464773	0.001	0.661	0.51	0.60	6	164171506	IGR	opensea
cg18405330	0.004	0.661	0.14	0.21	6	164171960	IGR	opensea
cg27041619	0.006	0.661	0.41	0.49	6	164172504	IGR	opensea
cg05495478	0.005	0.661	0.42	0.48	6	164172519	IGR	opensea
cg07044276	0.009	0.661	0.76	0.65	1	246859889	IGR	opensea
cg02951974	0.006	0.661	0.23	0.17	1	246859956	IGR	opensea
cg07018435	0.007	0.661	0.72	0.59	1	246860007	IGR	opensea

Tabla 5. DMRs obtenidas en el comparativo HomC vs HomNC (Mixto). Abreviaturas. CpG: Anotación del CpG diferencialmente metilado. p.value: valor p nominal. Adj.pval: media de valores p, de un conjunto de valores p correspondientes a sondas adyacentes. Los valores de p corresponden a valores ajustados por la corrección de Bonferroni. HomNC_LES_AVG: Metilación Promedio del CpG evaluado en el grupo de No portadores del Haplotipo Xq28. HomC_LES_AVG:

Metilación Promedio del CpG evaluado en el grupo de portadores del Haplotipo Xq28. CHR: Cromosoma. MAPINFO: coordenadas de localización del genoma humano HG19 de la base de datos del UCSC genome Browser (Karolchik et al., 2014¹⁵⁸), compuesta por cromosoma y rango genómico de referencia. CGI: Localización en la isla CpG.

Dentro de las DMRs encontradas en este grupo comparativo, destacan 2 localizadas en el cromosoma 6, ambas en regiones IGR, una en región genómica island y la otra en opensea. También destacan las localizadas en los genes coiled-coil domain-containing protein 105 (*CCDC105*), POU domain class 6 transcription factor (*POU6F2*) y Homeobox Protein Hox-C4 (*HOXC4*), localizados en los cromosomas 19, 7 y 12, respectivamente.

6.4.6 ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE VÍAS

Con la finalidad de conocer más acerca del significado biológico de la metilación diferencial observada entre los grupos de comparación, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías utilizando las 319 sitios diferencialmente metiladas que cumplieron los criterios explicados en la sección de metodología descrita en el numeral 5.4.6 de este capítulo mediante el uso de los repositorios KEGG_PATHWAY, BIOCARTA y REACTOME (**Tabla 6**).

Repositorio	Nombre de la Vía	Cuenta	P.Val	Genes	Lista Total
KEGG_PATHWAY	hsa04520:Union a cadherinas	5	0.004	<i>ACTG1, IGF1R, ACTN2, CTNNA1, VCL</i>	64
BIOCARTA	h_cell2cellPathway: Señalización de adhesión de célula a célula	3	0.014	<i>ACTN2, CTNNA1, VCL</i>	23
REACTOME	Interacción entre adherinas	4	0.003	<i>ACTG1, CTNNA1, PRR3, ZCCHC7</i>	35
REACTOME	Autodegradación de E3 ubiquitin ligasa COP1	5	0.003	<i>PSMA1, RFWD2, PSMD14, SHFM1, THRB</i>	54
REACTOME	Regulación de la expresión de células B	4	0.003	<i>HNF4A</i>	35
REACTOME	Estabilización de p53	5	0.004	<i>PSMA1, RFWD2, PSMD14, SHFM1, THRB</i>	59

Tabla 6. Vías enriquecidas con los genes identificados diferencialmente metilados en el grupo HomC vs HomNC (Mixto). Abreviaturas. Cuenta: Número de identificadores anotados para ese término. Lista Total: número de identificadores de la lista anotado para el término funcional. p-valor: valor p de la prueba exacta de Fisher.

Utilizando los tres repositorios se observó que las vías enriquecidas fueron principalmente las de las adherinas, obteniendo también las vías de autodegradación de la ubiquitina E3 ligasa, regulación de la expresión de células B y la estabilización de p53.

Los análisis realizados con el programa Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) de la Universidad de California en Santa Cruz (UCSC), con los genes diferencialmente metilados mostraron enriquecidos los módulos funcionales relacionados especialmente con la unión adherinas-actina, los cuales son importantes en la comunicación celular como respuesta a estímulos y respuesta a estrés, relacionadas con enfermedad cardiovascular. Tal es el caso de los genes *ACTG1*, *ACTN2*, *CTNNA1*, *VCL* que codifican para actinas y cadherinas, estando presentes principalmente en el epitelio vascular. De acuerdo con este resultado, los cambios en la metilación detectados en la comparación HomC HomNC(mixto) podrían resultar en cambios de la expresión de los genes relacionados a esta vía (**Tabla 7. y Anexo 2**).

Una vez identificado el enriquecimiento de vías con los sitios diferencialmente metilados, se utilizó la base de datos de Asociación Genética GAD (The Genetic Association Database)¹⁵⁵, para conocer si estas vías se relacionan a alguna enfermedad específica (**Tabla 7**), así como el tipo general de enfermedad (**Tabla 8**).

Categoría	Termino	Cuenta	%	P.Valor	Enriquecimiento	Genes
GAD_DISEASE	CARDIOVASCULAR	67	38.7	2.36E-05	1.54	Ver Anexo 2
GAD_DISEASE	PSIQUIÁTRICA	37	21.4	2.10E-04	1.84	
GAD_DISEASE	QUIMIODEPENDENCIA	56	32.4	4.04E-04	1.51	
GAD_DISEASE	NEUROLÓGICAS	46	26.6	0.001	1.56	
GAD_DISEASE	METABÓLICAS	66	38.2	0.022	1.23	

Tabla 7. Lista de enfermedades representadas con los genes identificados diferencialmente metilados en el grupo HomC vs HomNC (Mixto). Abreviaturas. Cuenta: Número de identificadores anotados para ese término. Lista Total: número de identificadores de la lista anotado para el término funcional. p-valor: valor p de la prueba exacta de Fisher.

Categoría	Termino	Cuenta	%	P Valor	Enriquecimiento
GAD_DISEASE	Trastorno por consumo de tabaco	50	28.90	0.00021	1.62
GAD_DISEASE	Narcolepsia	9	5.20	0.00147	4.13
GAD_DISEASE	Lupus Erytematoso, Sistemico	10	5.78	0.00592	3.01
GAD_DISEASE	Enfermedad de Alzheimer	19	10.98	0.00706	1.97
GAD_DISEASE	Enfermedad Autoinmune	4	2.31	0.00706	10.08
GAD_DISEASE	Infarto	13	7.51	0.00871	2.36
GAD_DISEASE	Enfermedad Arterial Coronaria	12	6.94	0.01419	2.31
GAD_DISEASE	Ecocardiografía	10	5.78	0.01634	2.55
GAD_DISEASE	Leucemia, Limfocítica, Crónica, Célula-B	7	4.05	0.02056	3.24

Tabla 8. Lista de enfermedades específicas enriquecidas con los genes identificados como diferencialmente metilados en el grupo HomC vs HomNC (Mixto). Abreviaturas. Cuenta: Número de identificadores anotados para ese término. Lista Total: número de identificadores de la lista anotado para el término funcional. p-valor: valor p de la prueba exacta de Fisher.

Los resultados obtenidos de las enfermedades representadas con los genes diferencialmente metilados muestran de manera global una relación principal con enfermedades cardiovasculares, psiquiátricas y quimiodependientes, las cuales se relacionan con manifestaciones de LES.

Sin embargo, al realizar una búsqueda con enfermedades específicas, observamos de manera interesante que, además de enfermedades específicas relacionadas a enfermedades cardiovasculares y neurológicas, también se encuentra LES con un valor de $p=0.00592$.

6.4.7 CÁLCULO DE POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA

Debido a que las muestras de ADN se obtuvieron a partir de sangre periférica, en donde se encuentra una composición celular heterogénea, se realizó el cálculo para determinar las poblaciones celulares y corregir los sesgos debido al predominio de una población celular en la muestra. Por esta razón, se llevo

a cabo el análisis de las poblaciones celulares presentes en los 17 pacientes participantes del comparativo HomC vs HomNC, utilizando el método de Housman descrito en la sección 5.5.5. En breve, se calcularon los porcentajes de 6 poblaciones celulares en sangre periférica para cada individuo evaluado: células T CD8+ y CD4+, Natural Killer (NK), células B, monocitos y granulocitos (**Tabla 9**).

Paciente	CD8T	CD4T	NK	Bcell	Mono	Gran
LHomNC-0818-F	0.055	0.074	0.000	0.147	0.156	0.568
LHomNC-0896-F	0.242	0.156	0.000	0.028	0.143	0.431
LHomNC-0875-F	0.033	0.099	0.008	0.075	0.210	0.574
LHomNC-0908-F	0.000	0.020	0.037	0.031	0.056	0.856
LHomNC-0932-F	0.001	0.057	0.000	0.156	0.038	0.748
LHomNC-0366-F	0.000	0.103	0.000	0.074	0.058	0.764
LHomC-0015-F	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040	0.960
LHomC-0324-F	0.037	0.085	0.006	0.164	0.037	0.671
LHomC-0851-F	0.088	0.049	0.123	0.001	0.118	0.622
LHomC-0935-F	0.000	0.036	0.069	0.036	0.176	0.684
LHomC-1025-F	0.000	0.000	0.000	0.023	0.056	0.921
LHomC-1046-M	0.000	0.012	0.000	0.027	0.083	0.879
LHomC-0654-M	0.000	0.042	0.000	0.103	0.090	0.765
LHomC-1082-M	0.000	0.000	0.000	0.011	0.108	0.881
LHomC-0718-M	0.000	0.008	0.000	0.016	0.035	0.941
LHomC-0938-M	0.000	0.072	0.007	0.084	0.114	0.723
LHomC-0270-M	0.006	0.110	0.051	0.096	0.044	0.693

Tabla 9. Porcentaje de poblaciones celulares calculadas por paciente de LESp de los grupos HomC y HomNC (Mixto). Abreviaturas. CD4T y CD8T; Linfocitos T CD4+ y CD8+ respectivamente. Gran: Granulocito, Mon: Monocitos; NK; células Natural Killer. Bcell; Linfocitos B.

Se observó que para todos los individuos evaluados la población celular que se encontró más frecuente fue la de los granulocitos, seguida por los monocitos. La población celular menos abundante fueron las células NK. De igual manera, se realizó la comparación de la proporción celular promedio de cada población del comparativo HomC vs HomNC (n=17) (**Fig.12A**), así como el comparativo de la proporción celular de linfocitos T CD4+ entre el grupo HomC vs la proporción celular de linfocitos T CD4+ entre el grupo HomNC (**Fig.12B**). Se calculó la significancia estadística con la prueba de rangos de Wilcoxon debido al no normalidad de las poblaciones presumiblemente por el número de muestras relativamente bajo (n=11 HomC, n=6 HomNC).

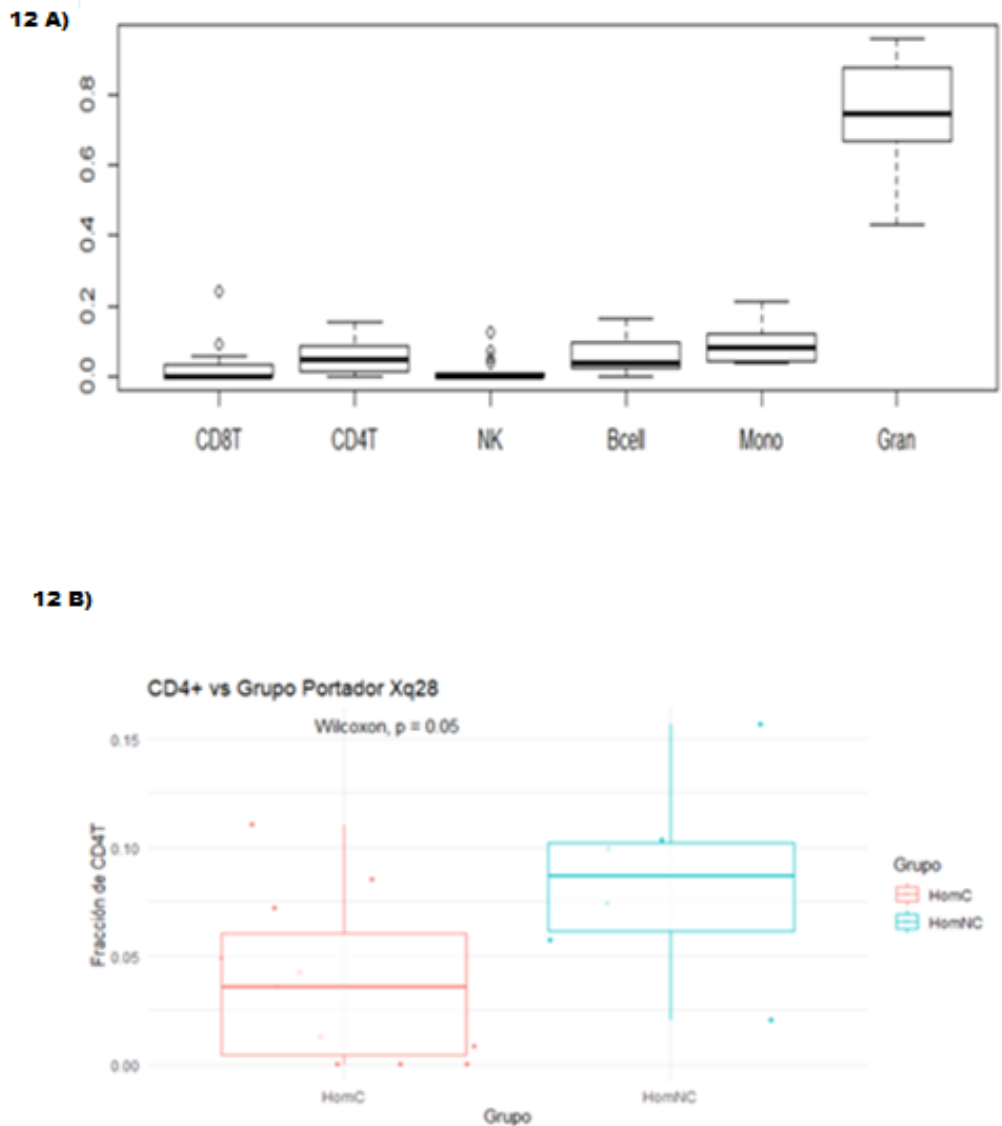


Figura. 12. Comparativo de las proporciones de las poblaciones celulares calculadas en HomC vs HomNC (Mixto). 12 A). Gráfica de cajas del comparativo entre las seis diferentes poblaciones celulares evaluadas en los pacientes con LESP HomC vs Hom NC mixto. **12 B).** Comparativo de la fracción celular correspondiente a la población de linfocitos T CD4+ entre el grupo portador y no portador. $p=0.05$.

En ninguna de las poblaciones celulares se observó alguna diferencia con significancia estadística entre los portadores y no portadores del haplotipo de riesgo (HomC vs HomNC, mixto).

Por otro lado, se calcularon las diferencias entre las medias de cada población celular, observando un amplio rango en porcentajes que van de 21.5-310.3%, mientras que para los linfocitos CD4+, CD8+, linfocitos B y monocitos los porcentajes son menores en el grupo portador del haplotipo Xq28 (HomC), los porcentajes de granulocitos y células NK son mayores.

De manera interesante, aunque ninguna población presentó diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos, para la población celular de linfocitos T CD4+, se obtuvo un valor de $p=0.05$ (**Fig. 12 B**). Aunque este no es un valor significativo, esta diferencia podría ser importante desde el punto

de vista clínico, ya que la disminución de linfocitos T CD4+ del 44.3 %+ en los pacientes de LESP portadores del haplotipo Xq28 podría implicar un importante decremento en las funciones de esta población celular, así como de sus subpoblaciones, la cual podría tener una implicación en la patogenia de la enfermedad y las manifestaciones de esta (**Tabla 10**).

	LT CD8+	LT CD4+	NK	L B	Monocitos	Granulocitos
media LES_NC	0.055	0.085	0.008	0.085	0.110	0.657
media LES_C	0.012	0.038	0.023	0.051	0.082	0.795
Dif	-0.043	-0.047	0.016	-0.034	-0.028	0.138
pValue	>0.05	0.055	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
%	21.587	44.365	310.303	59.883	74.350	120.966

Tabla 10. Resumen de las poblaciones celulares calculadas del comparativo HomC vs HomNC (mixto) de LESP. Se presenta la media y la diferencia aritmética, así como el p valor entre los grupos y el porcentaje del cambio del grupo portador HomC con respecto al grupo no portador HomNC. **Abreviaturas.** LT CD4+ y LT CD8+: linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente; NK: células Natural Killer; LB: linfocitos B; Mon: monocitos; Gran: granulocitos. pValor calculado con la prueba de Wilcoxon para muestras no paramétricas. %, porcentaje de cambio del grupo portador con respecto al no portador.

6.5 Comparativo HomC vs HomNC (mujeres)

Posteriormente se realizó el comparativo entre pacientes con LESp portadores de haplotipo en forma homocigota vs pacientes con LESp sin el haplotipo [HomC vs HomNC (mixto)], esta vez incluyendo solamente a pacientes femeninos. Lo anterior, con la finalidad de observar si existe algún efecto ligado al sexo de la presencia del haplotipo Xq28, debido a que el LES se presenta con una mayor frecuencia en individuos del sexo femenino. Esta muestra es un subgrupo de la muestra inicial analizada en el comparativo anterior.

6.5.1 Controles de Calidad

El procesamiento de los datos se realizó de acuerdo con las secciones 5.4 y 5.9 de la metodología, como se detalla en la sección 6.4. Después de la aplicación de estos filtros, se eliminaron 66,687 sondas de las 485,512 sondas iniciales, quedando un total de **418,825** sondas para los siguientes análisis.

En el análisis de la distribución de los valores Beta calculados para cada muestra, se obtuvo también un patrón de distribución de los valores Beta bimodal, observando una mayor intensidad en los valores extremos (**Fig. 13 A**). En el diagrama de MDS, los valores cercanos a cero reflejan un nivel de calidad similar entre las lecturas mediante una matriz de proximidad, los valores extremos se consideran anómalos (**Fig. 13 B**). En este análisis no se eliminó ninguna muestra con base a estos controles de calidad.

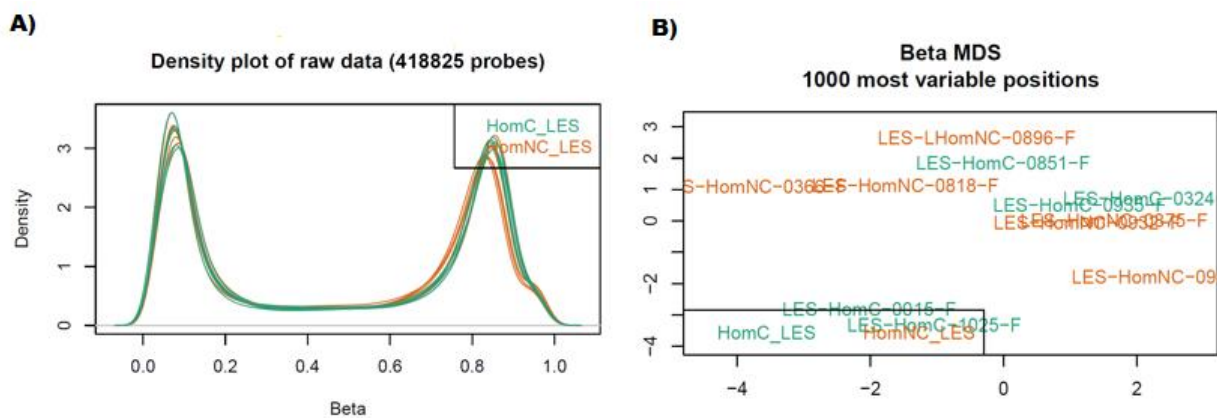
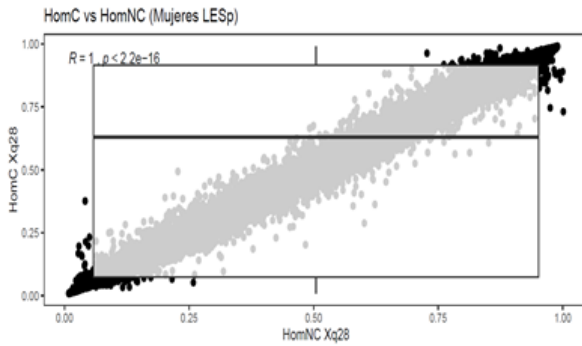


Figura 13. Control de calidad en muestras estudiadas por microarreglos HomC vs HomNC (mujeres). **A)** Valores beta en las muestras evaluadas mediante el paquete ChAMP. El eje de las abscisas muestra los valores Beta, equivalentes al nivel de metilación y el eje de las ordenadas muestra la densidad de sondas del microarreglo en cada nivel de metilación. **B)** Diagrama de variabilidad de los 1000 sitios CpG con mayor variabilidad. Para el procesamiento de los datos obtenidos del microarreglo se utilizó el paquete ChAMP.

Posteriormente, se realizó el análisis global de los valores de Beta comparando los grupos HomC vs HomNC solamente femeninos, observando una distribución de los sitios diferencialmente metilados con una correlación de 0.99951 (**Fig. 7A**), en el que se obtuvo un valor de $p=0.27$ (**Fig. 7B**), la cual fue muy parecida a la encontrada en el comparativo y HomC vs HomNC mixto con un valor de $p=0.39$ (**Fig. 6**), lo cual indica que las diferencias de metilación de ADN son específicas de loci específicos.

7 A)



7 B)

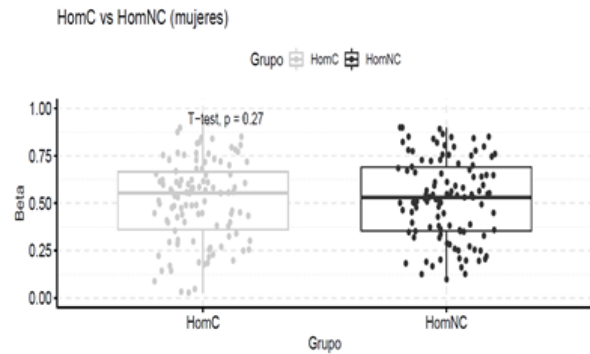


Figura 7. Resultados Globales de Metilación HomC vs HomNC (mujeres). A). Resultados Globales HomC vs HomNC mujeres. Scatterplot LESP HomC vs HomNC del grupo mujeres correlación 0.99951 $p < 0.01$. B). Boxplot comparativo de los valores Beta de metilación entre el grupo portador y no portador del grupo de mujeres $p = 0.27$.

En el análisis de correlación en el grupo exclusivo de mujeres HomC vs HomNC (**Fig.7A**) tampoco se observó que existe un cambio en la metilación global debido a la presencia del haplotipo Xq28. Tampoco se observó un cambio con significancia estadística al comparar la metilación entre los sitios diferencialmente metilados comparando directamente entre grupo portador y no portador ($p = 0.27$) (**Fig.7B**). Cabe señalar que este efecto es similar al observado en el grupo mixto, analizado previamente, lo que indica que no hay efecto cuando se analiza exclusivamente a mujeres en los niveles de metilación global.

6.5.2 RESULTADOS ANÁLISIS DE SITIOS CpG O DMPs

Para conocer la distribución de los sitios CpG diferencialmente metilados se graficó la diferencia de los valores Beta del grupo a evaluar contra en valor de referencia, en este caso HomC vs HomNC (mujeres), de tal forma que los valores positivos reflejan sitios CpGs en donde hay un valor Beta mayor en los grupos portadores del haplotipo Xq28, mientras valores negativos reflejas una pérdida en la metilación en el grupo portador, eje de las abcisas (**Figura 14**).

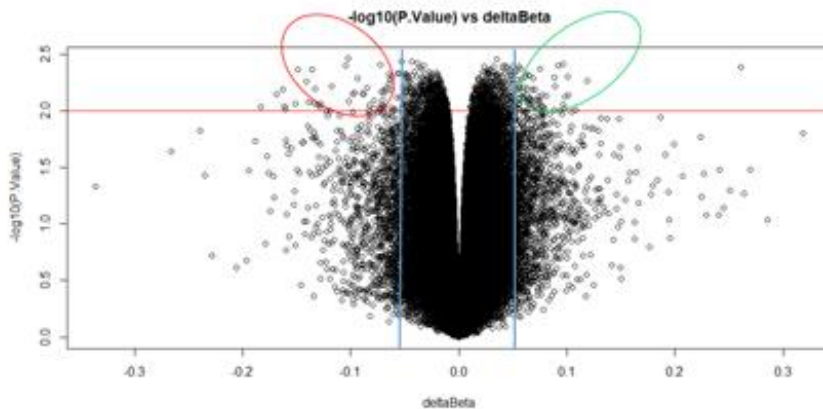


Figura 14. Gráfica tipo volcán en la que se muestra la distribución de los sitios CpGs o DMPs diferencialmente metilados. En el eje de las ordenadas se muestran los valores de p del comparativo para cada sitio CpG; se eligió el valor de $p = 0.01$ (-

log=2) como valor de corte, esto como un valor más astringente ante el valor de p=0.05, el cual podría enmascarar falsos positivos. En el eje de las abcisas los valores deltaBeta.

A partir de los resultados del análisis DMPs, se obtuvieron **110** sondas diferencialmente metiladas con un valor p<0.01 y con un cambio mayor al 5%. Estas sondas se muestran en su totalidad en archivo **Anexo 3** del presente documento.

Con la finalidad de conocer los sitios CpG que presentaron una mayor metilación diferencial por la presencia del haplotipo de riesgo Xq28, se decidió tomar los 10 sitios CpG con mayor hiper- e hipometilación. En la **tabla 11** se muestran las DMPs con una mayor metilación diferencial, tanto hiper- como hipometiladas, así como información general sobre estos sitios.


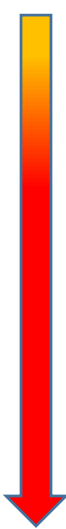
CpG	P. Value	adj. P.Val	HomNC_ LES_AVG	HomC_ LES_AVG	Delta Beta	CHR	gene	cgi	Sentido
cg24506221	0.004	0.875	0.36	0.62	0.26	1	GSTM1	TSS200-island	
cg24147543	0.006	0.875	0.10	0.22	0.12	6	HLA-DRB1	Body-shelf	
cg14709479	0.005	0.875	0.25	0.35	0.10	1	TLL10	TSS1500-shore	
cg02380802	0.008	0.875	0.50	0.60	0.10	16		IGR-shore	
cg20062057	0.009	0.875	0.35	0.44	0.10	2	NRXN1	Body-opensea	
cg19636519	0.004	0.875	0.29	0.38	0.09	7		IGR-opensea	
cg06153448	0.010	0.875	0.52	0.61	0.09	2		IGR-opensea	
cg20608895	0.004	0.875	0.36	0.45	0.09	13		IGR-opensea	
cg02175321	0.005	0.875	0.35	0.44	0.09	11	PDGFD	Body-opensea	
cg26131019	0.007	0.875	0.18	0.27	0.09	3	LRIG1	1stExon-island	
cg06742077	0.009	0.875	0.59	0.46	-0.13	8	MIR596	TSS1500-island	
cg16523850	0.009	0.875	0.69	0.56	-0.13	6		IGR-opensea	
cg04134279	0.005	0.875	0.58	0.45	-0.13	8	C8orf42	TSS1500-shore	
cg21728101	0.008	0.875	0.45	0.31	-0.14	7	MAD1L1	Body-shore	
cg00809820	0.006	0.875	0.54	0.40	-0.14	17	TBCD	TSS1500-island	
cg22325292	0.005	0.875	0.73	0.58	-0.15	17	FN3K	Body-island	
cg24960960	0.009	0.875	0.20	0.05	-0.15	5	SDHAP3	TSS200-island	
cg21167402	0.010	0.875	0.25	0.09	-0.16	5	SDHAP3	TSS200-island	
cg15969227	0.007	0.875	0.45	0.29	-0.16	6		IGR-opensea	
cg08422420	0.008	0.875	0.20	0.03	-0.17	5	SDHAP3	TSS200-island	

Tabla 11. Los 20 sitios CpG con la mayor metilación diferencial HomC vs HomNC (Mujeres). La lista completa se muestra en el **Anexo 3**. Este análisis se llevó a cabo mediante el paquete my_DMP de ChAMP. Se detectan 110 CpGs diferencialmente metilados con un cambio mayor al 5%. 55 CpGs hipermetilados. 55 CpGs hipometilados. **Abreviaturas:** IGR (espacio en blanco en la columna de gen): Región Intergénica. Flecha verde: sitios CpG hipermetilados; Flecha Roja: hipometilados. El análisis se realizó utilizando el paquete my_DMP de ChAMP. Flecha verde: sitios CpG hipermetilados; flecha roja: Hipometilados.

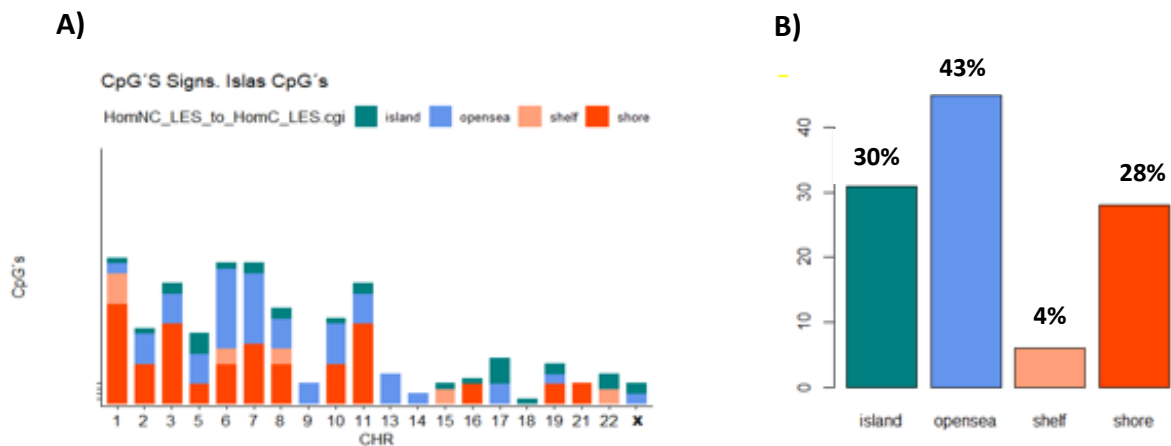
Dentro de los 10 sitios CpG que presentaron una mayor hipermetilación (flecha verde), se observó que el sitio cg24506221, localizado en el gen *GSTM1* que codifica para la enzima glutatión S-transferasa 1, presentó mayores cambios de hipermetilación (Delta Beta=0.26). Las *GSTM* pertenecen a la familia de enzimas responsables del metabolismo de una amplia gama de xenobióticos y carcinógenos. De manera interesante, la enzima *GSTM1* cataliza la reacción del glutatión con una amplia variedad de compuestos orgánicos para formar tioéteres, reacción que constituye el primer paso en el proceso de desintoxicación enzimática.

Por otra parte, el sitio CpG cg24147543, localizado en el cuerpo del gen *DRB1* del HLA, también mostró un cambio importante en los valores de hipermetilación (Delta Beta=0.12). La función del gen *DRB1* es crucial en la actividad del sistema inmune, en particular el HLA-DRB1 pertenece a un grupo de genes parálogos de cadena beta de clase II del HLA. La molécula de clase II es un heterodímero que consiste en un alfa (DRA) y una cadena beta (DRB), ambos anclados en la membrana y que desempeñan un papel central en el sistema inmunológico mediante la presentación de péptidos derivados de proteínas extracelulares. Las moléculas de clase II se expresan en las células que presentan antígenos.

6.5.3 DISTRIBUCIÓN DE SITIOS CpG O DPMs

En cuanto a la distribución cromosómica de los sitios CpG con mayores diferencias de metilación en el genoma, se observó que, en comparación con el comparativo mixto, estos presentaron una distribución cromosómica más homogénea, presentándose mayoritariamente en los cromosomas 1, 6, 7 y 11. Sin embargo, se observó que la distribución genómica en cada uno de estos cromosomas fue variable (**Fig 15 A**). Al comparar pacientes femeninos en el presente análisis, se incluyó el cromosoma X en el análisis.

Figura 14. Distribución cromosómica y genómica de los sitios CpG diferencialmente metilados en el comparativo HomC vs HomNC



(mujeres). A) Gráfica de barras que muestra la distribución en los cromosomas de los sitios CpG o DPMs diferencialmente metilados en los distintos cromosomas, incluido el cromosoma X para este análisis, así como su localización con respecto a la isla CpG próxima. Verde: Isla CpG, Azul Opensea, Marrón: Shelf, Rojo: Shore. **B)** Gráfica de barras que muestra la distribución de los sitios CpG diferencialmente metilados con respecto a la isla CpG próxima.

Por otra parte, en la distribución genómica se observó que los sitios CpG diferencialmente metilados en este comparativo se encontraron principalmente en la región opensea con un 43% del total de los sitios CpG, seguido de la región island con un 30%, en la región shore se ubicó el 28% de los sitios y el 4 % en las regiones shelf (Ver **Fig.14**). Se observa una distribución genómica de los sitios CpGs similar a la del comparativo mixto, lo cual sugiere que el efecto del haplotipo Xq28 podría ser específico de ciertas regiones.

6.5.4 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO NO SUPERVISADO

El agrupamiento jerárquico utilizando los **110** sitios CpGs diferencialmente metilados del comparativo HomCvsHomNC en pacientes femeninos logró identificar también a los dos grupos: los individuos portadores (HomC) y los no portadores (HomNC).

La mayoría de las muestras del grupo portador (HomC) se agruparon, a excepción de la muestra HomC-0851 y en el caso de los individuos HomNC femeninos, la muestra HomC-0908. En el mapa de calor de este comparativo también se observa el efecto diferenciador que ejerce el haplotipo Xq28 en los patrones de metilación de este grupo de mujeres, a pesar de que el número de sitios CpG es menor (110 contra 319 del comparativo anterior).

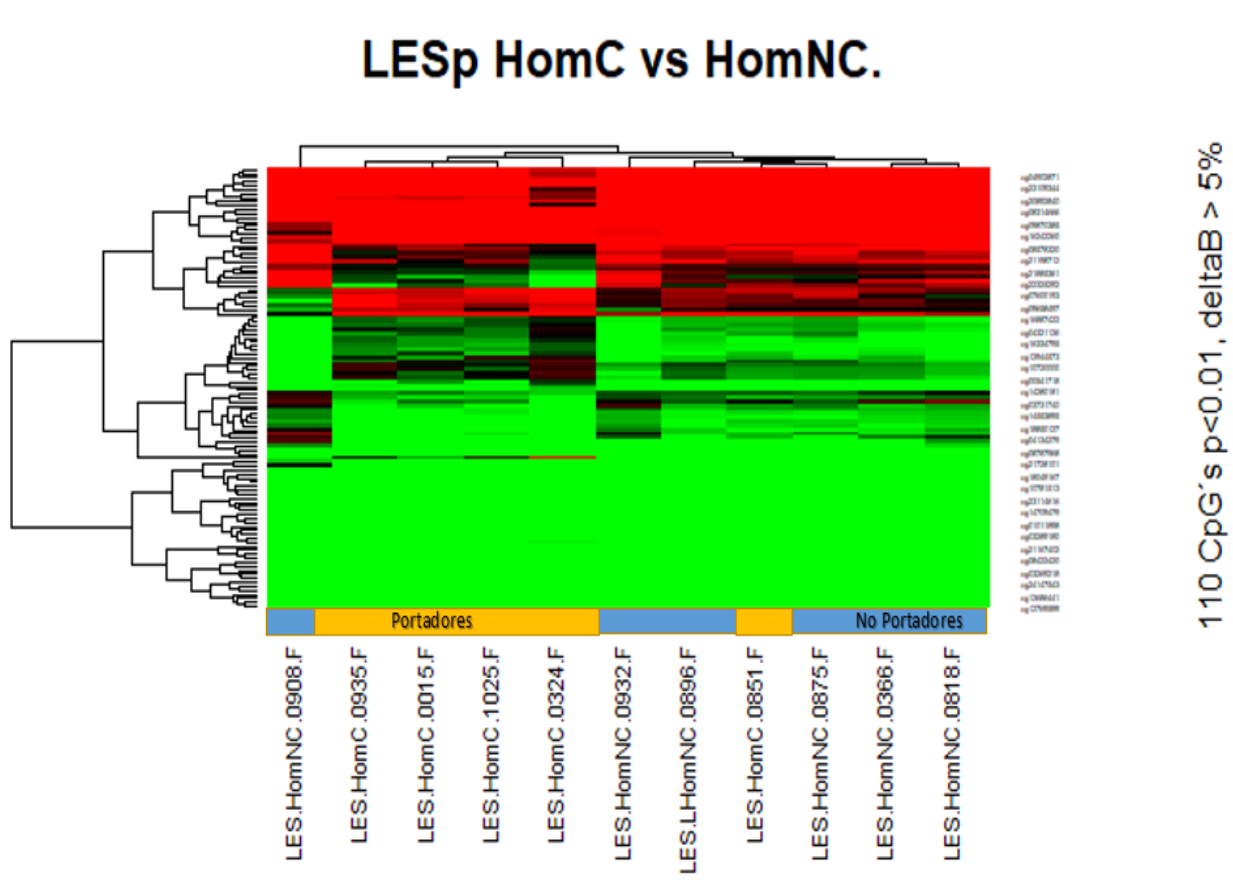


Figura 15. Mapa de calor que muestra el análisis de agrupamiento no supervisado de HomC vs HomNC (mujeres). Se muestra el agrupamiento de los 110 sitios CpGs diferencialmente metilados entre los portadores y no portadores del haplotipo Xq28 en el grupo de mujeres. En el eje de las abcisas se agrupan las muestras tomando en cuenta las semejanzas y diferencias de cada uno de los 110 sitios CpG diferencialmente metilados (eje de las ordenadas), de tal forma que representa

gráficamente las muestras que se agrupan conjuntamente en función de su metilación. Se realizó la corrección por tipo celular, mediante el paquete Refbase, para corregir los valores de metilación en función del tipo celular y evitar la sobre representación.

6.5.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DMRs

Posteriormente, se realizó el análisis de DMRs de acuerdo con lo explicado en la sección de metodología (numeral 5.4.5). Para este comparativo tampoco se encontraron DMRs con más de 7 sitios CpGs, sin embargo, destacan los rangos conformados por 3 o más sitios CpGs diferencialmente metilados (**Tabla 12**).

CpG	P. Valor	adj. P.Val	HomNC_ LES_AVG	HomC_ LES_AVG	Delta Beta	CHR	Mapinfo	gen	CGI (ubicación)
cg12686441	0.006	0.875	0.168	0.223	0.055	8	436693		IGR-opensea
cg06942649	0.006	0.875	0.127	0.178	0.051	8	436813		IGR-opensea
cg04134279	0.005	0.875	0.582	0.448	-0.134	8	496327	<i>C8orf42</i>	TSS1500-shore
cg23109344	0.01	0.875	0.851	0.782	-0.069	8	496440	<i>C8orf42</i>	TSS1500-shore
cg21167402	0.01	0.875	0.25	0.089	-0.161	5	1594676	<i>SDHAP3</i>	TSS200-island
cg24960960	0.009	0.875	0.198	0.048	-0.15	5	1594678	<i>SDHAP3</i>	TSS200-island
cg21931717	0.01	0.875	0.162	0.034	-0.128	5	1594715	<i>SDHAP3</i>	TSS200-island
cg08422420	0.008	0.875	0.197	0.029	-0.168	5	1594733	<i>SDHAP3</i>	TSS200-island
cg13301003	0.01	0.875	0.509	0.434	-0.075	11	32449254	<i>WT1</i>	Body-island
cg12006284	0.007	0.875	0.382	0.295	-0.087	11	32449638	<i>WT1</i>	Body-island
cg16501028	0.004	0.875	0.545	0.491	-0.054	11	32450000	<i>WT1</i>	Body-shore
cg08787968	0.006	0.875	0.478	0.427	-0.051	11	32451777	<i>WT1</i>	Body-shore
cg08578320	0.005	0.875	0.76	0.669	-0.091	6	32552039	<i>HLA-DRB1</i>	Body-island
cg24147543	0.006	0.875	0.099	0.216	0.117	6	32554481	<i>HLA-DRB1</i>	Body-shelf
cg07180897	0.009	0.875	0.899	0.771	-0.128	6	32729130	<i>HLA-DQB2</i>	Body-shore
cg03115019	0.004	0.875	0.839	0.766	-0.074	17	80708279	<i>FN3K</i>	Body-island
cg22325292	0.005	0.875	0.729	0.581	-0.148	17	80708367	<i>FN3K</i>	Body-island
cg00809820	0.006	0.875	0.541	0.399	-0.142	17	80708513	<i>TBCD</i>	TSS1500-island

Tabla 12. Cinco DMRs obtenidas en el comparativo HomC vs HomNC (mujeres). Abreviaturas. CpG: anotación del sitio CpG diferencialmente metilado. p.valor: valor p nominal. Adj.pval: media de valores p, de un conjunto de valores p correspondientes a sondas adyacentes. Los valores de p corresponden a valores ajustados por la corrección de Bonferroni. HomNC_ LES_AVG: Metilación Promedio del CpG evaluado en el grupo de No portadores del Haplotipo Xq28. HomC_ LES_AVG: Metilación Promedio del CpG evaluado en el grupo de portadores del Haplotipo Xq28. CHR: Cromosoma. MAPINFO: coordenadas de localización del genoma humano HG19 de la base de datos del UCSC genome Browser (Karolchik et al., 2014)¹⁵⁸, compuesta por cromosoma y rango genómico de referencia. CGI: Localización en la isla CpG.

Dentro de las DMRs encontradas en este grupo comparativo, destacan las localizadas en la región de isla del gen *SDHAP3* (localizado en el cromosoma 5), las localizadas en la zona cuerpo-isla del gen *WT1* del cromosoma 11, las localizadas en la zona cuerpo-isla de la región *HLA-DRB1* y *HLA-DQB2* en el cromosoma 6 y finalmente las localizadas en las regiones cuerpo-isla de los genes *FN3K* y *TBCD* en el cromosoma 17.

Lo anterior puede ser el reflejo del impacto de la presencia del haplotipo en su forma homocigota en la metilación que se diferencia en su compartamiento cuando se comparan exclusivamente mujeres portadoras contra no portadoras. Así, ahondar en las 5 DMRs diferencialmente metiladas permite conocer más acerca de los posibles efectos funcionales y clínicos que pudieran ocurrir en los pacientes portadores del haplotipo Xq28.

6.5.6 ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE VÍAS

Se realizó un análisis de enriquecimiento de vías utilizando las 110 sondas diferencialmente metiladas que cumplieron los criterios explicados en la sección de metodología (5.4.6), utilizando los repositorios KEGG_PATHWAY, BIOCARTA y REACTOM (Tabla 13).

Categoría	Termino	Cuenta	P Valor	Genes	Lista Total
KEGG	Regulación del citoesqueleto de actina	5	0.010	<i>ARHGEF7, GNA12, PIK3CA, IQGAP2, PDGFD</i>	29
KEGG	Carcinogénesis Viral	4	0.049	<i>MAD1L1, BAK1, HDAC4, PIK3CA</i>	29
BIOCARTA	Múltiples vías antiapoptóticas de la señalización de IGF-1R conducen a la fosforilación de BAD	3	0.006	<i>PRKAR2A, PRKAR1B, PIK3CA</i>	10
BIOCARTA	Regulación de la fosforilación de BAD	3	0.008	<i>PRKAR2A, PRKAR1B, PIK3CA</i>	10
BIOCARTA	Factor de transcripción CREB y sus señales extracelulares	3	0.009	<i>PRKAR2A, PRKAR1B, PIK3CA</i>	10
BIOCARTA	Mecanismo de regulación génica por proliferadores de peroxisomas a través de PPARa (alfa)	3	0.031	<i>PRKAR2A, PRKAR1B, PIK3CA</i>	10
BIOCARTA	NFAT e hipertrofia del corazón (transcripción)	3	0.034	<i>PRKAR2A, PRKAR1B, PIK3CA</i>	10
REACTOME	Translocación de ZAP-70 a sinápsis inmunológica	14	1.11E-16	<i>HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	42
REACTOME	Fosforilación de las cadenas zeta de CD3 y TCR	14	1.11E-16	<i>HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	45
REACTOME	Señalización de PD-1	14	1.11E-16	<i>HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	45
REACTOME	Generación de moléculas del segundo mensajero.	14	1.11E-16	<i>HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	59
REACTOME	Coestimulación por la familia CD28	15	3.33E-16	<i>PIK3CA;HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	97
REACTOME	Señalización río abajo del TCR	15	1.21E-14	<i>PIK3CA;HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	124
REACTOME	Señalización del TCR	15	1.36E-13	<i>PIK3CA;HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	147
REACTOME	Presentación antigenica del MHC clase II	14	2.56E-12	<i>HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	148

REACTOME	Señalización del Interferon gama	16	2.05E-11	<i>HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	250
REACTOME	Señalización por interferon	16	1.25E-08	<i>HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	392
REACTOME	Señalización de citoquinas en el sistema inmunitario	20	3.45E-04	<i>PIK3CA;TNFRSF25;OPRM1;HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	1261
REACTOME	Sistema Inmune adaptativo	17	4.67E-04	<i>VKORC1L1;PIK3CA;ARHGEF7;HLA-DQB2;HLA-DRB1</i>	999

Tabla 13. Vías de señalización enriquecidas con los genes diferencialmente metilados identificados en comparativo de los grupos HomC vs HomNC (mujeres). Abreviaturas. Cuenta: Número de identificadores anotados para ese término. Lista Total: número de identificadores de la lista anotado para el término funcional. p-value: valor p de la prueba exacta de Fisher.

Utilizando el repositorio REACTOME se observaron enriquecidas vías de señalización de la respuesta inmunológica, en específico las relacionadas con los receptores de linfocitos T (TCR), presentación de antígenos del CMH clase II, así como la señalización de interferón. Por su parte, el repositorio KEGG encuentra enriquecidas vías de señalización como la regulación del citoesqueleto de actina y carcinogénesis viral, mientras que con BIOCARTA se relacionan vías de señalización metabólicas como la regulación de la fosforilación de BAD, implicado en muerte celular programada, mecanismos de regulación génica por proliferadores de peroxisoma y relacionadas al factor de transcripción CREB.

El enriquecimiento de este tipo de vías concuerda con algunas de las que se observaron en el comparativo HomC vs HomNC mixto, sin embargo, aquí al comparar solamente pacientes femeninos se observa un mayor enriquecimiento de vías de señalización de la respuesta inmunológica, lo cual nos sugiere un cambio específico en los patrones de metilación que a su vez pudieran tener un efecto en una vía en particular, como lo es el reconocimiento antigénico llevado a cabo por las moléculas HLA, en particular las del tipo DRB1. Este comportamiento detectado en el sistema inmune no se detecta en el grupo mixto

Posteriormente se analizó si estas vías se relacionan con alguna enfermedad en específico, utilizando la base de datos GAD¹⁵⁵ (**Tabla 14**), así como el tipo general de enfermedad (**Tabla 15**).

Categoría	Termino	Cuenta	%	P Valor	Genes
GAD_DISEASE	Leucemia, mieloide, recurrencia aguda	3	0.036	0.001	Ver Anexo 4.
GAD_DISEASE	Esquizofrenia	10	0.121	0.002	
GAD_DISEASE	Síndrome nefrótico	3	0.036	0.004	
GAD_DISEASE	Triglicéridos	7	0.085	0.004	
GAD_DISEASE	Trastorno por consumo de tabaco	20	0.242	0.005	
GAD_DISEASE	Presión arterial	7	0.085	0.006	
GAD_DISEASE	Fumar	4	0.048	0.006	

Tabla 14. Lista de enfermedades específicas enriquecidas con los genes diferencialmente metilados identificados al comparar los grupos HomC vs HomNC (mujeres). Abreviaturas. Cuenta: Número de identificadores anotados para ese término. Lista Total: número de identificadores de la lista anotado para el término funcional. p-valor: valor p de la prueba exacta de Fisher. AQUÍ NO APARECE LES.

Categoría	Termino	Cuenta	%	P Valor	Enriquecimiento	Genes
GAD_DISEASE_CLASS	CARDIOVASCULAR	26	0.31523	0.00213	1.68200816	Ver Anexo 4
GAD_DISEASE_CLASS	PSIQUIATRICA	15	0.18186	0.00676	2.09710276	
GAD_DISEASE_CLASS	QUIMIODEPENDENCIA	22	0.26673	0.00805	1.66846164	
GAD_DISEASE_CLASS	METABOLICA	26	0.31523	0.04069	1.36337579	

Tabla 15. Lista de enfermedades generales enriquecidas con los genes identificados diferencialmente metilados al comparar los grupos HomC vs HomNC (Mujeres). Abreviaturas. Cuenta: Número de identificadores anotados para ese término. Lista Total: número de identificadores de la lista anotado para el término funcional. p-valor: valor p de la prueba exacta de Fisher.

Los resultados obtenidos de las enfermedades representadas con los genes diferencialmente metilados muestran, de manera global, una relación principal con enfermedades relacionadas al sistema nervioso, renal, hematológico y relacionadas al consumo del tabaco, los cuales son de los principales órganos con manifestaciones clínicas en los que difieren LESp y LESa⁶⁸.

En la búsqueda con enfermedades específicas utilizando la base de datos GAD, observamos enfermedades cardiovasculares, psiquiátricas, de quimiodependencia y metabólica. Es interesante que en este comparativo no se encuentra LES como en el comparativo mixto.

Finalmente, en relación a la Ontología Génica (GO), el principal proceso que se ve representado es el relacionado con la coestimulación de células T (GO:0031295~T cell costimulation), coagulación de sangre (GO:0007596~blood coagulation) y regulación negativa dependiente de AMPc (GO:2000480~negative regulation of cAMP-dependent) (ver **Tabla 16 y Anexo 4**), lo que pudiera sugerir anomalías en el funcionamiento de la inmunidad humoral, en especial la relacionada con la actividad de las células T.

Categoría	Término	Cuenta	Valor de p	Genes
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0031295~coestimulación de células T	4	0.0017	HLA-DQB2, HLA-DRB1, EFNB1, PIK3CA
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007596~coagulación de sangre	4	0.0183	PRKAR2A, PRKAR1B, GNA12, PDGFD
GOTERM_BP_DIRECT	GO:2000480~ regulación negativa de la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMPc	2	0.0240	PRKAR2A, PRKAR1B
GOTERM_BP_DIRECT	GO:2000310~ regulación de la actividad del receptor selectivo de glutamato de N-metil-D-aspartato	2	0.0446	OPRM1, NRXN1
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0034587~piRNA proceso metabolico	2	0.0446	PLD6, MOV10L1

Tabla 16. Lista de Ontología Génica (GO) de los genes identificados diferencialmente metilados al comparar los grupos HomC vs HomNC (mujeres). Abreviaturas. Cuenta: número de identificadores anotados para ese término. Lista Total: número de identificadores de la lista anotado para el término funcional. p-valor: valor p de la prueba exacta de Fisher.

6.5.7 CÁLCULO DE POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA

Posteriormente, se realizó el análisis de las poblaciones celulares presentes en los 11 pacientes participantes del comparativo HomC vs HomNC (mujeres), utilizando el método de Housman descrito en la sección 5.5.5. Se calcularon 6 poblaciones celulares en sangre periférica: células T CD8+ y CD4+, NK, células B, monocitos y granulocitos por cada paciente (**Tabla 17**).

ID del paciente	LT CD8+	LT CD4+	NK	L B	Mono	Gran
LES-HomNC-0818-F	0.06	0.07	0.00	0.14	0.16	0.57
LES-LHomNC-0896-F	0.24	0.15	0.00	0.03	0.14	0.43
LES-HomNC-0875-F	0.03	0.10	0.01	0.08	0.21	0.57
LES-HomNC-0908-F	0.00	0.02	0.04	0.03	0.06	0.86
LES-HomNC-0932-F	0.00	0.06	0.00	0.16	0.04	0.74
LES-HomNC-0366-F	0.00	0.10	0.00	0.07	0.06	0.77
LES-HomC-0015-F	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.96
LES-HomC-0324-F	0.03	0.09	0.01	0.17	0.04	0.67
LES-HomC-0851-F	0.09	0.04	0.12	0.00	0.12	0.63
LES-HomC-0935-F	0.00	0.04	0.07	0.04	0.18	0.68
LES-HomC-1025-F	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.92

Tabla 17. Porcentaje de poblaciones celulares calculadas por paciente de LESp de los grupos HomC y HomNC (mujeres). Abreviaturas. LT CD4+ y LT CD8+: linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente; NK: células Natural Killer; LB: linfocitos B; Mon: monocitos; Gran: granulocitos. pValor calculado con la prueba de Wilcoxon para muestras no paramétricas. %, porcentaje de cambio del grupo portador con respecto al no portador.

También en este comparativo se observó que para todos los individuos evaluados la población celular que se encontró más frecuente fueron los granulocitos, seguidos por monocitos. La población celular menos abundante fueron las células NK.

Se realizó la comparación de la proporción celular promedio de cada población del comparativo HomC vs HomNC (n=11) (**Fig.16 A**), así como el comparativo de la proporción celular de linfocitos T CD4+ entre el grupo HomC y el grupo HomNC (**Fig.16 B**).

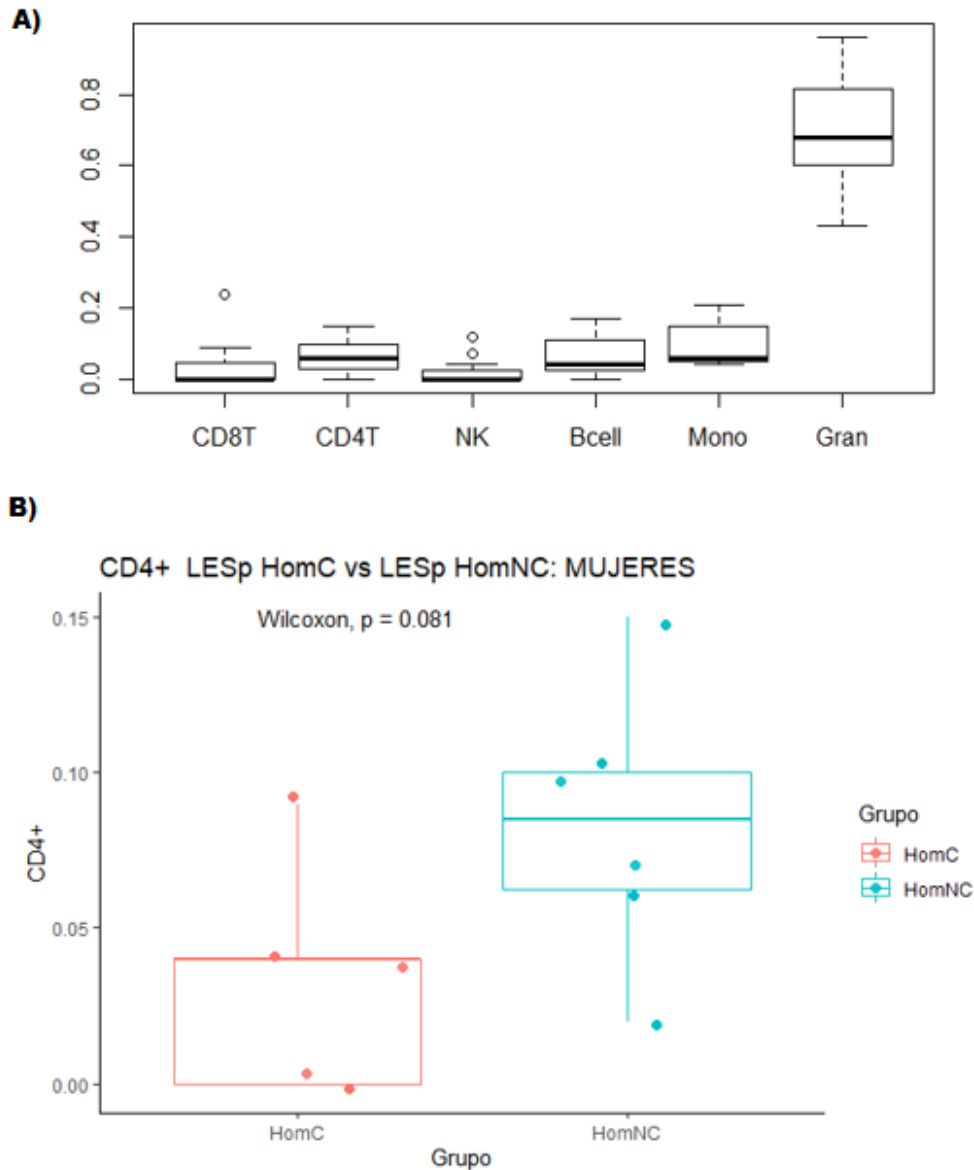


Figura 16. Comparativo de las proporciones de las poblaciones celulares calculadas HomC vs HomNC (mujeres). **A).** Gráfica de cajas del comparativo entre las seis diferentes poblaciones celulares evaluadas en los pacientes con LESp HomC vs Hom NC mujeres. **B).** Comparativo de la fracción celular correspondiente a la población de linfocitos T CD4+ entre el grupo portador y no portador. $p=0.081$.

No se observaron diferencias significativas en las poblaciones celulares evaluadas entre los portadores y no portadores del haplotipo de riesgo (HomC vs HomNC, mujeres).

Se determinaron las diferencias entre las medias de cada población celular de cada grupo HomC y HomNC (mujeres) (**Tabla 18**).

	LT CD8+	LT CD4+	NK	L B	Monocitos	Granulocitos
media LES_NC	0.055	0.084	0.008	0.085	0.111	0.657
media LES_HomC	0.025	0.034	0.039	0.045	0.085	0.771
Dif	-0.030	-0.050	0.032	-0.039	-0.026	0.114
pValue	>0.05	>0.05 (0.055)	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
%	45.44	40.07	521.41	53.34	76.91	117.32

Tabla 18. Resumen de las poblaciones celulares calculadas del comparativo HomC vs HomNC (mujeres) de LESp. Se presenta la media y la diferencia aritmética, así como el p valor entre los grupos y el porcentaje del cambio del grupo portador HomC con respecto al grupo no portador HomNC. **Abreviaturas.** **LT CD4+** y **LT CD8+**; Linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente; **LB**: linfocitos B; **NK**: células Natural Killer. **Dif**: Diferencia de medias: media LES_C - media LES_NC. p-Valor calculado con la prueba de Wilcoxon para muestras no paramétricas. %, porcentaje de cambio del grupo portador con respecto al no portador.

En ninguna de las comparaciones se presentó un valor de p significativo ($p < 0.05$), sin embargo, el comparativo de las células T CD4+ presentó un valor de $p = 0.055$ que, si bien está por arriba del valor de corte, se pudiera considerar de relevancia clínica, ya que representa una disminución del 40% en esta población celular en el grupo portador HomC en comparación con el grupo HomNC, en mujeres. Este comportamiento es similar al realizado en el comparativo HomC vs HomNC mixto, lo que implicaría la influencia del haplotipo Xq28 en el nivel de la población de linfocitos T CD4+ al disminuir su población solamente cuando se encuentra en su forma homocigota (HomC), sin importar el sexo.

6.6 Comparativo HetC vs HomNC (mujeres)

Una vez que se observaron los cambios que se presentan al comparar pacientes homocigotos portadores con los no portadores del haplotipo Xq28, tanto el grupo mixto como el grupo de mujeres, se realizó el comparativo entre portadores heterocigotos (HetC) con los no portadores (HomNC) en pacientes femeninos. Lo anterior con la finalidad de observar si existe alguna influencia dosis dependiente de la presencia de este haplotipo en la metilación del ADN.

6.6.1 Controles de Calidad

El procesamiento de los datos se realizó como se indica en las secciones 5.4 y 5.9 de la metodología, como se detalla en la sección 6.3.1. Después de realizar el filtrado, se eliminaron 58,631 sondas de las 485,512 sondas iniciales por lo que el número final de sondas con las que se realizaron los consecuentes análisis es de **426,881**.

En el análisis de la distribución de los valores Beta calculados para cada muestra mostró, como en los comparativos anteriores, un patrón de distribución bimodal, con una mayor intensidad en los valores extremos (**Fig. 17**). En el diagrama de MDS, los valores cercanos a cero reflejan un nivel de calidad similar entre las lecturas mediante una matriz de proximidad, los valores extremos se consideran anómalos (**Fig. 17 B**). En este análisis no se eliminó ninguna muestra con base a estos controles de calidad.

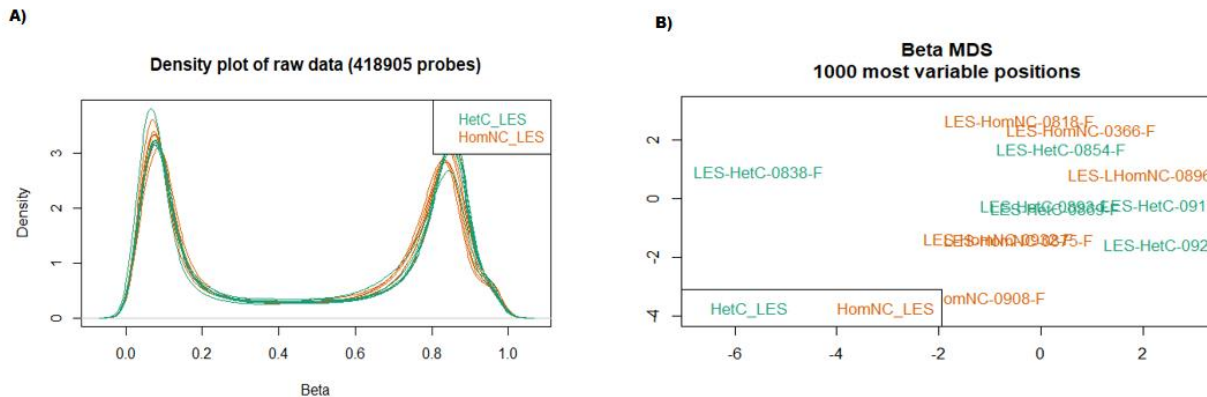
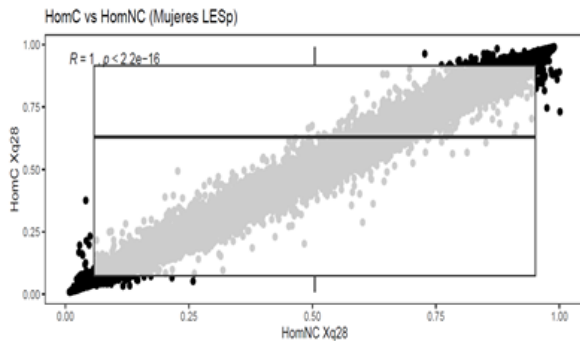


Figura 17. Control de calidad en muestras estudiadas por microarreglos comparando HetC vs HomNC (mujeres). **A)** Valores Beta en las muestras evaluadas mediante el paquete ChAMP. El eje de las abscisas muestra los valores Beta, equivalentes al nivel de metilación y el eje de las ordenadas muestra la densidad de sondas del microarreglo en cada nivel de metilación. **B)** Diagrama de Variabilidad de los 1000 sitios CpG más variables. Para el procesamiento de los datos obtenidos del microarreglo se utilizó el paquete ChAMP.

En el análisis global de los valores de Beta del comparativo HetC vs HomNC mujeres, se observó una distribución de los sitios diferencialmente metilados con una correlación de 0.99953 (**Fig. 18A**). Se obtuvo un valor de $p=0.9$ (**Fig. 18B**), el cual fue mayor a la del comparativo y HomC vs HomNC mujeres con un valor de $p=0.27$ (**Fig. 18B**), lo cual indica que las diferencias de metilación de ADN ocurren en loci específicos.

8 A)



8 B)

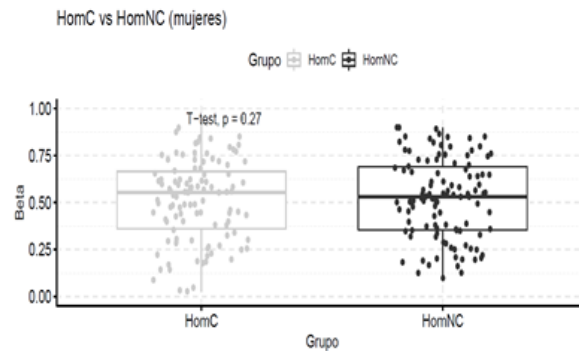


Figura 18. Resultados Globales de Metilación HetC vs HomNC (mujeres). A). Scatterplot LESP HetC vs HomNC del grupo de mujeres en el que se obtuvo una correlación de 0.99953 ($p < 0.01$). B). Boxplot Comparativo de los valores Beta de metilación entre el grupo portador Heterocigoto y no portador del grupo de Mujeres $p = 0.9$.

De manera similar a los comparativos previos, se detectó que no existe un cambio global en los valores Beta de metilación entre los grupos comparados, en este caso en entre los portadores heterocigotos contra los no portadores. En su conjunto, se puede observar que el haplotipo Xq28 ejerce un efecto localizado y no de manera global sobre los patrones de metilación entre portadores de y no portadores en pacientes con LESP. Esto es congruente con la mayoría de los estudios en donde, ni aún al comparar casos de LES y controles sanos, se observan cambios globales en los niveles de metilación.

6.6.2 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE SITIOS CpGs O DMPs

Para el análisis de la distribución de los sitios CpG diferencialmente metilados se graficó la diferencia de los valores Beta del grupo a evaluar contra en valor de referencia, en este caso HetC vs HomNC (mujeres), de tal forma que los valores positivos representan los sitios CpGs en los que hay un valor Beta mayor en los grupos portadores del haplotipo Xq28, mientras valores negativos reflejan una pérdida en la metilación en el grupo portado (eje de las abscisas) (**Figura 19**).

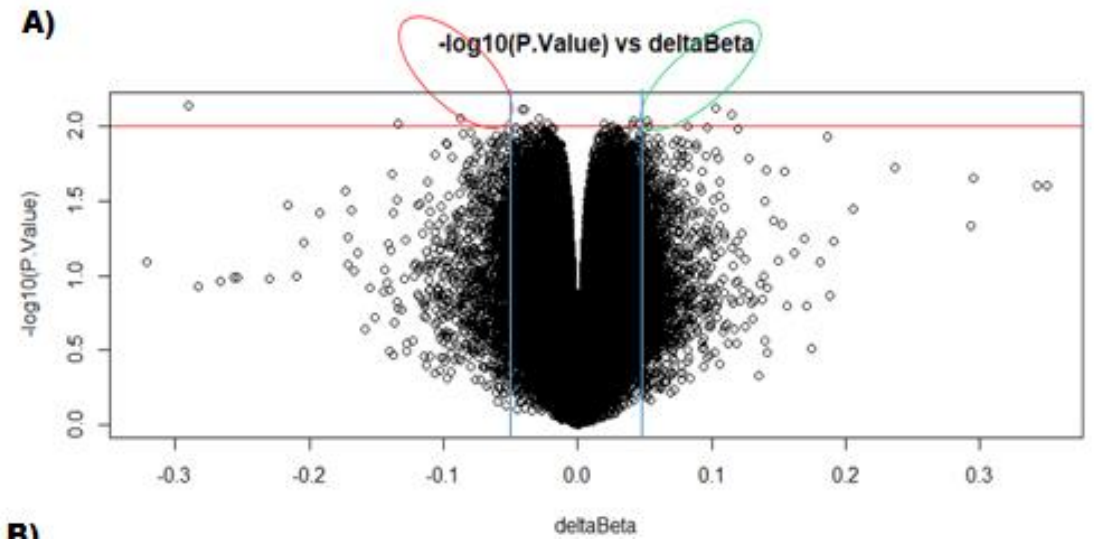


Figura 19. Gráfica tipo volcán en la que se muestra la distribución de los sitios CpGs o DMPs diferencialmente metilados. En el eje de las ordenadas se muestran los valores del $-\log(p)$ del comparativo para cada sitio CpG. Se eligió el valor de $p=0.01$ ($-\log=2$) como valor de corte, esto como un valor más astringente ante el valor de $p=0.05$ típicamente usado, sin embargo, tiene mayor probabilidad de enmascarar falsos positivos. En el eje de las abcisas se muestran los valores deltaBeta.

En el análisis de DMPs entre los portadores heterocigotos (HetC) y los no portadores homocigotos (HomNC), se detectaron solamente **11** sondas diferencialmente metiladas, más de un 5% de estas con un valor $p < 0.01$ (**Tabla 19**).

CpG	P. Valor	adj. P.Val	HomNC_ LES_AVG	HetC_ LES_AVG	Delta Beta	CHR	gene	cgi	Sentido
cg10881242	0.010	0.852	0.161	0.281	0.120	5		IGR-island	↑
cg15690347	0.008	0.852	0.261	0.378	0.117	19	SPIB	Body-island	
cg12622242	0.007	0.852	0.540	0.643	0.103	8	SH2D4A	Body-opensea	
cg01354046	0.010	0.852	0.184	0.280	0.096	5		IGR-island	
cg15007959	0.009	0.852	0.167	0.250	0.083	19	SPIB	Body-island	
cg04385631	0.009	0.852	0.062	0.116	0.054	12	SFRS2IP	TSS1500-island	
cg01294327	0.008	0.852	0.582	0.634	0.053	19	LINGO3	Body-island	
cg11784437	0.010	0.852	0.822	0.770	-0.051	10	FANK1	TSS1500-shore	↓
cg09300795	0.010	0.852	0.545	0.464	-0.081	16	ADCY9	Body-opensea	
cg10018233	0.008	0.852	0.868	0.780	-0.087	7	REPIN1	3'UTR-shore	
cg12076931	0.010	0.852	0.638	0.502	-0.137	9	NOTCH1	Body-shore	
cg21036194	0.007	0.852	0.725	0.430	-0.295	5	SNCAIP	Body-opensea	

Tabla 19. Lista de sitios CpGs con los mayores valores de metilación diferencial entre los grupos HetC vs HomNC (mujeres). Se detectaron 11 sitios CpG diferencialmente metilados ($p < 0.01$) con un cambio mayor al 5%. Se muestran los 7 sitios CpG

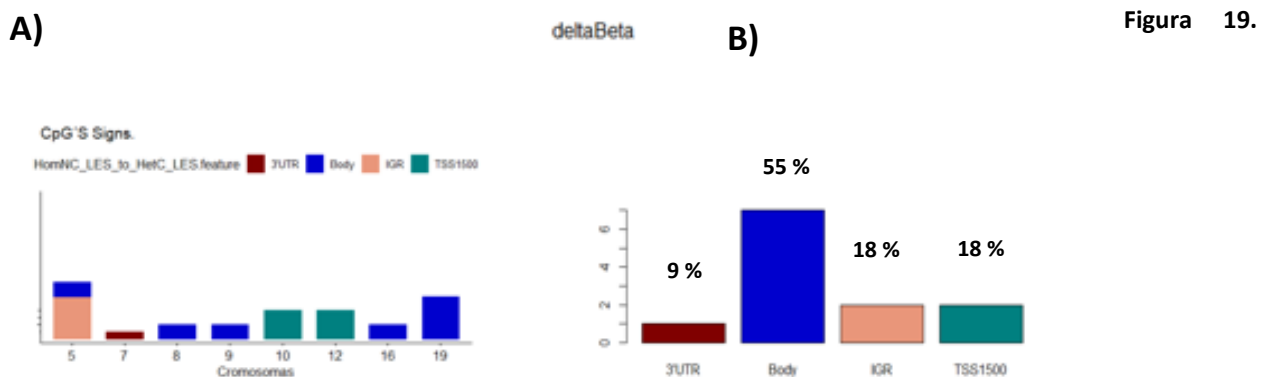
hipermetilados y 4 hipometilados. **Abreviaturas:** IGR (espacio en blanco en la columna de gen): Región Inter Génica. El análisis se realizó utilizando el paquete my_DMP de ChAMP. Flecha verde: sitios CpG hipermetilados; flecha roja: hipometilados.

Dentro de los sitios CpG con mayor hipermetilación destacan los dos localizados en la región de cuerpo-isla del gen *SP1B* del cromosoma 19, así como los dos localizados en la región IGR-isla en el cromosoma 5. De los sitios hipometilados los localizados en la región promotora del gen *FANK1* en el cromosoma 10, en la región cuerpo-marabierto del gen *ADCY9* en el cromosoma 16, en la región 3'UTR del gen *REPIN1* en el cromosoma 7, en la región cuerpo-shore de *NOTCH1* en el cromosoma 9 y en la región cuerpo-marabierto del gen *SNCAIP* en el cromosoma 5.

Aunque solamente se obtuvo 10 veces menos sitios CpG metilados en el comparativo HetC vs HomNC mujeres en comparación con el HomC vs HomNC mujeres, estos 11 sitios podrían tener alguna influencia en el curso clínico de la enfermedad, así como en la presentación de los síntomas.

6.6.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS SITIOS CpG o DPMs

En cuanto a la distribución cromosómica de los 11 sitios CpG con mayores diferencias de metilación de este comparativo, se observó que estos se encuentran solamente en los cromosomas 5, 7, 8, 9, 10, 12, 16 y 19 (**Fig 19 A**). En cuanto a la distribución genómica de estos sitios CpG se encontraron principalmente en la región body, seguidas de la región promotora TSS1500, zonas IGR y 3'-UTR (**Fig 19 B**). Al comparar pacientes femeninos en el presente análisis, se incluyó el cromosoma X en el análisis.



Distribución cromosómica y genómica de los sitios CpG diferencialmente metilados en el comparativo HetC vs HomNC (mujeres). **A)** Gráfica de barras que muestra la distribución en los cromosomas de los 11 sitios CpG diferencialmente metilados, así como su localización con respecto a la isla CpG próxima. Verde: Isla CpG, Azul Opensea, Marron: Shelf, Rojo: Shore. **C)** Grafica de barras que muestra la distribución de los sitios CpG diferencialmente metilados con respecto a la isla CpG próxima.

6.6.4 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO NO SUPERVISADO

Debido a que en este comparativo solamente se detectaron 11 sitios CpG diferencialmente metilados, no se llevo a cabo el análisis de agrupamiento por ser este un número pequeño para su realización.

6.6.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE DMRs

Este análisis no se pudo realizar por el bajo número de sitios CpG diferencialmente metilados obtenidos en este comparativo.

6.6.6 ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE VÍAS

Debido a que solo se detectaron 11 sitios CpG diferencialmente metilados, no fue posible considerar que hay una vía enriquecida.

6.6.7 CÁLCULO DE POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA

Se realizó el análisis de las poblaciones celulares presentes en los 12 pacientes incluidos en el comparativo HetC vs HomNC (mujeres), utilizando el método de Housman descrito en la sección 5.6.6. Se calcularon 6 poblaciones celulares en sangre periférica, células T CD8+ y CD4+, NK, células B, monocitos y granulocitos por cada paciente (**Tabla 20**).

ID del paciente	LT CD8+	LTCD4+	NK	L Bc	Mono	Gran
LES-HomNC-0818-F	0.06	0.07	0.00	0.15	0.16	0.57
LES-LHomNC-0896-F	0.24	0.15	0.00	0.03	0.14	0.43
LES-HomNC-0875-F	0.04	0.09	0.00	0.07	0.21	0.58
LES-HomNC-0908-F	0.00	0.02	0.04	0.03	0.06	0.86
LES-HomNC-0932-F	0.00	0.06	0.00	0.16	0.04	0.74
LES-HomNC-0366-F	0.00	0.10	0.00	0.07	0.06	0.77
LES-HetC-0838-F	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.96
LES-HetC-0854-F	0.04	0.09	0.15	0.07	0.07	0.59
LES-HetC-0869-F	0.04	0.13	0.04	0.07	0.09	0.64
LES-HetC-0893-F	0.00	0.10	0.02	0.11	0.09	0.68
LES-HetC-0917-F	0.09	0.36	0.00	0.03	0.06	0.46
LES-HetC-0920-F	0.09	0.20	0.00	0.03	0.04	0.64

Tabla 20. Porcentaje de poblaciones celulares calculadas en paciente de LESp de los grupos HetC y HomNC (mujeres). Abreviaturas. LT CD4+ y LT CD8+: linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente; NK:células Natural Killer; LB: linfocitos B; Mon: monocitos; Gran: granulocitos. P-Valor calculado con la prueba de Wilcoxon para muestras no paramétricas. %, porcentaje de cambio del grupo portador con respecto al no portador.

En el análisis también se muestra la proporción celular promedio de cada población, tomando la proporción detectada en cada individuo del comparativo HetC vs HomNC (n=12) (**Fig. 20 A**), así como el comparativo de la proporción celular de linfocitos T CD4+ entre el grupo HetC vs la proporción celular de linfocitos T CD4+ entre el grupo HomNC (**Fig. 20 B**).

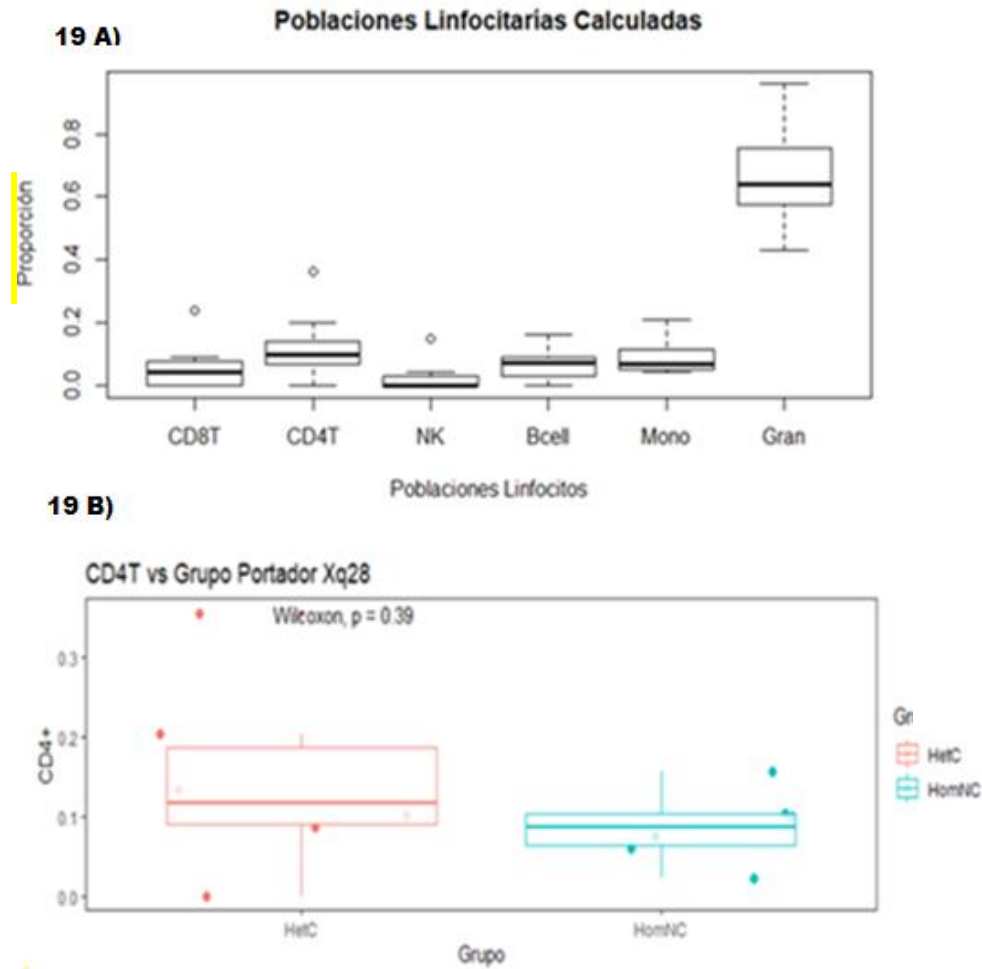


Figura 20. Poblaciones celulares calculadas HetC vs HomNC (mujeres). **19 A).** Gráfica de cajas de las poblaciones celulares detectadas en los pacientes con LESP HetC vs Hom NC mujeres. **19 B).** Comparativo de la fracción celular correspondiente a células T CD4+ entre el grupo portador y no portador.

No se observaron diferencias significativas en las poblaciones celulares evaluadas entre los portadores heterocigotos y no portadores del haplotipo de riesgo (HetC vs HomNC, mujeres). En el comparativo de los linfocitos T CD4+, el valor de p para este comparativo fue de 0.39, valor más elevado a los encontrados en los otros comparativos, lo cual podría reflejar que en el grupo de heterocigotos existe un efecto menor en la influencia del haplotipo en la proporción de esta población celular. Lo anterior también se ve reflejado en la diferencia de medias obtenidas para esta misma población celular que fue de +0.061 (**Tabla 21**).

	LT CD8+	LT CD4+	NK	L B	Monocitos	Granulocitos
media LES_NC	0.056	0.085	0.006	0.084	0.111	0.657
media LES_HetC	0.043	0.146	0.035	0.051	0.065	0.661
Dif	-0.013	0.061	0.029	-0.033	-0.046	0.003
pValue	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
%	76.40	171.16	550.38	60.46	58.30	100.50

Tabla 21. Resumen de las poblaciones celulares calculadas del comparativo HetC vs HomNC (mujeres) de LESp. Se presenta la media y la diferencia aritmética, así como el valor de p entre los grupos y el porcentaje del cambio del grupo portador HetC con respecto al grupo no portador HomNC. **Abreviaturas.** **CD4T** y **CD8T**; Linfocitos T CD4+ y CD8+ respectivamente; **LB**: linfocitos B; **NK**: células Natural Killer. **Dif**: Diferencia de medias: media LES_C - media LES_NC. p-Valor calculado con la prueba de Wilcoxon para muestras no paramétricas. %, porcentaje de cambio del grupo portador con respecto al no portador.

En este análisis se pudo observar el efecto dosis dependiente que tienen la presencia del haplotipo de riesgo Xq28 en los pacientes con LESp. Se observaron cambios menores comparado con los obtenidos en el comparativo HomC vs HomNC, sin embargo, habría que evaluar si estos cambios, aunque pequeños, pudieran estar reflejando algún cambio biológico que a nivel de la presentación y curso de la enfermedad pudieran tener algún efecto relevante.

7. DISCUSIÓN

7.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS GLOBALES

En los últimos años se ha hecho hincapié en tratar de entender la patología de las enfermedades multifactoriales, principalmente en entender los mecanismos regulatorios que promueven su aparición y desarrollo, tanto en la edad adulta como en la etapa pediátrica. Con el avance de estos estudios se ha sumado un mayor número de variables con el fin de entender la patogénesis del LES. En este aspecto, en un inicio las variantes genéticas fueron las primeras que ofrecieron una explicación a algunos procesos patogénicos, sobre todo con respecto a los defectos en el funcionamiento del sistema inmune innato que producen un déficit en este. Sin embargo, también desde un inicio, en estos estudios se reconoció que el aporte genético ofrece una explicación parcial, debido a que el LES es una enfermedad multifactorial, tomando cada vez más en cuenta a otros factores como la regulación epigenética que puede ofrecer mayores herramientas. En este sentido, en LES se han reconocido cambios importantes en la metilación del ADN, observando un estado de hipometilación en genes del sistema inmune, los cuales en algunos casos llevan a la sobreexpresión de diversos genes que regulan al sistema inmune, tanto innato como adaptativo. Resulta aún más relevante el poder entender en conjunto las variables que participan en el desarrollo del LES, en donde variantes genéticas pudieran tener un efecto adicional en los cambios epigenéticos, tal como la presencia del haplotipo de riesgo Xq28, en el cual se localizan dos genes clave tanto para la regulación epigenética (*MECP2*) como para la respuesta inmune (*IRAK1*). Se ha reportado que los individuos portadores de este haplotipo presentan una disminución del transcrito de *MECP2*, el cual es un regulador transcripcional y posible regulador de la metilación. Por todo lo anteriormente expuesto, es importante determinar el papel de los cambios de metilación del ADN en individuos con variantes genéticas, como lo es la presencia del haplotipo Xq28, que *per se* se asocia con riesgo para LES, y si este pudiera contribuir de manera significativa en el entendimiento del desarrollo de esta enfermedad desde edades tempranas.

Con la finalidad de conocer el efecto de este haplotipo en los perfiles de metilación en pacientes con LESp, en el presente trabajo se realizaron tres comparativos. En el primero, se evaluó el efecto en un grupo de portadores homocigotos comparándolo con no portadores, en el que en ambos grupos se incluyeron pacientes tanto femeninos como masculinos (HomC vs HomNC mixto; n=17). En el segundo y tercer comparativos se incluyeron solamente pacientes femeninos, comparando pacientes portadores homocigotos (HomC) y heterocigotos (HetC) con pacientes no portadores (HomNC), respectivamente. Con estos tres comparativos se pudo evaluar tanto el efecto de sexo en los cambios de metilación en pacientes con LESp portadores del haplotipo, así como el efecto de dosis que este pudiera tener en los perfiles de metilación.

Aunque se sabe que la contribución genética en el LES y el LESp es muy importante, en revisiones más recientes, como la realizada por Christou *et al.*¹⁷¹, los autores desafían la visión de que los factores genéticos son los únicos causantes al sesgo por sexo observado en LES y que esta diferencia también puede explicarse por la influencia de factores epigenéticos. Por ejemplo, en las células inmunes de pacientes con LES, se han observado distintas modificaciones en el epigenoma y se sugiere que algunas de estas alteraciones contribuyen directamente a la expresión de la enfermedad y al daño tisular en lugar de ser un síntoma de inflamación crónica y/o secundaria a otros eventos moleculares^{152,153,172,173}. Así, el poder evaluar una variante genética localizada en el cromosoma X que pudiera ejercer cambios en los perfiles de metilación de los pacientes, como la presencia del haplotipo de riesgo Xq28, podría ayudar a entender mejor las diferencias propias de cada paciente que se presentan en el LESp.

En el presente trabajo se observó el mayor número de sitios CpGs diferencialmente metilados (319) en el comparativo en el que se incluyeron pacientes femeninos y masculinos (HomC vs HomNC mixto; n=17) que presentan el haplotipo en forma homocigota y fue donde se presentó el mayor efecto sobre sitios CpG. En el comparativo del grupo de mujeres portadoras HomC contra el grupo no portador (HomNC), se observó un número menor de sitios diferencialmente metilados (110), lo cual pudiera ser debido a que en este segundo grupo el número de individuos fue menor (n=11) en comparación con los 17 del grupo inicial mixto, lo cual disminuye el poder estadístico en el momento de comparar. Sin embargo, el análisis de vías de señalización arrojó que en el grupo comparativo HomC vs HomNC mujeres, existe una concentración de cambios en la metilación que se refleja de forma más directa en procesos del sistema inmune, ya que la mayoría de las vías enriquecidas se concentran en procesos que regulan el reconocimiento antigénico llevado a cabo por el receptor de células T (TCR), lo cual no sucede en el grupo mixto donde el análisis de vías de señalización no está focalizado en algún proceso biológico específico, lo cual nos habla de que en el caso de las mujeres con LEsp pudiera existir un proceso que focalice cambios en la metilación en procesos relacionados con linfocitos T, esto a pesar de que la muestra en el comparativo es tan solo de 11 individuos, menor que el comparativo mixto (n=17).

En cuanto al efecto de dosis del haplotipo, se evaluó el comparativo entre los portadores heterocigotos HetC y los no portadores HomNC en pacientes mujeres, en el que solamente se detectaron 11 sitios CpG diferencialmente metilados, observando un efecto 10 veces menor al del comparativo HomC vs HomNC mujeres. Esta disminución significativa en el efecto sobre los patrones de metilación se puede explicar a un efecto de dosis donde se necesitan ambos alelos para generar un efecto máximo. Este efecto mínimo detectado en el comparativo con los pacientes heterocigotos también se refleja en el análisis de vías, donde no se detectó un enriquecimiento de vías en ningún proceso biológico, por lo que no se esperaría un agravante clínico en estos pacientes, lo que si se observa en los pacientes portadores homocigotos en donde se notan cambios mayores tanto en los perfiles de metilación como en ciertas vías de señalización, observando cambios más focalizados relacionados con procesos de los linfocitos T. Así, se puede observar la influencia del haplotipo en generar cambios en la metilación en sitios específicos de células del sistema inmune, el cual depende de manera proporcional de la presencia homocigota o heterocigota de este.

7.2 GRUPO HomC vs HomNC (MIXTO)

De manera interesante, fue en el análisis de metilación de *loci* específicos para el comparativo HomC vs HomNC mixto en donde se obtuvo el mayor número de sitios CpG diferencialmente metilados (319 sitios; diferencia > 5%; p<0.01). De éstos, 160 sitios CpG se encontraron hipermetilados en los individuos portadores del haplotipo Xq28 y 159 sitios CpG hipometilados (**Tabla 4**). De esta manera, se detectó un patrón de metilación equilibrado (50% de los sitios diferencialmente metilados hipermetilados y 50% hipometilados) por lo que se descartó una influencia unidireccional de la presencia del haplotipo Xq28 en el patrón de metilación. A fin de comparar el cambio en los patrones de metilación con otros reportados en la literatura, se realizó una revisión bibliográfica, sin embargo, no se encontraron resultados al respecto, por lo que sería la primera vez que se describe este patrón de metilación.

Por otro lado, se observó una distribución cromosómica heterogénea de estos sitios CpG, encontrándose concentrados principalmente en los cromosomas 6, 1, 7 y 5. Esta distribución puede sugerir comportamientos heterogéneos entre cromosomas de los patrones de metilación generados por la presencia del haplotipo de riesgo, sin embargo, también se puede deber a la distribución naturalmente asimétrica de los sitios CpGs en el genoma humano (**ver Fig. 10 A**). De hecho, no se espera una

distribución homogénea de los sitios CpG debido a la distribución asimétrica con la que fue diseñado el microarreglo *Infinium 450K de Illumina* y a la distribución natural de las islas CpGs en el genoma humano (**Fig. 10 B**). Cabe mencionar que, al incluir en este análisis a pacientes de ambos sexos, se eliminaron los cromosomas sexuales para evitar los sesgos en los perfiles de metilación que ocurren cuando se comparan individuos de ambos sexos. Con respecto a la distribución los sitios CpG diferencialmente metilados según su localización con respecto a las Islas CpG, se encontraron principalmente en la región de opensea (45%), seguidas de la región shore (23%), island (22%) y finalmente shel (10%) (**Fig 10 C**).

Uno de los aspectos interesantes fue que utilizando los 319 sitios diferencialmente metilados se logró diferenciar a ambos grupos (HomC y HomNC), como se observó en el análisis de agrupamiento (clustering). Este resultado sugiere que la presencia del haplotipo ejerce un efecto de metilación diferencial entre los portadores y los no portadores. También se observa en el mapa de calor que de los 6 individuos 5 se agrupan en un solo extremo de la gráfica (**Fig. 11**), sugiriendo que los valores de metilación son similares en un gran número de sitios CpG de estos individuos como se observa en el mapa de calor.

Por otra parte, en el análisis de metilación regional de DMRs se encontraron 9 regiones con 3 o más sitios CpG diferencialmente metilados, los cuales se localizaron principalmente en el cromosoma 6. Una DMR con 5 sitios CpG hipometilados se identificó en el cromosoma 6 (**Tabla 5**). Esta DMR se localiza en el gen **CCDC105**, el cual codifica para un ARN de 87 pb con función no descrita previamente. En un estudio realizado por Uchiumi *et al.*, los autores reportan que este gen presenta un promotor bidireccional en conjunto con el gen **SLC1A6**¹⁷⁴ (**Fig.20**), lo cual sugiere que esta región hipometilada podría tener un impacto en la regulación de la expresión de este gen. **SLC1A6** codifica a la proteína transportadora de aminoácidos excitadores 4 (EAAT4) que es de gran importancia en el transporte de aminoácidos al cerebro y también se han descrito cambios en la expresión de este gen en pacientes con colitis ulcerosa, la cual es una forma de enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EII) caracterizada por inflamación crónica y recurrente de la mucosa del colon¹⁷⁵.

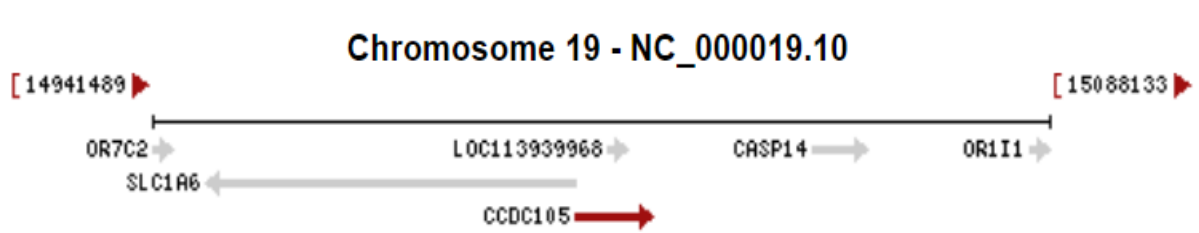


Figura 20. Zona génica en la que se localiza **CCDC105** anotada en el ensamble GRCh37. La región está conformada por **SLC1A6** en la hebra reversa con respecto a **CCDC105**, mientras que en este mismo gen está embebido el gen **LOC113939968**.

En el cromosoma 6 también se encontró otra DMR (con 6 sitios CpG) localizada en la región CHR6:31148370-31148657 (**Fig.21**) ubicada en el gen **PSORS1C3** (susceptibilidad a psoriasis 1 candidato 3). Recientemente, se ha descrito que **PSORS1C3** se superpone con el gen **OCT4 (POU5F1)** y se transcribe en un ARN largo no codificante (lncRNA) que regula la expresión de **OCT4**¹⁷⁶, el cual es un factor de transcripción conocido por sus funciones reguladoras en células pluripotentes, la tumorigénesis y la respuesta a estrés. También se ha demostrado que **PSORS1C3** está regulado por glucocorticoides y regula la expresión de **OCT4**, lo cual podría resultar interesante en el estudio de la respuesta a largo plazo de los glucocorticoides en LES.¹⁷⁷

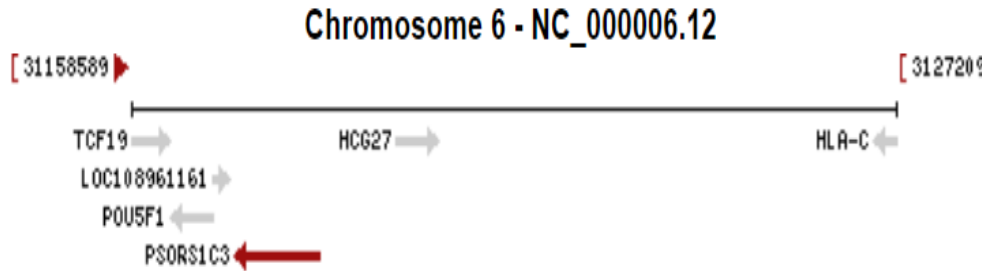


Figura 21. Zona génica en la que se localiza *PSOARSIC3* anotada en el ensamble GRCh37. El gen *PSOARSIC3* se encuentra en la cadena reversa junto al gen *POU5F1*.

Otra DMR en el cromosoma 6 fue la localizada en la región intergénica CHR6: 164171506 – 164172519 (región 6q26-q27) conformada por 4 sitios CpG diferencialmente hipermetilados, ubicada en el gen ***AK093114*** que codifica para un lncRNA. En esta región intergénica se encuentran dos lncRNA anotados *AK093114* y *AK090788* y está flanqueada por los genes codificadores de proteínas *QKI* y *PDE10A*.¹⁷⁸

En las tres DMRs localizadas en el cromosoma 6 descritas anteriormente, se concentran 2 de las 9 encontradas en este comparativo (22%). Con respecto a las regiones intergénicas (IGR) 6/9 DMRs están en estas regiones lo que representa el 67% de las regiones diferencialmente metiladas (**Tabla 5**). Lo anterior es importante ya que el cromosoma 6 alberga genes relevantes en la función del sistema inmune.

Otra DMR es la localizada en la región CHR16: 53407421-53407808, conformada por 5 sitios CpG diferencialmente hipermetilados; esta región codifica para un lncRNA ***LOC102723373*** aún no caracterizado (**Ver Fig. 22**). No se encuentran reportes en la literatura que se relacione con LES o con alguna otra enfermedad. Se reporta su expresión parcial en riñón, esófago y otros 13 tejidos.¹⁷⁹

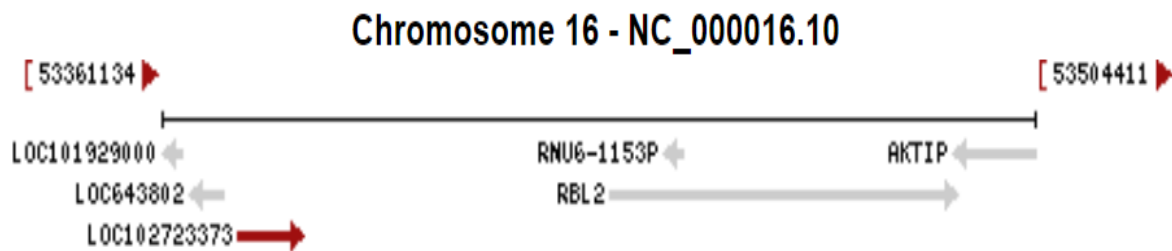


Figura 22. Zona génica en la que se localiza *LOC102723373* anotada en el ensamble GRCh37. El gen *LOC102723373* se encuentra en la cadena reversa junto a otros dos lncRNA *LOC101929000* y *LOC643802*.

Por su parte, la DMR localizada en el gen ***POU6F2*** se localiza en las coordenadas CHR7: 39170497-39170763 (ver Tabla 4). Este gen codifica para un miembro de la familia de proteínas POU, caracterizadas por la presencia de un dominio de unión de ADN bipartito que consiste en un dominio específico de POU y un homodominio. Los miembros de la familia de POU son reguladores de la transcripción, muchos de los cuales son conocidos por controlar las rutas de diferenciación específicas de cada tipo de celular. Variantes genéticas en este gen se asocian a susceptibilidad hereditaria al tumor de Wilms 5 (*WT5*), relacionado con malignidad pediátrica de riñón y el cual se ha descrito como uno de los cánceres sólidos más comunes en la infancia.¹⁸⁰

En los análisis de enriquecimiento funcional para los genes diferencialmente metilados en el comparativo HomC vs HomNC (mixto), se encontraron varias ontologías de procesos biológicos que se relacionan con **unión de cadherinas (Tabla 6)** en los tres repositorios estudiados (Biocarta, Reactome y KEGG), las cuales están implicadas en la generación de proteínas de unión celular. Estas son importantes para mantener la arquitectura del tejido y la polaridad celular y se ha reportado que también puede limitar el movimiento y la proliferación celular. Un ejemplo es la E-cadherina que sirve como una molécula esencial de adhesión celular (CAM). En esta vía se encuentran sitios CpG diferencialmente metilados en los genes **ACTG1, IGF1R, ACTN2, CTNNA1, VCL (Tabla 6)**. En lupus se ha descrito la sobreexpresión del gen **ACTG1**, detectándose por aumento de la proteína en la médula ósea de pacientes de LES activos en relación con pacientes inactivos.¹⁸¹ Por otro lado, también en esta vía se encuentra el gen **IGF1R** (receptor del factor de crecimiento de insulina-1), el cual activa las vías de proliferación celular e inhibe la apoptosis. *IGF1* está involucrado en el crecimiento tumoral y se requiere para la activación independiente de las células T de las células B. Las células B activadas y la producción de autoanticuerpos son un sello distintivo del LES. Waldron J. *et al* descubrieron que los niveles de IGF1 no se asociaron con la actividad de la enfermedad, la gravedad o los niveles de autoanticuerpos en LES, sin embargo, encontraron que IGF1 en forma libre ejerce efectos metabólicos positivos en LES y puede desempeñar un papel indirecto en la amortiguación de la respuesta inmune celular al regular negativamente la actividad de las células B y T.¹⁸²

Recientemente, se ha puesto especial interés en el estudio del neurolupus, el cual es una variante clínica de LES en la que se ve afectado el sistema nervioso central (SNC), observando un daño en el tejido de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual es una estructura multicelular altamente especializada que funciona como una barrera de difusión selectiva entre la circulación periférica y el SNC. El estudio de este padecimiento se ha enfocado en cómo las cadherinas pueden jugar un papel importante en su desarrollo.¹⁸³ La BHE está compuesta por células endoteliales especializadas (CE) que presentan uniones estrechas complejas y uniones adherentes. Estas células también están rodeadas de astrocitos y pericitos. En condiciones normales, la estructura especializada del BHE dificulta el transporte paracelular de la mayoría de los compuestos hidrofílicos a través del endotelio cerebral y restringe la migración de células sanguíneas al SNC. Como resultado, la microglia, las células inmunes residentes del SNC, son las que responden inicialmente a los patógenos o al daño tisular. Sin embargo, el daño tisular prolongado desencadena procesos inflamatorios que hacen que el BHE pierda sus características restrictivas, lo que resulta en la infiltración posterior de células inmunes periféricas.¹⁸³

Otra vía enriquecida es la denominada **Autodegradación de la E3 ubiquitina ligasa COP1**. En esta vía se encuentran sitios CpG diferencialmente metilados en los genes **PSMA1, RFWD2 (COP1), PSMD14, SHFM1, THRB** (ver **Tabla 6**). El gen **PSMA1** codifica para la subunidad del proteosoma alfa tipo 1. Esta proteína es una de las 17 subunidades esenciales que contribuyen al ensamblaje completo del complejo de proteosoma 20S. El proteosoma y sus subunidades son de importancia clínica por al menos dos razones: (1) un ensamblaje complejo comprometido o un proteosoma disfuncional puede asociarse con la fisiopatología subyacente de enfermedades específicas, y (2) pueden explotarse como objetivos farmacológicos para fines terapéuticos. Esta actividad generalmente se atribuye al papel de los proteasomas en la activación de NF- κ B, que además regula la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL- β , IL-8, moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina), prostaglandinas y óxido nítrico (NO).¹⁸⁴ Además, el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) también juega un papel en la respuesta inflamatoria como reguladores de la proliferación de leucocitos, principalmente a través de la proteólisis de las ciclinas y la degradación de los inhibidores de CDK.¹⁸⁵ También se ha reportado que los pacientes con enfermedades autoinmunes como LES, síndrome de Sjögren y artritis reumatoide (AR) exhiben predominantemente proteasomas circulantes que pueden aplicarse como biomarcadores clínicos.¹⁸⁶

Por otro lado, se ha demostrado que el gen **RFWD2 (COP1)** actúa como un regulador negativo de p53 a través de la ubiquitinación, mediada por tres enzimas. En el paso inicial, la ubiquitina se activa mediante una enzima activadora de ubiquitina (E1). La ubiquitina activada se transfiere luego a una enzima conjugadora de ubiquitina E2. Una ubiquitina ligasa (E3) se une a la E2 y la proteína objetivo. De estas tres enzimas las ubiquitinas ligasas E3 han sido el principal foco de atención. La evidencia acumulada sugiere que la ubiquitinación modula la señalización mediada por receptores de reconocimiento de patrones y es importante para la acumulación de sensores inmunes intracelulares de tipo repetido ricos en leucina que se unen a nucleótidos. Por otro lado, Yun-Han *et al.* observaron que **COP1**, generalmente se sobre-expresa en hepatocarcinoma, humano (HCH)¹⁸⁷ y podría predecir con precisión la supervivencia del paciente¹⁸⁸. Aunque el papel biológico general del mamífero **COP1** aún no se ha definido, se han dilucidado varias funciones¹⁸⁹. En las células T, el CSN controla varios aspectos de la fisiología de las células T, incluida la entrada del ciclo celular activado por el receptor de antígeno y la producción de citocinas, así como la homeostasis de las células T.¹⁸⁹

En un sentido más amplio, COP1 pertenece al denominado complejo de señalosoma COP9 (CSN), el cual está altamente conservado desde levadura hasta el ser humano. En plantas, se demostró que el complejo COP9 modula la expresión génica dependiente de la luz^{190,191}. El rango de respuestas biológicas en las que participa el CSN es extenso, incluido el desarrollo embrionario, el ciclo celular, el desarrollo de células T, la transducción de señales, la maduración de los ovocitos, la autofagia y el ritmo circadiano, lo que refleja la multifuncionalidad del complejo¹⁹².

Por otra parte, el gen **SHFM1 (SEM1 o DSS1)**, el cual es componente del proteosoma 26S, complejo multiproteico involucrado en la degradación dependiente de ATP de proteínas ubiquitinadas. Este complejo juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis de las proteínas al eliminar las proteínas mal plegadas o dañadas, lo que podría dañar las funciones celulares, y al eliminar las proteínas cuyas funciones ya no son necesarias. El proteosoma participa en numerosos procesos celulares, incluida la progresión del ciclo celular, la apoptosis o la reparación del daño del ADN¹⁹³. Componente del complejo TREX-2 (complejo de transcripción y exportación 2), compuesto por al menos ENY2, GANP, PCID2, SEM1 y centrina CETN2 o CETN3¹⁹⁴.

En lo que respecta al gen **THRB (receptor beta de la hormona tiroidea)**, la proteína codificada por este gen es un receptor de hormona nuclear triyodotironina. Es uno de los varios receptores de la hormona tiroidea, y se ha demostrado que media las actividades biológicas de la hormona tiroidea. Ling. *et al.* investigaron el silenciamiento aberrante de **THRB** en tejido y plasma de cáncer de mama por hipermetilación del promotor, por lo que se considera un posible gen supresor de tumores.¹⁹⁵ Los estudios de su mecanismo de inactivación se han concentrado principalmente en la mutaciones genéticas, pero algunos informes indican hipermetilación en la región promotora de **THRB**^{196,197}. También se han identificado cambios en la expresión del gen **THRB** en diferentes tipos de cáncer, la mayoría de las investigaciones han indicado una disminución de la expresión de ARNm de **THRB**¹⁹⁸, con solo unos pocos informes de sobre-expresión¹⁹⁹.

En su conjunto, en este análisis se observan cambios en la metilación del ADN principalmente en regiones ubicadas en el cromosoma 6, en las que se localizan lncRNAs. Aunque estos cambios no se localizan en genes del sistema inmune, los cuales se encuentran enriquecidos en el cromosoma 6, estos cambios podrían estar participando en la regulación de procesos en cis aún no descritos. En el caso del gen **PSOARSIC3** se encuentra a una distancia de 113,503, en términos de coordenada, de los genes del HLA-C, (ver Fig.21). Por otro lado, el análisis de enriquecimiento de vías también presenta un comportamiento heterogéneo en cuanto a los procesos celulares relacionados. Lo anterior podría indicar que al ser el LES una enfermedad multisistémica, diversos procesos biológicos se vean alterados a nivel de la metilación del ADN.

Por otra parte, al haber incluido en el presente trabajo muestras de sangre total, la cual muestra una heterogeneidad de poblaciones celulares, una de las correcciones que se tienen que realizar en los ensayos de metilación del ADN es por población celular. En los cálculos de poblaciones celulares de este comparativo se observó que para los linfocitos T CD4+ se presenta una disminución, aunque no significativa, en los pacientes portadores del haplotipo de forma homocigota (HomC) con respecto a los no portadores. Esto podría sugerir un posible efecto de la presencia del haplotipo Xq28 que sería factible a verificar de manera experimental en un mayor número de muestra.

Además del valor de p para determinar significancia estadística entre las poblaciones celulares, también se calcularon las diferencias de medias entre cada población ya que esta puede reflejar el impacto clínico de la ganancia o pérdida de una población celular de manera más directa que el valor de p, ya que mide el tamaño del efecto clínico. En ninguna de las comparaciones se presentó un valor de p significativo ($p < 0.05$), sólo el comparativo de las células T CD4+ presentó un valor de 0.05 (**Tabla 10**). También se calculó la diferencia entre medias y el porcentaje de cambio del grupo portador HomC con respecto al grupo no portador HomNC como medida de un cambio con interpretación clínica. La población celular más frecuente fue la de granulocitos, lo cual corresponde con lo esperado de una muestra cuantificada por los métodos estándar en el laboratorio clínico, ya que este grupo es el más abundante en sangre periférica (**Fig.12 A**). En cuanto a los otros 5 grupos calculados presentaron proporciones menores con respecto a los granulocitos, lo cual también es congruente con lo esperado, por lo que se comprueba la eficacia del método de Houseman para el cálculo de proporciones celulares. Es importante mencionar que el algoritmo de Houseman no especifica subpoblaciones celulares en particular, por lo que no sería posible señalar el decremento de una subpoblación específicamente.

7.3 GRUPO DE HomC vs HomNC (MUJERES)

En el comparativo HomC vs HomNC mujeres se identificaron 110 sitios CpG diferencialmente metilados (diferencia > 5%, $p < 0.01$), encontrándose también con un patrón de metilación equilibrado, 50% del total de los sitios CpG diferencialmente hipermetilados y 50% hipometilados (**Tabla 11**). Este resultado fue similar al del análisis con el grupo mixto (**Fig. 10 A**). Cabe señalar que en este comparativo se incluyeron los sitios CpG de los cromosomas sexuales ya que todos los pacientes son del mismo sexo, a diferencia del primer comparativo en el que se eliminaron los cromosomas sexuales por haber hombres en el grupo de HomC de portadores. Se incluyeron sólo mujeres para conocer si existe alguna metilación diferencial en los cromosomas sexuales y si esta enriquece el análisis de vías de señalización.

También se calculó la distribución cromosómica de estos sitios CpG, y aunque se encontró una distribución heterogénea entre cromosomas, se observó una mayor concentración de metilación diferencial principalmente en los cromosomas 1,3,6,7 y 11 (**Fig. 14 B**). La mayor distribución los sitios CpG diferencialmente metilados de acuerdo con su localización en con respecto a las Islas CpG, fue principalmente en la región opensea (40%), seguida de regiones island (30%) (**Fig. 14 B**).

Por otro lado, al realizar el análisis de agrupamiento no supervisado o “clustering”, utilizando los 110 sitios CpG diferencialmente metilados obtenidos en el análisis de DMPs, se observaron dos grupos principales en el árbol del dendograma, un grupo mayoritario de no portadores homocigotos (HomNC) del haplotipo Xq28 y un grupo conformado por cuatro individuos portadores (HomC) del haplotipo Xq28. Se observan también dos individuos que no se agrupan con los mismos individuos que portan su genotipo (**Fig. 11 y Tabla 11**). Lo anterior apoya la noción de que la presencia del haplotipo ejerce un efecto de metilación diferencial entre los portadores y los no portadores. También se observa que se agrupan los no portadores HomNC del lado derecho del mapa de calor, donde solo un paciente HomC se agrupa en este bloque, y de manera contraria, solo el individuo no portador (HomNC_0908) se agrupa con el bloque de los portadores HomC (**Fig. 15**), sugiriendo que los valores de metilación son similares en un gran número de sitios CpG.

En el análisis comparativo de DMRs entre individuos HomC vs HomNC mujeres, se detectaron 4 regiones con 3 o más sitios CpG diferencialmente metilados. Las DMRs con mayor número de CpGs (4 sitios CpG hipometilados) se localizaron en el cromosoma 5 y 11 (**Tabla 12**).

La primera DMR está localizada en el gen **SDHAP3** en la región a 200 pb del sitio de origen de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés: Transcription Start Site). **SDHAP3** es una subunidad del complejo succinato deshidrogenasa ubicada dentro de la membrana mitocondrial y funciona en la transferencia de electrones en la cadena del transporte de estos a la coenzima Q. Se ha reportado que las mutaciones localizadas en las subunidades de succinato deshidrogenasa provocan un aumento del estrés oxidativo²⁰⁰.

De manera interesante, Qihua Tan *et al.* realizaron un perfil de metilación de ADN de genoma completo en 144 gemelos adultos (mediana de edad de 33 años) que nacieron prematuramente, en el que encontraron tres regiones genómicas bajo regulación epigenética localizadas en los genes **SDHAP3**, **TAGLN3** y **GSTT1**. Otros estudios han mostrado que estos tres genes participan en el desarrollo de trastornos neurológicos, la susceptibilidad al desarrollo de cáncer en pacientes pediátricos con parto prematuro²⁰¹.

Recientemente, **SDHAP3** se ha descrito una disminución significativa de la metilación en la isla CpG localizada en la región promotora de **SDHAP3** en fetos expuestos a los efectos del tabaco²⁰². También se encontró un patrón de metilación de ADN diferencial en **SDHAP3** al comparar tejidos provenientes

de autopsias de cerebros de individuos con autismo y controles sanos²⁰⁰. Hasta el momento, la metilación diferencial de este gen no se ha estudiado en alguna enfermedad autoinmune.

La segunda DMR descrita se localiza en la zona del cuerpo del gen Wilms Tumor 1 (**WT1**) compuesta por 4 sitios CpG hipometilados. Este gen originalmente se relacionó con la supresión de cáncer de riñón y estudios realizados en ratones knock-out para **WT1** confirmaron el importante papel de este en la patogénesis del tumor de Wilms, un tumor que representa el 95% de todos los tumores renales infantiles, actuando como un gen supresor de tumores²⁰³. Investigaciones posteriores han demostrado que el gen **WT1** en otros casos actúa como un oncogen, principalmente en leucemia y cáncer de pulmón.

Aún más, se ha descrito una función dual de **WT1**, actuando en algunos casos como un activador transcripcional, mientras que en otros como un represor transcripcional. Por ejemplo, se ha encontrado que **WT1** favorece la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés: Epithelial-Mesenchymal Transition) durante el desarrollo del corazón activando a *Wnt4*, al mismo tiempo que favorece la EMT en el riñón en desarrollo. De esta manera, mientras *Wnt4* que es activado por **WT1** en el riñón, es reprimido simultáneamente por **WT1** en el corazón. Además, se ha identificado que el receptor de células T (TCR) puede reaccionar específicamente al péptido WT1²⁰⁴ y que varios epítomos derivados de proteínas WT1 son reconocidos por los linfocitos citotóxicos (CTL) junto con HLA²⁰⁵⁻²⁰⁷.

La tercera DMR encontrada se localiza en el gen *HLA-DRB1*. Se han reportado variantes genéticas localizadas en este gen asociadas a riesgo para LES y en el aspecto epigenético se ha reportado que las células T CD8+ de pacientes con LES se caracterizan por cambios significativos en la metilación en comparación con células T CD8+ de controles sanos en donde existen *loci* hipometilados en *HLA-DRB1*.

En cuanto al análisis de enriquecimiento de vías del comparativo HomC vs HomNC (mujeres), se encontraron varias ontologías de procesos biológicos que se relacionan en total con 19 vías (Ver **Tabla 13**). De manera general, estas se pudieron resumir de la siguiente manera: KEGG reportó 2 vías relacionadas con **regulación del citoesqueleto** y con **carcinogénesis viral**; BIOCARTA identificó 5 vías relacionadas, la primera denominada **regulación del factor de transcripción** agonista asociado a *Bcl-2* de la muerte celular (**BAD**). Este último es un miembro de la familia Bcl-2 con importantes funciones reguladoras en la apoptosis. Se ha demostrado que BAD posee muchas funciones no apoptóticas estrechamente relacionadas con varios tipos de cáncer, incluida la regulación de la glucólisis, la autofagia, la progresión del ciclo celular y el desarrollo del sistema inmunitario. Se señala que BAD puede ser tanto pro-apoptótico como pro-supervivencia, dependiendo del estado de fosforilación²⁰⁸.

Por otra parte, también en BIOCARTA se encontró enriquecida la vía del **Factor de transcripción CREB y sus señales extracelulares**. CREB es un factor de transcripción que regula diversas respuestas celulares, incluidas la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular. Este factor de transcripción es inducido por una variedad de factores de crecimiento y señales inflamatorias y posteriormente media la transcripción de genes que contienen un elemento sensible a AMPc. Recientemente, se reportó que varios genes relacionados con el sistema inmune poseen este elemento sensible al AMPc, incluidos *IL-2*, *IL-6*, *IL-10* y *TNF-α*. Además, se ha propuesto que CREB en su forma fosforilada inhibe directamente la activación de NF-κB al bloquear la unión de la proteína de unión de CREB al complejo NF-κB, limitando así las respuestas proinflamatorias. CREB también induce una señal de supervivencia antiapoptótica en monocitos y macrófagos. En las células T y B, la activación de CREB promueve la proliferación y la supervivencia y regula de manera diferencial las respuestas Th1, Th2 y Th17.²⁰⁹

Otra vía enriquecida es la denominada **mecanismo de regulación génica por proliferadores de peroxisomas a través de PPARα**. PPARα (receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma) es un receptor nuclear que se activa a través de la unión del ligando e induce la expresión de una gran

cantidad de genes diana. PPAR α funciona en varias rutas, incluida la ruta del ritmo circadiano y la ruta mediada por NOTCH1 para la modulación de la actividad de NF- κ B²¹⁰. Las enfermedades asociadas con la expresión y función aberrantes de PPAR α incluyen la enfermedad del hígado graso y la miocardiopatía alcohólica, que muestran expresiones alteradas de genes diana implicados en la proliferación y la diferenciación celulares, así como en las respuestas inmunes e inflamatorias, aunque no se ha encontrado evidencia particular en relación a enfermedades autoinmunes. La función de PPAR α también se ha relacionado con varios tipos de cáncer, ya que la inhibición de su actividad induce la supresión tumoral en el melanoma²¹¹ y el glioblastoma²¹², y también se ha encontrado que una mayor activación de PPAR α conduce a la progresión del crecimiento tumoral en el carcinoma hepatocelular^{213,214} y el cáncer de mama²¹⁵.

Otra herramienta útil para el análisis de vías es la librería REACTOME, en donde para el comparativo HomC vs HomNC (mujeres), se reportó el enriquecimiento de 12 vías relacionadas con cambios en la metilación en los genes *HLA-DQB2* y *HLA-DRB1* (Tabla 13). Estas vías están relacionadas diferentes etapas en la señalización del receptor de células T (TCR). Las vías mencionadas por REACTOME son: **translocación de ZAP-70 a sinapsis inmunológica, fosforilación de cadenas zeta CD3 y TCR, señalización PD-1, generación de moléculas del segundo mensajero (del TCR), presentación de antígeno MHC clase II, señalización de interferón gamma y señalización de interferón**. Estas vías se concentran en diferentes etapas que regulan el funcionamiento del TCR, desde el reconocimiento inicial hasta del antígeno hasta la subsecuente cascada de señalización (Ver Fig. 23).

De este primer grupo de 7 vías identificadas en el comparativo de mujeres portadoras vs no portadoras se pueden clasificar, en función de los genes que contienen, sitios CpG diferencialmente metilados, ya que estas vías comparten cambios en los genes *HLA-DQB2* (cg07180897 valor β de 0.899 a 0.771, $\Delta\beta$ -0.128, hipometilado en 14%) y *HLA-DRB1* (cg24147543 valor β de 0.099 a 0.216, $\Delta\beta$ 0.117, hipermetilado en 112% y cg08578320 valor β de 0.760 a 0.669, $\Delta\beta$ -0.091, hipometilado 12%). Estos cambios en este importante gen del sistema inmune ponen en relevancia la posible influencia del haplotipo Xq28 en la gravedad de la enfermedad, lo anterior si se infiere que los cambios en la metilación desencadenan cambios en los niveles de expresión del transcrito.

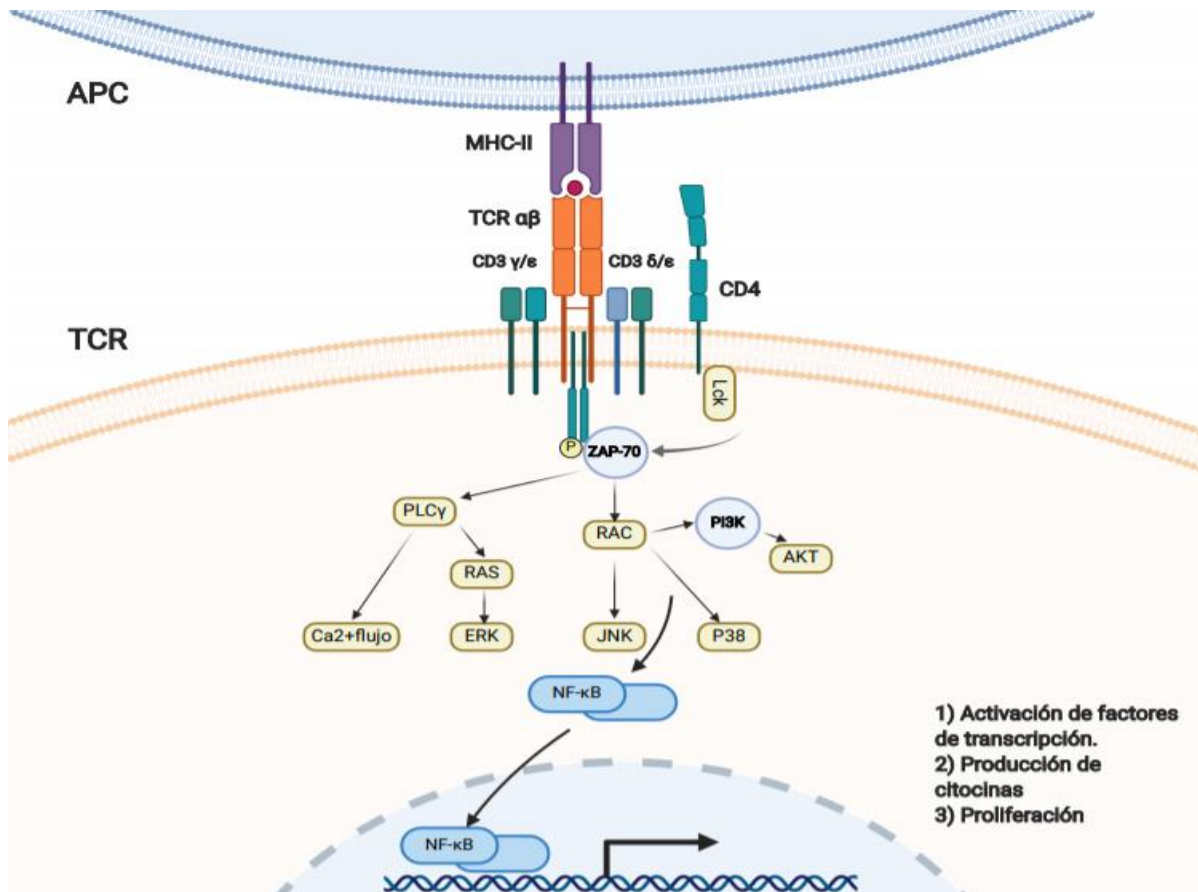


Figura 23. Reconocimiento antigénico MHC-TCR implicado en metilación. Cascada de señalización desencadenada por la presentación antigénica por HLA-II y el reconocimiento del antígeno por parte del TCR en linfocitos T CD4+, posteriormente se desencadena una cascada de señalización que pasa a través de múltiples proteínas de señalización intermedias, causando finalmente la activación de NF-κB, el cual es un factor de transcripción que promueve la transcripción de genes relacionados con un estado pro-inflamatorio caracterizado por la producción de citosinas y la proliferación de las células T. Realizado en Biorrender.

Recientemente, en un estudio de Imgenberg *et al.*¹⁶ se estudió al SNV HLA-DQB2 y su efecto en los patrones de metilación. Los autores evaluaron meQTLs (Quantitative trait loci associated to metilación) entre pacientes con LES vs controles sanos, utilizando la plataforma *Infinium 450k de Illumina*. Se observó una asociación entre el genotipo y cambios en los patrones de la metilación en 20 sitios CpG diferencialmente metilados, incluido el locus *HLA-DQB2*, lo que sugiere que varias de las variantes de riesgo genético para LES pueden ejercer su influencia en el fenotipo a través de la alteración de los niveles de metilación del ADN en las regiones reguladoras de los genes implicados.

Además, se han reportado asociaciones entre el HLA y la susceptibilidad a diferentes enfermedades autoinmunes sistémicas, sin embargo, se ha documentado que ciertos alelos en el gen *HLA-DRB1* confieren protección contra LES y otras enfermedades autoinmunes. Furukawa *et al.* describieron que algunos alelos HLA están asociados con la resistencia a enfermedades autoinmunes sistémicas, reportaron a los alelos DRB1*13 como los alelos protectores compartidos en varias enfermedades autoinmunes. De manera particular el alelo DRB1*13:01 es protector en las poblaciones europeas y DRB1*13:02 en la población japonesa. Esto podría indicar que cambios en los niveles de metilación que

influyen en la expresión del HLA podrían influir en el fenotipo de la enfermedad junto con las variaciones genéticas. Los sitios CpG cg24147543 y cg08578320 que encontramos en este gen podrían influir en este proceso.

El TCR es crucial en dos momentos de la vida de los linfocitos T, durante el reconocimiento antigénico y la transducción de señales. Participa primero en la selección positiva y negativa del repertorio T durante la maduración tímica. Después, en la periferia participa en el reconocimiento de antígenos, y desencadena procesos que expanden y diferencian a las clonas relevantes en cada caso (Linfocitos Cooperadores: Th, o reguladores: Tregs). El TCR es un complejo formado por un heterodímero ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) (Ver Fig. 24) responsable del reconocimiento antigénico y a menudo en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad de clase I en linfocitos citotóxicos CD8+, y de clase II en linfocitos CD4+. El TCR también está conformado por una serie de cadenas CD3 (γ , δ y ϵ) y CD247 (ζ), las cuales son claves en la propagación de la cascada de señalización posterior al reconocimiento del antígeno.

En este contexto es donde se ubican los cambios en la metilación detectados en el grupo de comparación HomC vs HomNC, y podría implicar cambios en el funcionamiento del TCR en el grupo portador del haplotipo Xq28.

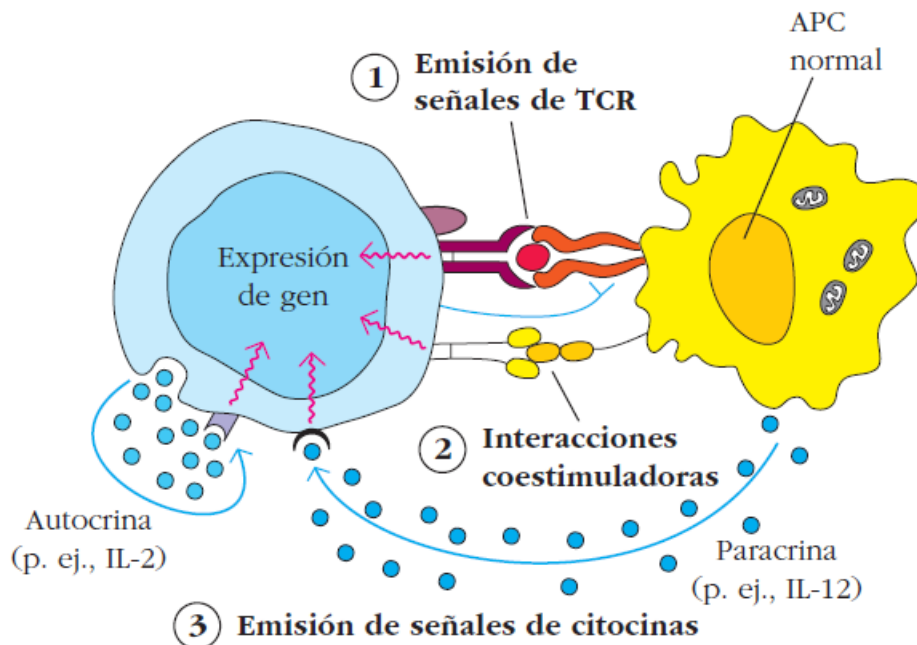


Figura. 24. Mecanismo general de presentación antigénica. Mecanismos que regulan la presentación antigénica entre una célula APC (antigen-presenting cell) y un linfocito T virgen. Mecanismo 1: Presentación del antígeno en el MHC-II de la célula APC y reconocimiento por parte del TCR en el linfocito T CD4+. Mecanismo 2: Generación de la interacción co-estimuladora que intensifica la cascada de señalización dentro del linfocito T con el fin de promover la expresión génica pro-inflamatoria. Mecanismo 3: Recepción de citocinas emitidas por el linfocito T o por la célula APC, mediada por los receptores de interleucinas. Los mecanismos 2 y 3 tienen como objetivo el reforzamiento de la señal desencadenada por el mecanismo 1. Tomada de Kuby⁸¹.

Por otra parte, con el análisis de Ontología Génica se identificaron tres procesos: **el enriquecimiento de estimulación de linfocitos T** (GO:0031295), **coagulación de sangre** (GO:0007596) y **regulación negativa de cAMP dependiente de proteincinasa** (GO:2000480). Estas ontologías se construyeron

con base en los cambios de la metilación en los genes *HLA-DQB2*, *HLA-DRB1*, *EFNB1*, *PIK3CA*, *PRKAR2A*, *PRKAR1B*, *GNA12*, *PDGFD* (ver **Tabla 16**). Es interesante resaltar que el principal cambio ocurre en la vía de señalización del linfocito T, lo cual también se observa en el análisis de REACTOME. Esto sugiere que los cambios en la metilación de los genes *HLA-DQB2* y *HLA-DRB1* podrían generar cambios en el reconocimiento antigénico, así como en la cascada de señalización.

En el análisis de asociación con enfermedades utilizando la base de datos GAD, se observó una asociación con leucemia mieloide crónica, lo que podría indicar anomalías en la formación de leucocitos, lo cual concuerda con el análisis de poblaciones celulares y con el análisis de vías reportado por la base REACTOME. También se reportó una asociación con **esquizofrenia**, **síndrome nefrótico**, **desorden en abuso de tabaco** y **presión sanguínea** entre otras (Ver **Tablas 14 y 15**). Con respecto a esquizofrenia, se ha reportado que mutaciones en el gen *MeCP2* pudieran estar asociadas a esquizofrenia y otros desordenes neuro-psiquiátricos²¹⁷. También cabe resaltar que la base de datos GAD reporta una asociación con el síndrome nefrótico cuya asociación está ampliamente reportada en casos con LESp.

Con respecto a los cálculos de poblaciones celulares en el grupo comparativo de HomC vs HomNC en mujeres, se encontró que la población celular con mayores cambios (tomando en cuenta la diferencia de medias de cada población) fue la población de linfocitos T CD4+ (p 0.055). Esto podría sugerir la pérdida de la función en subpoblaciones de linfocitos T CD4+ como las células Treg (T reguladoras), las cuales son clave en la regulación de la respuesta inmune. Aunado a esto, el análisis refleja un impacto focalizado en los procesos relacionados con el reconocimiento antigénico mediado por el TCR. Al compararse con los cálculos obtenidos en el comparativo HomC vs HomNC (mixto), se observa un comportamiento similar con respecto a la disminución de los linfocitos TCD4+, lo que sugiere que la presencia del haplotipo en forma homocigota es suficiente para producir una disminución en esta población linfocitaria.

Cabe señalar que con respecto a la diferencia a la prevalencia de LES entre sexos, se ha sugerido que una de las razones por la cual el sexo femenino presenta mayor prevalencia de LES podría deberse a cambios en la metilación del gen *CD40LG* (ligando de CD40) y otros genes asociados con el cromosoma X inactivo de las células T CD4+.²¹⁸ Sin embargo, la razón subyacente ha sido poco entendida durante mucho tiempo. Dado que las mujeres tienen dos cromosomas X y uno de ellos está inactivado por mecanismos que incluyen la metilación del ADN, se ha propuesto como un posible mecanismo a la reactivación del cromosoma X inactivado, como resultado de la desmetilación del ADN, lo cual puede ser al menos parcialmente, causante de una mayor incidencia en el sexo femenino del lupus. El ligando CD40 (*CD40L*, también conocido como *TNFSF5* o *CD154*) es un gen localizado en el cromosoma X que codifica una molécula co-estimuladora expresada en las células T; esta es la señal más importante que proporciona la "señal secundaria" a las células B para activar la producción de IgG cuando se une al CD40, molécula expresada en las células B. Usando el método de secuenciación de bisulfito, Lu *et al.*¹⁴³ revelaron que *CD40L* no está metilado en el cromosoma X en hombres sanos, mientras que está metilado solo en un alelo en mujeres sanas, manteniendo así el equilibrio en la dosis génica. Aún más, al tratar el ADN con el agente desmetilante 5-azaC *in vitro*, las secuencias reguladoras de *CD40L* no están metiladas en ambos cromosomas X en mujeres sanas y la expresión de *CD40L* se duplica en las células T CD4+. De esta manera se concluye que consistentemente, *CD40L* está hipometilado y sobre expresado en células T CD4+ de pacientes femeninos pero no masculinos con LES^{143,219}.

7.4 GRUPO DE HetC VS HomNC (MUJERES)

Finalmente, el comparativo HetC vs HomNC mujeres se llevó a cabo para determinar la influencia del haplotipo Xq28 en su forma heterocigoto y poder contrastarlo contra su efecto completo en los pacientes que lo portan de manera homocigota. Se obtuvieron solamente **11** sitios CpG diferencialmente metilados (diferencia > 5%, $p < 0.01$), de los cuales 7 sitios CpG se encontraron hipermetilados y 4 sitios CpG hipometilados (**Tabla 19, Fig. 18 A**). En este comparativo se obtuvo una cantidad notablemente menor de sitios CpG diferencialmente metilados en comparación con los dos comparativos anteriores, en los que se incluyeron individuos portadores homocigotos del haplotipo (HomC). Este comportamiento sugiere un importante efecto de dosis del haplotipo Xq28, ya que se esperaba un menor efecto en los pacientes heterocigotos HetC, sin embargo, la disminución es muy importante, lo cual resalta el factor de riesgo en los pacientes portadores homocigotos HomC. En este análisis se incluyeron los sitios CpG de los cromosomas sexuales, ya que todos los pacientes son del sexo femenino.

También se realizó el análisis de distribución en los distintos cromosomas de los 11 sitios CpG diferencialmente metilados, observándose una distribución homogénea entre 8 cromosomas (**Fig. 18 B**). No se observó algún patrón característico en esta distribución.

Sobre la distribución de los sitios CpG diferencialmente metilados con respecto a su región de ubicación en el cromosoma, se encontró que la mayoría se localizan en el cuerpo del gen (6 de 11; 55%) (**Fig. 18 C**). Se evaluó si esos sitios CpG coincidían con alguno de los dos grupos anteriores y no se encontraron sitios CpG compartidos entre los tres grupos. Esto podría indicar que la presencia del haplotipo Xq28 presenta efectos diferentes en la metilación de ADN de manera dosis-dependiente, así como en la dirección de la metilación (hipo- o hipermetilación) en los pacientes heterocigotos. Sin embargo, no se puede descartar que esto no esté relacionado con algunas covariables como estado clínico, tratamiento y estado de actividad de la enfermedad.

Para este grupo comparativo, no se realizaron los análisis de agrupamiento jerárquico no-supervisado debido al número reducido de sitios CpG obtenidos. Tampoco se detectaron DMRs ya que todos los sitios CpG se encuentran distribuidos en diferentes zonas. Esto también señala el efecto moderado en la metilación debida al haplotipo en los pacientes heterocigotos.

Se realizó el análisis de vías utilizando las mismas bases de datos que los comparativos anteriores, REACTOME y KEGG, mediante la plataforma DAVID 6.8, y mediante REACTOME en su página oficial, respectivamente. No se reportó enriquecimiento de vías en ninguna de las bases utilizadas, lo cual es de esperarse debido al número reducido de sitios Cp obtenidos en el análisis.

Al realizar los comparativos de los cálculos de poblaciones celulares, tanto de manera individual por muestra como comparando el grupo de HetC vs HomC (**Tabla 17 y 18**), no se obtuvo un valor de p significativo al 5%, ni se observó un valor cercano a 0.05 como en el caso de los linfocitos CD4+ observado en los dos comparativos anteriores. Esto, en su conjunto refleja, el nulo efecto del haplotipo en los pacientes HetC sobre las proporciones celulares calculadas. Por lo que se podría sugerir que la disminución de esta población celular sólo ocurre de una manera importante cuando se porta en forma homocigota el haplotipo Xq 28.

Otro aspecto importante es comparar los cambios en la metilación encontrados en este trabajo en donde se incluyeron pacientes de LES portadores contra pacientes no portadores del haplotipo Xq28 y los estudios encontrados en la literatura donde mayormente se han estudiado los perfiles de metilación de pacientes adultos contra controles sanos. En general al comparar controles sanos contra pacientes adultos con LES se observa, dependiendo el tamaño de la muestra (a mayor tamaño de muestra mayor

significancia estadística), cientos de sitios diferencialmente metilados con altos niveles de significancia (valor de p ajustado 0.05). Por ejemplo, en el trabajo realizado por Miller *et al.* reportan sitios hipometilados en varios genes de la vía del interferón entre ellos el gen *HLA-DRB1*²²⁰, en donde se presenta una disminución de alrededor del 40% en los niveles Beta de metilación en sitios CpG dentro de este gen. Sin embargo, cabe señalar que el número de sitios CpG obtenidos en el presente estudio podrían ser comparables a los obtenidos en estudios en los que se comparan casos y controles en otras enfermedades complejas como la obesidad, por lo que se puede sugerir que estos cambios en la metilación en LES podrían implicar cambios relevantes a nivel celular y biológico que deben de ser considerados en el curso clínico de los pacientes, así como en el esquema de tratamiento y en el pronóstico de la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

El haplotipo de riesgo para LES Xq28, identificado en población mexicana, ejerce un cambio en los patrones de metilación en pacientes de LES portadores de este en comparación con los pacientes no portadores.

Este efecto es proporcional a la presencia del haplotipo, ya que hay un mayor cambio en la metilación en los pacientes portadores homocigotos con respecto a los pacientes que lo portan de manera heterocigota, y un cambio mayor con respecto a los pacientes no portadores. Por lo que se puede indicar que la presencia de la forma heterocigota y más la homocigota refuerzan el mecanismo, en una forma dosis-dependiente.

Mediante el análisis de vías de señalización, se observó un enriquecimiento de vías relacionadas con funciones de comunicación del sistema inmune, en particular en la función del TCR, exclusivamente en mujeres portadoras homocigotas, lo cual indica que el haplotipo Xq28 presenta mecanismos dependientes del sexo del paciente, pudiendo indicar un mecanismo mediante el cual explicar una mayor aparición de la enfermedad en pacientes femeninos.

De manera teórica, se detecta un decremento en la población celular de linfocitos CD4+ en pacientes portadores homocigotos del haplotipo Xq28, afectando el funcionamiento de los linajes de efectores de linfocitos T CD4+, lo que podría afectar los mecanismos de regulación y agravar el transcurso de la enfermedad.

9. PERSPECTIVAS

- A partir de la estandarización de la técnica de PCR sensible a metilación que se estandarizó durante este estudio, continuar con la validación experimental de los sitios CpG que mostraron mayores cambios en la metilación en una muestra mayor.
- Realizar más comparativos tomando en cuenta una muestra de controles pediátricos sanos a fin de detectar los patrones de metilación generados por todos los cambios debidos a LES.
- Realizar análisis de expresión de los genes en las regiones diferencialmente metiladas a fin de establecer relaciones metilación-expresión.
- Determinar experimentalmente los cambios en las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ entre portadores homocigotos del haplotipo Xq28 versus no portadores, también determinar estas mismas poblaciones entre casos y controles sanos.

10. REFERENCIAS

1. FENG P-H. Systemic Lupus Erythematosus: The Face of Asia. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1108(1):114-120. doi:10.1196/annals.1422.013
2. Belostotsky VM, Dillon MJ. Systemic lupus erythematosus in children. *Curr Paediatr*. 1998;8(4):252-257. doi:10.1016/S0957-5839(98)80078-X
3. Susanne M. Benseler, MD, Earl D. Silverman, MD F. Systemic Lupus Erythematosus. *Pediatr Clin North Am*. 2005;52(2):443-467. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60279-7
4. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*. 2006;15(5):308-318. doi:10.1191/0961203306lu2305xx
5. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwok CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum*. 1995;38(9):1260-1270. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7575721>. Accessed November 16, 2018.
6. Claros A. C, Martínez L. AF. Gaceta Médica Boliviana. *Gac Médica Bolív*. 2010;33(2):45-50. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662010000200011. Accessed December 2, 2018.
7. Coronado Alvarado CD, Gámez Saiz IL, Sotelo Cruz N. Características clínicas y comorbilidades de pacientes con lupus eritematoso sistémico en niños y adultos. *Acta Pediátrica México*. 2018;1(1):1. doi:10.18233/apm1no1pp1-121535
8. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677-2686. doi:10.1002/art.34473
9. Lehman TJ, McCurdy DK, Bernstein BH, King KK, Hanson V. Systemic lupus erythematosus in the first decade of life. *Pediatrics*. 1989;83(2):235-239. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2913553>. Accessed November 16, 2018.
10. Barron KS, Silverman ED, Gonzales J, Reveille JD. Clinical, serologic, and immunogenetic studies in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1993;36(3):348-354. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8452580>. Accessed November 16, 2018.
11. Tucker LB, Menon S, Schaller JG, Isenberg DA. Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome. *Br J Rheumatol*. 1995;34(9):866-872. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7582729>. Accessed November 16, 2018.
12. Thorbinson C, Oni L, Smith E, Midgley A, Beresford MW. Pharmacological Management of Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *Paediatr Drugs*. 2016;18(3):181-195. doi:10.1007/s40272-016-0170-8
13. Mina R, Brunner HI. Update on differences between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(4):218. doi:10.1186/ar4256
14. Hiraki LT, Benseler SM, Tyrrell PN, Hebert D, Harvey E, Silverman ED. Clinical and Laboratory Characteristics and Long-Term Outcome of Pediatric Systemic Lupus Erythematosus: A

Longitudinal Study. *J Pediatr*. 2008;152(4):550-556. doi:10.1016/j.jpeds.2007.09.019

15. Webb R, Kelly JA, Somers EC, et al. Early disease onset is predicted by a higher genetic risk for lupus and is associated with a more severe phenotype in lupus patients. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(1):151-156. doi:10.1136/ard.2010.141697
16. Webber D, Cao J, Dominguez D, et al. Association of systemic lupus erythematosus (SLE) genetic susceptibility loci with lupus nephritis in childhood-onset and adult-onset SLE. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2020;59(1):90-98. doi:10.1093/rheumatology/kez220
17. Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol*. 2011;38(SUPPL. 86):3-6. doi:10.3899/jrheum.100951
18. Font J, Cervera R, Espinosa G, et al. Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. *Ann Rheum Dis*. 1998;57(8):456-459. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9797549>. Accessed November 16, 2018.
19. Rood MJ, ten Cate R, van Suijlekom-Smit LW, et al. Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus: clinical presentation and prognosis in 31 patients. *Scand J Rheumatol*. 1999;28(4):222-226. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10503558>. Accessed November 16, 2018.
20. Pande I, Sekharan NG, Kailash S, et al. Analysis of clinical and laboratory profile in Indian childhood systemic lupus erythematosus and its comparison with SLE in adults. *Lupus*. 1993;2(2):83-87. doi:10.1177/096120339300200204
21. Chandrasekaran AN, Rajendran CP, Ramakrishnan S, Madhavan R, Parthiban M. Childhood systemic lupus erythematosus in south India. *Indian J Pediatr*. 61(3):223-229. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7959996>. Accessed November 16, 2018.
22. Ali U, Dalvi R, Merchant R, Mehta K, Chablani A BS, Indian et al. Systemic lupus erythematosus in Indian children. *Indian Pediatr*. 1989;26:868-873.
23. Malleson PN, Fung MY, Rosenberg AM. The incidence of pediatric rheumatic diseases: results from the Canadian Pediatric Rheumatology Association Disease Registry. *J Rheumatol*. 1996;23(11):1981-1987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8923379>. Accessed November 16, 2018.
24. Abujam B, Gupta A, Suri D, Rawat A, Singh S. Trends and predictors of mortality in childhood onset lupus in a single North-Indian centre over 23 years: a retrospective study. *Clin Exp Rheumatol*. 34(3):554-559. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27086699>. Accessed November 16, 2018.
25. Zonana-Nacach A, Rodríguez-Guzmán LM, Jiménez-Balderas FJ, Camargo-Coronel A, Escobedo-de la Peña J, Fraga A. Factores de riesgo relacionados con lupus eritematoso sistémico en población mexicana. *Salud Publica Mex*. 2002;44(3):213-218. doi:10.1590/S0036-36342002000300004
26. Tsokos GC, Lo MS, Reis PC, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(12):716-730. doi:10.1038/nrrheum.2016.186
27. Javinani A, Ashraf-Ganjouei A, Aslani S, Jamshidi A, Mahmoudi M. Exploring the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: a genetic perspective. *Immunogenetics*.

2019;71(4):283-297. doi:10.1007/s00251-019-01103-2

28. Sánchez-Rodríguez SH, Barajas-Vásquez GE, Ramírez-Alvarado ED, Moreno-García A, Barbosa-Cisneros OY. Lupus eritematoso: enfermedad autoinmune sistémica y órgano específica. *Rev Biomédica*. 2004;15(3):173-180. <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=21476>. Accessed December 2, 2018.
29. Mobarrez F, Fuzzi E, Gunnarsson I, et al. Microparticles in the blood of patients with SLE: Size, content of mitochondria and role in circulating immune complexes. *J Autoimmun*. 2019;102(March):142-149. doi:10.1016/j.jaut.2019.05.003
30. Mustelin T, Lood C, Giltiy N V. Sources of pathogenic nucleic acids in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):1-13. doi:10.3389/fimmu.2019.01028
31. Fernandes EC, Silva CA, Braga ALF, Sallum AME, Campos LMA, Farhat SCL. Exposure to air pollutants and disease activity in juvenile-onset systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Care Res*. 2015;67(11):1609-1614. doi:10.1002/acr.22603
32. Bernatsky S, Fournier M, Pineau CA, Clarke AE, Vinet E, Smargiassi A. Associations between ambient fine particulate levels and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Environ Health Perspect*. 2011;119(1):45-49. doi:10.1289/ehp.1002123
33. Bernatsky S, Smargiassi A, Johnson M, et al. Fine particulate air pollution, nitrogen dioxide, and systemic autoimmune rheumatic disease in Calgary, Alberta. *Environ Res*. 2015;140:474-478. doi:10.1016/j.envres.2015.05.007
34. Bernatsky S, Smargiassi A, Barnabe C, et al. Fine particulate air pollution and systemic autoimmune rheumatic disease in two Canadian provinces. *Environ Res*. 2016;146:85-91. doi:10.1016/j.envres.2015.12.021
35. Jarvinen TM, Hellquist A, Zucchelli M, et al. Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes affirms B-cell receptor pathway signalling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population. *Rheumatology*. 2012;51(1):87-92. doi:10.1093/rheumatology/ker263
36. Stegert M, Bock M, Trendelenburg M. Clinical presentation of human C1q deficiency: How much of a lupus? *Mol Immunol*. 2015;67(1):3-11. doi:10.1016/J.MOLIMM.2015.03.007
37. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic Lupus Erythematosus, Complement Deficiency, and Apoptosis. *Adv Immunol*. 2001;76:227-324. doi:10.1016/S0065-2776(01)76021-X
38. Mayilyan KR. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein Cell*. 2012;3(7):487-496. doi:10.1007/s13238-012-2924-6
39. Amano MT, Ferriani VPL, Florido MPC, et al. Genetic analysis of complement C1s deficiency associated with systemic lupus erythematosus highlights alternative splicing of normal C1s gene. *Mol Immunol*. 2008;45(6):1693-1702. doi:10.1016/J.MOLIMM.2007.09.034
40. Manjarrez-Orduño N, Marasco E, Chung SA, et al. CSK regulatory polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus and influences B-cell signaling and activation. *Nat Genet*. 2012;44(11):1227-1230. doi:10.1038/ng.2439
41. Castillejo-López C, Delgado-Vega AM, Wojcik J, et al. Genetic and physical interaction of the B-cell systemic lupus erythematosus-associated genes BANK1 and BLK. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(1):136-142. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200085

42. Manson JJ, Isenberg DA. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Neth J Med*. 2003;61(11):343-346. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14768716>. Accessed December 3, 2018.
43. Armstrong DL, Reiff A, Myones BL, et al. Identification of new SLE-associated genes with a two-step Bayesian study design. *Genes Immun*. 2009;10(5):446-456. doi:10.1038/gene.2009.38
44. Kisiel B, Kosińska J, Wierzbowska M, et al. Differential association of juvenile and adult systemic lupus erythematosus with genetic variants of oestrogen receptors alpha and beta. *Lupus*. 2011;20(1):85-89. doi:10.1177/0961203310381514
45. Jacob CO, Reiff A, Armstrong DL, et al. Identification of novel susceptibility genes in childhood-onset systemic lupus erythematosus using a uniquely designed candidate gene pathway platform. *Arthritis Rheum*. 2007;56(12):4164-4173. doi:10.1002/art.23060
46. Córdova EJ, Martínez-Hernández A, Ramírez-Bello J, et al. HMOX1 promoter (GT)_n polymorphism is associated with childhood-onset systemic lupus erythematosus but not with juvenile rheumatoid arthritis in a Mexican population. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(2):297-301. doi:10.1007/BF00235206
47. Jiménez-Morales S, Velázquez-Cruz R, Ramírez-Bello J, et al. Tumor necrosis factor- α is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol*. 2009;70(4):251-256. doi:10.1016/j.humimm.2009.01.027
48. Yang J, Lu M-M, Lu Y-W, et al. Sex-specific differences in the relationship between the single-nucleotide polymorphism rs2298804 of *FCER1A* and the susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. *Clin Exp Dermatol*. 2013;38(4):410-416. doi:10.1111/ced.12035
49. Han S, Guthridge JM, Harley ITW, et al. Osteopontin and systemic lupus erythematosus association: a probable gene-gender interaction. *PLoS One*. 2008;3(3):e0001757. doi:10.1371/journal.pone.0001757
50. Hughes T, Adler A, Merrill JT, et al. Analysis of autosomal genes reveals gene-sex interactions and higher total genetic risk in men with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(5):694-699. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200385
51. Shen N, Fu Q, Deng Y, et al. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15838-15843. doi:10.1073/pnas.1001337107
52. Wang C-M, Chang S-W, Wu Y-JJ, et al. Genetic variations in Toll-like receptors (TLRs 3/7/8) are associated with systemic lupus erythematosus in a Taiwanese population. *Sci Rep*. 2014;4:3792. doi:10.1038/srep03792
53. McDonald G, Cabal N, Vannier A, et al. Female Bias in Systemic Lupus Erythematosus is Associated with the Differential Expression of X-Linked Toll-Like Receptor 8. *Front Immunol*. 2015;6:457. doi:10.3389/fimmu.2015.00457
54. Lewis MJ, Vyse S, Shields AM, et al. UBE2L3 polymorphism amplifies NF- κ B activation and promotes plasma cell development, linking linear ubiquitination to multiple autoimmune diseases. *Am J Hum Genet*. 2015;96(2):221-234. doi:10.1016/j.ajhg.2014.12.024
55. Verma S, Ismail A, Gao X, et al. The ubiquitin-conjugating enzyme UBCH7 acts as a coactivator for steroid hormone receptors. *Mol Cell Biol*. 2004;24(19):8716-8726.

doi:10.1128/MCB.24.19.8716-8726.2004

56. Sheng Y, Xu J, Wu Y, et al. Association analyses confirm five susceptibility loci for systemic lupus erythematosus in the Han Chinese population. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):85. doi:10.1186/s13075-015-0602-9
57. Koelsch KA, Webb R, Jeffries M, et al. Functional characterization of the MECP2/IRAK1 lupus risk haplotype in human T cells and a human MECP2 transgenic mouse. *J Autoimmun*. 2013;41:168. doi:10.1016/J.JAUT.2012.12.012
58. Sawalha AH, Webb R, Han S, et al. Common variants within MECP2 confer risk of systemic lupus erythematosus. *PLoS One*. 2008;3(3):e1727. doi:10.1371/journal.pone.0001727
59. Li P, Cao C, Luan H, et al. Association of genetic variations in the STAT4 and IRF7/KIAA1542 regions with systemic lupus erythematosus in a Northern Han Chinese population. *Hum Immunol*. 2011;72(3):249-255. doi:10.1016/j.humimm.2010.12.011
60. Bentham J, Morris DL, Cunninghame Graham DS, et al. Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2015;47(12):1457-1464. doi:10.1038/ng.3434
61. H F, G D, G Z, et al. Gender Differences of B Cell Signature in Healthy Subjects Underlie Disparities in Incidence and Course of SLE Related to Estrogen. *J Immunol Res*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/814598
62. Christou EAA, Banos A, Kosmara D, Bertias GK, Boumpas DT. Sexual dimorphism in SLE: above and beyond sex hormones. *Lupus*. 2019;28(1):3-10. doi:10.1177/0961203318815768
63. Liang Y, Tsoi LC, Xing X, et al. A gene network regulated by the transcription factor VGLL3 as a promoter of sex-biased autoimmune diseases. *Nat Immunol*. 2017;18(2):152-160. doi:10.1038/ni.3643
64. Panchanathan R, Shen H, Zhang X, Ho S mei, Choubey D. Mutually positive regulatory feedback loop between interferons and estrogen receptor- α in mice: Implications for sex bias in autoimmunity. *PLoS One*. 2010;5(5). doi:10.1371/journal.pone.0010868
65. Shen H, Panchanathan R, Rajavelu P, Duan X, Gould KA, Choubey D. Gender-dependent Expression of Murine *Irf5* Gene: Implications for Sex Bias in Autoimmunity. *J Mol Cell Biol*. 2010;2(5):284. doi:10.1093/JMCB/MJQ023
66. Banchereau J, Pascual V. Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus and Other Autoimmune Diseases. *Immunity*. 2006;25(3):383-392. doi:10.1016/j.immuni.2006.08.010
67. Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 2003;197(6):711-723. doi:10.1084/jem.20021553
68. Tucker LB, Uribe AG, Fernández M, et al. Adolescent onset of lupus results in more aggressive disease and worse outcomes: Results of a nested matched case-control study within LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LVII). *Lupus*. 2008;17(4):314-322. doi:10.1177/0961203307087875
69. Contreras-Cubas C, García-Ortiz H, Velázquez-Cruz R, et al. Catalytically Impaired TYK2 Variants are Protective Against Childhood- and Adult-Onset Systemic Lupus Erythematosus in Mexicans. *Sci Rep*. 2019;9(1):12165. doi:10.1038/s41598-019-48451-3
70. Reddy MVPL, Velázquez-Cruz R, Baca V, et al. Genetic association of IRF5 with SLE in

Mexicans: Higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Hum Genet.* 2007;121(6):721-727. doi:10.1007/s00439-007-0367-6

71. Kröger W, Mapiye D, Entfellner JBD, Tiffin N. A meta-analysis of public microarray data identifies gene regulatory pathways deregulated in peripheral blood mononuclear cells from individuals with Systemic Lupus Erythematosus compared to those without. *BMC Med Genomics.* 2016;9(1):1-11. doi:10.1186/s12920-016-0227-0
72. Jacob CO, Reiff A, Armstrong DL, et al. Identification of novel susceptibility genes in childhood-onset systemic lupus erythematosus using a uniquely designed candidate gene pathway platform. *Arthritis Rheum.* 2007;56(12):4164-4173. doi:10.1002/art.23060
73. Jacob CO, Zhu J, Armstrong DL, et al. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(15):6256-6261. doi:10.1073/pnas.0901181106
74. Kaufman KM, Zhao J, Kelly JA, et al. Fine mapping of Xq28: both MECP2 and IRAK1 contribute to risk for systemic lupus erythematosus in multiple ancestral groups. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(3):437-444. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201851
75. Contreras-Cubas C, García-Ortiz H, Velázquez-Cruz R, et al. Catalytically Impaired TYK2 Variants are Protective Against Childhood- and Adult-Onset Systemic Lupus Erythematosus in Mexicans. *Sci Rep.* 2019;9(1):12165. doi:10.1038/s41598-019-48451-3
76. Liu G, Tsuruta Y, Gao Z, Park Y-J, Abraham E. Variant IL-1 Receptor-Associated Kinase-1 Mediates Increased NF- κ B Activity. *J Immunol.* 2007;179(6):4125-4134. doi:10.4049/jimmunol.179.6.4125
77. Arcaroli J, Silva E, Maloney JP, et al. Variant IRAK-1 Haplotype Is Associated with Increased Nuclear Factor- κ B Activation and Worse Outcomes in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(12):1335-1341. doi:10.1164/rccm.200603-341OC
78. Dieudé P, Bouaziz M, Guedj M, et al. Evidence of the contribution of the X chromosome to systemic sclerosis susceptibility: Association with the functional IRAK1 196Phe/532Ser haplotype. *Arthritis Rheum.* 2011;63(12):3979-3987. doi:10.1002/art.30640
79. Flannery S, Bowie AG. The interleukin-1 receptor-associated kinases: Critical regulators of innate immune signalling. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(12):1981-1991. doi:10.1016/j.bcp.2010.06.020
80. Gottipati S, Rao NL, Fung-Leung WP. IRAK1: A critical signaling mediator of innate immunity. *Cell Signal.* 2008;20(2):269-276. doi:10.1016/j.cellsig.2007.08.009
81. S. Straford, J.Owen JP. *Kuby Immunology.* 7 Ed. Mc.Graw Hill; 2014.
82. Jacob CO, Zhu J, Armstrong DL, et al. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(15):6256-6261. doi:10.1073/pnas.0901181106
83. Zhai Y, Xu K, Leng RX, et al. Association of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1) gene polymorphisms (rs3027898, rs1059702) with systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. *Inflamm Res.* 2013;62(6):555-560. doi:10.1007/s00011-013-0607-2
84. Li M, Yu D, Ni B, Hao F. Interleukin-1 receptor associated kinase 1 is a potential therapeutic target of anti-inflammatory therapy for systemic lupus erythematosus. *Mol Immunol.* 2017;87:94-101. doi:10.1016/j.molimm.2017.03.018

85. Zhou Z, Tian Z, Zhang M, Zhang Y, Ni B, Hao F. Upregulated IL-1 Receptor-associated Kinase 1 (IRAK1) in Systemic Lupus Erythematosus: IRAK1 Inhibition Represses Th17 Differentiation with Therapeutic Potential. *Immunol Invest.* 2018;47(5):468-483. doi:10.1080/08820139.2018.1458105
86. Li D, Guo B, Wu H, Tan L, Chang C, Lu Q. Interleukin-17 in systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *Autoimmunity.* 2015;48(6):353-361. doi:10.3109/08916934.2015.1037441
87. Martin JC, Baeten DL, Josien R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2014;154(1):1-12. doi:10.1016/j.clim.2014.05.004
88. Rother N, Van der Vlag J. Disturbed T cell signaling and altered Th17 and regulatory T cell subsets in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2015;6(NOV). doi:10.3389/fimmu.2015.00610
89. Shin MS, Lee N, Kang I. Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: Update focusing on Th17 cells. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23(5):444-448. doi:10.1097/BOR.0b013e328349a255
90. Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, et al. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to Methylated DNA. *Cell.* 1992;69(6):905-914. doi:10.1016/0092-8674(92)90610-O
91. Amir RE, Van Den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl- CpG-binding protein 2. *Nat Genet.* 1999;23(2):185-188. doi:10.1038/13810
92. Hendrich B, Bird A. Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins. *Mol Cell Biol.* 1998;18(11):6538-6547. doi:10.1128/mcb.18.11.6538
93. Hendrich B, Tweedie S. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet.* 2003;19(5):269-277. doi:10.1016/S0168-9525(03)00080-5
94. Ballestar E, Pile LA, Wassarman DA, Wolffe AP, Wade PA. A Drosophila MBD family member is a transcriptional corepressor associated with specific genes. *Eur J Biochem.* 2001;268(20):5397-5406. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02480.x
95. Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, et al. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem.* 2003;278(26):24132-24138. doi:10.1074/jbc.M302283200
96. Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I, Bird AP. DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol Cell.* 2005;19(5):667-678. doi:10.1016/j.molcel.2005.07.021
97. Ragione F Della, Filosa S, Scalabri F, D'Esposito M. MeCP2 as a genome-wide modulator: The renewal of an old story. *Front Genet.* 2012;3(SEP). doi:10.3389/fgene.2012.00181
98. Bienvenu T, Chelly J. Molecular genetics of Rett syndrome: When DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet.* 2006;7(6):415-426. doi:10.1038/nrg1878
99. Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(21):4886-4892. doi:10.1093/nar/21.21.4886
100. Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in

- genomic chromatin. *Cell*. 1997;88(4):471-481. doi:10.1016/S0092-8674(00)81887-5
101. Della Ragione F, Vacca M, Fioriniello S, Pepe G, D'Esposito M. MECP2, a multi-talented modulator of chromatin architecture. *Brief Funct Genomics*. 2016;15(6):420-431. doi:10.1093/bfgp/elw023
 102. D'Esposito M, Quaderi NA, Ciccodicola A, et al. Isolation, physical mapping, and Northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. *Mamm Genome*. 1996;7(7):533-535. doi:10.1007/s003359900157
 103. Vacca M, Della Ragione F, Scalabri F, D'Esposito M. X inactivation and reactivation in X-linked diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;56:78-87. doi:10.1016/j.semcdb.2016.03.009
 104. Dragich JM, Kim YH, Arnold AP, Schanen NC. Differential distribution of the MeCP2 splice variants in the postnatal mouse brain. *J Comp Neurol*. 2007;501(4):526-542. doi:10.1002/cne.21264
 105. Kriaucionis S, Bird A. The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1818-1823. doi:10.1093/nar/gkh349
 106. Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, et al. A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet*. 2004;36(4):339-341. doi:10.1038/ng1327
 107. Klose R, Bird A. MeCP2 Repression Goes Nonglobal. *Science (80-)*. 2003;302(5646):793-795. doi:10.1126/science.1091762
 108. Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998;393(6683):386-389. doi:10.1038/30764
 109. Ben-Shachar S, Chahrour M, Thaller C, Shaw CA, Zoghbi HY. Mouse models of MeCP2 disorders share gene expression changes in the cerebellum and hypothalamus. *Hum Mol Genet*. 2009;18(13):2431-2442. doi:10.1093/hmg/ddp181
 110. Chahrour M, Sung YJ, Shaw C, et al. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science (80-)*. 2008;320(5880):1224-1229. doi:10.1126/science.1153252
 111. Sugino K, Hempel CM, Okaty BW, et al. Cell-type-specific repression by methyl-CpG-binding protein 2 is biased toward long genes. *J Neurosci*. 2014;34(38):12877-12883. doi:10.1523/JNEUROSCI.2674-14.2014
 112. Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, Jaenisch R. Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15536-15541. doi:10.1073/pnas.242566899
 113. Ragione F Della, Filosa S, Scalabri F, D'Esposito M. MeCP2 as a genome-wide modulator: the renewal of an old story. *Front Genet*. 2012;3(SEP):181. doi:10.3389/fgene.2012.00181
 114. De Felice C, Rossi M, Leoncini S, et al. Inflammatory lung disease in Rett syndrome. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:560120. doi:10.1155/2014/560120
 115. Cortelazzo A, De Felice C, Guerranti R, et al. Subclinical inflammatory status in Rett syndrome. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:480980. doi:10.1155/2014/480980
 116. Derecki NC, Privman E, Kipnis J. Rett syndrome and other autism spectrum disorders brain

- diseases of immune malfunction. *Mol Psychiatry*. 2010;15(4):355-363. doi:10.1038/mp.2010.21
117. Jiang S, Li C, McRae G, et al. MeCP2 reinforces STAT3 signaling and the generation of effector CD4 + T cells by promoting miR-124-mediated suppression of SOCS5. *Sci Signal*. 2014;7(316):ra25. doi:10.1126/scisignal.2004824
 118. Li C, Jiang S, Liu SQ, et al. MeCP2 enforces Foxp3 expression to promote regulatory T cells' resilience to inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):E2807-16. doi:10.1073/pnas.1401505111
 119. O'Driscoll CM, Lima MP, Kaufmann WE, Bressler JP. Methyl CpG binding protein 2 deficiency enhances expression of inflammatory cytokines by sustaining NF- κ B signaling in myeloid derived cells. *J Neuroimmunol*. 2015;283:23-29. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.04.005
 120. Leoncini S, De Felice C, Signorini C, et al. Cytokine Dysregulation in MECP2- and CDKL5-Related Rett Syndrome: Relationships with Aberrant Redox Homeostasis, Inflammation, and ω -3 PUFAs. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:421624. doi:10.1155/2015/421624
 121. Miralvès J, Magdeleine E, Kaddoum L, Brun H, Peries S, Joly E. High levels of MeCP2 depress MHC class I expression in neuronal cells. *PLoS One*. 2007;2(12):e1354. doi:10.1371/journal.pone.0001354
 122. De Felice C, Leoncini S, Signorini C, et al. Rett syndrome: An autoimmune disease? *Autoimmun Rev*. 2016;15(4):411-416. doi:10.1016/j.autrev.2016.01.011
 123. Lebowitz B, Ludvigsson JF, Green PHR. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ*. 2015;351. doi:10.1136/bmj.h4347
 124. AM P, F N, F R-F, et al. Immune Dysfunction in Rett Syndrome Patients Revealed by High Levels of Serum anti-N(Glc) IgM Antibody Fraction. *J Immunol Res*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/260973
 125. Gratchev V V., Bashina VM, Klushnik TP, Ulas VU, Gorbachevskaya NL, Vorsanova SG. Clinical, neurophysiological and immunological correlations in classical Rett syndrome. In: *Brain and Development*. Vol 23. Brain Dev; 2001. doi:10.1016/S0387-7604(01)00359-X
 126. Ramaekers VT, Sequeira JM, Artuch R, et al. Folate receptor autoantibodies and spinal fluid 5-methyltetrahydrofolate deficiency in Rett syndrome. *Neuropediatrics*. 2007;38(4):179-183. doi:10.1055/s-2007-991148
 127. Miralvès J, Magdeleine E, Kaddoum L, Brun H, Peries S, Joly E. High levels of MeCP2 depress MHC class I expression in neuronal cells. *PLoS One*. 2007;2(12). doi:10.1371/journal.pone.0001354
 128. Yung RL, Quddus J, Chrisp CE, Johnson KJ, Richardson BC. Mechanism of drug-induced lupus. I. Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors in vitro cause autoimmunity in vivo. *J Immunol*. 1995;154(6):3025-3035. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533191>. Accessed June 3, 2020.
 129. Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res*. 2010;20(2):170-179. doi:10.1101/gr.100289.109
 130. Sullivan KE. Genetics of systemic lupus erythematosus: Clinical implications. *Rheum Dis Clin North Am*. 2000;26(2):229-256. doi:10.1016/S0889-857X(05)70137-X

131. Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Trends Mol Med.* 2011;17(12):714-724. doi:10.1016/j.molmed.2011.07.005
132. Hedrich CM. Mechanistic aspects of epigenetic dysregulation in SLE. *Clin Immunol.* 2018;196:3-11. doi:10.1016/j.clim.2018.02.002
133. Hedrich CM, Crispin JC, Tsokos GC. Epigenetic regulation of cytokine expression in systemic lupus erythematosus with special focus on T cells. *Autoimmunity.* 2014;47(4):234-241. doi:10.3109/08916934.2013.801462
134. Lei W, Luo Y, Yan K, et al. Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis. *Scand J Rheumatol.* 2009;38(5):369-374. doi:10.1080/03009740902758875
135. Renaudineau Y, Youinou P. Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation. *Keio J Med.* 2011;60(1):10-16. doi:10.2302/kjm.60.10
136. Zouali M. Epigenetics in lupus. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1217(1):154-165. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05831.x
137. Liu Y, Chen Y, Richardson B. Decreased DNA methyltransferase levels contribute to abnormal gene expression in "senescent" CD4+CD28- T cells. *Clin Immunol.* 2009;132(2):257-265. doi:10.1016/j.clim.2009.03.529
138. Lal G, Zhang N, van der Touw W, et al. Epigenetic Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory T Cells by DNA Methylation. *J Immunol.* 2009;182(1):259-273. doi:10.4049/jimmunol.182.1.259
139. Lu Q, Zhao M, Tang J, et al. Hypomethylation of IL10 and IL13 promoters in CD4+T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010. doi:10.1155/2010/931018
140. Lu Q, Wu A, Richardson BC. Demethylation of the Same Promoter Sequence Increases CD70 Expression in Lupus T Cells and T Cells Treated with Lupus-Inducing Drugs. *J Immunol.* 2005;174(10):6212-6219. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6212
141. Singer NG, Richardson BC, Powers D, et al. Role of the CD6 glycoprotein in antigen-specific and autoreactive responses of cloned human T lymphocytes. *Immunology.* 1996;88(4):537-543. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8881754>. Accessed June 4, 2020.
142. Lu Q, Kaplan M, Ray D, et al. Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002;46(5):1282-1291. doi:10.1002/art.10234
143. Lu Q, Wu A, Tesmer L, Ray D, Yousif N, Richardson B. Demethylation of CD40LG on the Inactive X in T Cells from Women with Lupus. *J Immunol.* 2007;179(9):6352-6358. doi:10.4049/jimmunol.179.9.6352
144. Lu Q, Wu A, Tesmer L, Ray D, Yousif N, Richardson B. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J Immunol.* 2007;179(9):6352-6358. doi:10.4049/JIMMUNOL.179.9.6352
145. Lu Q, Kaplan M, Ray D, et al. Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002;46(5):1282-1291. doi:10.1002/art.10234
146. Luo Y, Zhang X, Zhao M, Lu Q. DNA demethylation of the perforin promoter in CD4+ T cells from patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *J Dermatol Sci.* 2009;56(1):33-36.

doi:10.1016/j.jdermsci.2009.06.010

147. Lu Q, Wu A, Richardson BC. Demethylation of the same promoter sequence increases CD70 expression in lupus T cells and T cells treated with lupus-inducing drugs. *J Immunol.* 2005;174(10):6212-6219. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879118>. Accessed November 30, 2018.
148. Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, Gross L, Hanash S, Johnson M. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1990;33(11):1665-1673. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2242063>. Accessed November 30, 2018.
149. Joseph S, George NI, Green-Knox B, et al. Epigenome-wide association study of peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus: Identifying DNA methylation signatures associated with interferon-related genes based on ethnicity and SLEDAI. *J Autoimmun.* 2019;96:147-157. doi:10.1016/j.jaut.2018.09.007
150. Yeung KS, Lee TL, Mok MY, et al. Cell lineage-specific genome-wide DNA methylation analysis of patients with paediatric-onset systemic lupus erythematosus. *Epigenetics.* 2019;14(4):341-351. doi:10.1080/15592294.2019.1585176
151. Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med.* 2003;197(6):711-723. doi:10.1084/jem.20021553
152. Hedrich CM, Crispin JC, Tsokos GC. Epigenetic regulation of cytokine expression in systemic lupus erythematosus with special focus on T cells. *Autoimmunity.* 2014;47(4):234-241. doi:10.3109/08916934.2013.801462
153. Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Trends Mol Med.* 2011;17(12):714-724. doi:10.1016/j.molmed.2011.07.005
154. Hedrich CM, Crispin JC, Rauen T, et al. cAMP response element modulator α controls IL2 and IL17A expression during CD4 lineage commitment and subset distribution in lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(41):16606-16611. doi:10.1073/pnas.1210129109
155. Rauen T, Hedrich CM, Juang YT, Tenbrock K, Tsokos GC. cAMP-responsive element modulator (CREM) α protein induces interleukin 17A expression and mediates epigenetic alterations at the interleukin-17A gene locus in patients with systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem.* 2011;286(50):43437-43446. doi:10.1074/jbc.M111.299313
156. Hedrich CM, Crispin JC, Rauen T, et al. CAMP responsive element modulator (CREM) α mediates chromatin remodeling of CD8 during the generation of CD3+CD4-CD8- T cells. *J Biol Chem.* 2014;289(4):2361-2370. doi:10.1074/jbc.M113.523605
157. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(9):1400-1412. doi:10.1002/art.40930
158. Karolchik D, Barber GP, Casper J, et al. The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):D764-D770. doi:10.1093/nar/gkt1168
159. Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, et al. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8(1):6. doi:10.1186/1756-8935-8-6
160. Smyth GK. limma: Linear Models for Microarray Data. In: *Bioinformatics and Computational*

Biology Solutions Using R and Bioconductor. New York: Springer-Verlag; 2005:397-420.
doi:10.1007/0-387-29362-0_23

161. Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, et al. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics*. 2013;29(2):189-196. doi:10.1093/bioinformatics/bts680
162. Wang T, Guan W, Lin J, et al. A systematic study of normalization methods for Infinium 450K methylation data using whole-genome bisulfite sequencing data. *Epigenetics*. 2015;10(7):662-669. doi:10.1080/15592294.2015.1057384
163. Zhou W, Laird PW, Shen H. Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(4):e22. doi:10.1093/nar/gkw967
164. Nordlund J, Bäcklin CL, Wahlberg P, et al. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol*. 2013;14(9):r105. doi:10.1186/gb-2013-14-9-r105
165. Horvath S, Zhang Y, Langfelder P, et al. Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biol*. 2012;13(10):R97. doi:10.1186/gb-2012-13-10-r97
166. Dedeurwaerder S, Defrance M, Calonne E, Denis H, Sotiriou C, Fuks F. Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. *Epigenomics*. 2011;3(6):771-784. doi:10.2217/epi.11.105
167. Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium (®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*. 2012;4(3):325-341. doi:10.2217/epi.12.21
168. Fortin J-P, Labbe A, Lemire M, et al. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biol*. 2014;15(11):503. doi:10.1186/s13059-014-0503-2
169. Yuan Tian, Tiffany J Morris, Amy P Webster, Zhen Yang, Stephan Beck, Andrew Feber and AET. ChAMP - The Chip Analysis Methylation Pipeline. 2011.
<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/ChAMP/inst/doc/ChAMP.html>.
170. Houseman EA, Accomando WP, Koestler DC, et al. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics*. 2012;13(1):86. doi:10.1186/1471-2105-13-86
171. Christou EAA, Banos A, Kosmara D, Bertsiyas GK, Boumpas DT. Sexual dimorphism in SLE: above and beyond sex hormones. *Lupus*. 2019;28(1):3-10. doi:10.1177/0961203318815768
172. Aslani S, Mahmoudi M, Karami J, Jamshidi AR, Malekshahi Z, Nicknam MH. Epigenetic alterations underlying autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2016;49(2):69-83. doi:10.3109/08916934.2015.1134511
173. Brooks WH, Le Dantec C, Pers JO, Youinou P, Renaudineau Y. Epigenetics and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2010;34(3):J207-19. doi:10.1016/j.jaut.2009.12.006
174. Uchiumi F, Fujikawa M, Miyazaki S, Tanuma S. Implication of bidirectional promoters containing duplicated GGAA motifs of mitochondrial function-associated genes. *AIMS Mol Sci*. 2013;1(1):1-26. doi:10.3934/molsci.2013.1.1
175. Miao Y-L. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of ulcerative colitis

- patients. *World J Gastroenterol*. 2013;19(21):3339. doi:10.3748/wjg.v19.i21.3339
176. Malakootian M, Mirzadeh Azad F, Naeli P, et al. Novel spliced variants of OCT4, OCT4C and OCT4C1, with distinct expression patterns and functions in pluripotent and tumor cell lines. *Eur J Cell Biol*. 2017;96(4):347-355. doi:10.1016/j.ejcb.2017.03.009
177. Mirzadeh Azad F, Malakootian M, Mowla SJ. lncRNA PSORS1C3 is regulated by glucocorticoids and fine-tunes OCT4 expression in non-pluripotent cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-019-44827-7
178. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet*. 2015;47(3):199-208. doi:10.1038/ng.3192
179. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(2):397-406. doi:10.1074/mcp.M113.035600
180. Renzo F Di, Doneda L, Menegola E, et al. The murine Pou6f2 gene is temporally and spatially regulated during kidney embryogenesis and its human homolog is overexpressed in a subset of Wilms tumors. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28(12):791-797. doi:10.1097/MPH.0b013e31802d3e65
181. Nakou M, Knowlton N, Frank MB, et al. Gene expression in systemic lupus erythematosus: Bone marrow analysis differentiates active from inactive disease and reveals apoptosis and granulopoiesis signatures. *Arthritis Rheum*. 2008;58(11):3541-3549. doi:10.1002/art.23961
182. Waldron J, Raymond W, Ostli-Eilertsen G, Nossent J. Insulin-like growth factor-1 (IGF1) in systemic lupus erythematosus: relation to disease activity, organ damage and immunological findings. *Lupus*. 2018;27(6):963-970. doi:10.1177/0961203318756288
183. Hirohata S. Epidemiology of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. In: *Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis, Clinical Aspects and Treatment*. Springer International Publishing; 2018:1-13. doi:10.1007/978-3-319-76496-2_1
184. Karin M, Delhase M. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: Key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol*. 2000;12(1):85-98. doi:10.1006/smim.2000.0210
185. Ben-Neriah Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol*. 2002;3(1):20-26. doi:10.1038/ni0102-20
186. Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, et al. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol*. 2002;29(10):2045-2052.
187. Lee YH, Andersen JB, Song HT, et al. Definition of ubiquitination modulator COP1 as a novel therapeutic target in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2010;70(21):8264-8269. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0749
188. Lee JS, Chu IS, Heo J, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology*. 2004;40(3):667-676. doi:10.1002/hep.20375
189. Kato J ya, Yoneda-Kato N. Mammalian COP9 signalosome. *Genes to Cells*. 2009;14(11):1209-1225. doi:10.1111/j.1365-2443.2009.01349.x
190. Wei N, Deng XW. COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in arabidopsis. *Plant Cell*. 1992;4(12):1507-1518. doi:10.1105/tpc.4.12.1507
191. Chamovitz DA. Revisiting the COP9 signalosome as a transcriptional regulator. *EMBO Rep*.

2009;10(4):352-358. doi:10.1038/embor.2009.33

192. Chamovitz DA, Glickman M. The COP9 signalosome. *Curr Biol.* 2002;12(7). doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.112449
193. Sone T, Saeki Y, Toh-E A, Yokosawa H. Sem1p Is a novel subunit of the 26 S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2004;279(27):28807-28816. doi:10.1074/jbc.M403165200
194. Jani D, Lutz S, Hurt E, Laskey RA, Stewart M, Wickramasinghe VO. Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(10):4562-4573. doi:10.1093/nar/gks059
195. Ling Y, Xu X, Hao J, et al. Aberrant methylation of the THRB gene in tissue and plasma of breast cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;196(2):140-145. doi:10.1016/j.cancergencyto.2009.09.010
196. Li Z, Meng ZH, Chandrasekaran R, et al. Biallelic inactivation of the thyroid hormone receptor β 1 gene in early stage breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62(7):1939-1943.
197. Joseph B, Ji M, Liu D, Hou P, Xing MM. Lack of mutations in the thyroid hormone receptor (TR) α and β genes but frequent hypermethylation of the TR β gene in differentiated thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(12):4766-4770. doi:10.1210/jc.2007-0812
198. Brönnegård M, Törring O, Böös J, Sylven C, Marcus C, Wallin G. Expression of thyrotropin receptor and thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79(2):384-389. doi:10.1210/jcem.79.2.8045952
199. K.H. L-. Increased invasive activity of human hepatocellular carcinoma cells is associated with an overexpression of thyroid hormone beta 1 nuclear receptor... - PubMed - NCBI. Cancer Lett. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529211>. Accessed May 17, 2020.
200. Ladd-Acosta C, Hansen KD, Briem E, Fallin MD, Kaufmann WE, Feinberg AP. Common DNA methylation alterations in multiple brain regions in autism. *Mol Psychiatry.* 2014;19(8):862-871. doi:10.1038/mp.2013.114
201. Tan Q, Li S, Frost M, et al. Epigenetic signature of preterm birth in adult twins. *Clin Epigenetics.* 2018;10(1):87. doi:10.1186/s13148-018-0518-8
202. Chatterton Z, Hartley BJ, Seok MH, et al. In utero exposure to maternal smoking is associated with DNA methylation alterations and reduced neuronal content in the developing fetal brain. *Epigenetics and Chromatin.* 2017;10(1). doi:10.1186/s13072-017-0111-y
203. Lindstedt I, Lindgren MA, Andersson E, Engström W. The WT1 gene--its role in tumourigenesis and prospects for immunotherapeutic advances. *In Vivo.* 2014;28(5):675-681. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189877>. Accessed May 28, 2020.
204. Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y, et al. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene2transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood.* 2017;130(18):1985-1994. doi:10.1182/blood-2017-06-791202
205. Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8+ cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood.* 2000;95(1):286-293. doi:10.1182/blood.V95.1.286

206. Gao L, Bellantuono I, Elsässer A, et al. Selective elimination of leukemic CD34+ progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1. *Blood*. 2000;95(7):2198-2203. doi:10.1182/blood.V95.7.2198
207. Tsuboi A, Oka Y, Udaka K, et al. Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer Immunol Immunother*. 2002;51(11-12):614-620. doi:10.1007/s00262-002-0328-9
208. Bui NLC, Pandey V, Zhu T, Ma L, Basappa, Lobie PE. Bad phosphorylation as a target of inhibition in oncology. *Cancer Lett*. 2018;415:177-186. doi:10.1016/j.canlet.2017.11.017
209. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *J Immunol*. 2010;185(11):6413-6419. doi:10.4049/jimmunol.1001829
210. Ganti S, Taylor SL, Aboud OA, et al. Kidney tumor biomarkers revealed by simultaneous multiple matrix metabolomics analysis. *Cancer Res*. 2012;72(14):3471-3479. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3105
211. Grabacka M, Plonka PM, Urbanska K, Reiss K. Peroxisome proliferator - Activated receptor α activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt. *Clin Cancer Res*. 2006;12(10):3028-3036. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2556
212. Liu D-C, Zang C-B, Liu H-Y, Possinger K, Fan S-G, Elstner E. A novel PPAR alpha/gamma dual agonist inhibits cell growth and induces apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25(10):1312-1319. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15456533>. Accessed June 16, 2020.
213. Peters JM, Cheung C, Gonzalez FJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- α and liver cancer: Where do we stand? *J Mol Med*. 2005;83(10):774-785. doi:10.1007/s00109-005-0678-9
214. Aimudula A, Nasier H, Yang Y, et al. PPAR α mediates sunitinib resistance via NF- κ B activation in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(5):2389-2400. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31938351>. Accessed June 16, 2020.
215. Suchanek KM, May FJ, Robinson JA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog*. 2002;34(4):165-171. doi:10.1002/mc.10061
216. Imgenberg-Kreuz J, Almlöf JC, Leonard D, et al. DNA methylation mapping identifies gene regulatory effects in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(5):736-743. doi:10.1136/annrheumdis-2017-212379
217. Chin EWM, Goh ELK. MeCP2 dysfunction in rett syndrome and neuropsychiatric disorders. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 2011. Humana Press Inc.; 2019:573-591. doi:10.1007/978-1-4939-9554-7_33
218. Lu Q, Wu A, Tesmer L, Ray D, Yousif N, Richardson B. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J Immunol*. 2007;179(9):6352-6358. doi:10.4049/JIMMUNOL.179.9.6352
219. Long H, Yin H, Wang L, Gershwin ME, Lu Q. The critical role of epigenetics in systemic lupus erythematosus and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2016;74:118-138. doi:10.1016/j.jaut.2016.06.020
220. Miller S, Tsou PS, Coit P, et al. Hypomethylation of STAT1 and HLA-DRB1 is associated with type-I interferon-dependent HLA-DRB1 expression in lupus CD8+ T cells. *Ann Rheum Dis*.

2019;78(4):519-528. doi:10.1136/annrheumdis-2018-214323

ANEXO 1. DMP (Sitios CpG). COMPARATIVO HomC vs HomNC

CpG	P. Valor	adj. P.Val	HomNC _LES _AVG	HomC _LES _AVG	Delta Beta	CHR	GEN	Sitio en isla CpG
cg24405174	0.005	0.661	0.48	0.66	0.18	7	PL-5283	TSS1500-shore
cg26500457	0.008	0.661	0.73	0.90	0.17	11	CRTAM	Body-opensea
cg10144400	0.009	0.661	0.36	0.51	0.14	16		IGR-island
cg16720578	0.006	0.661	0.22	0.35	0.14	14		IGR-shelf
cg05767404	0.006	0.661	0.31	0.44	0.13	1	C1orf150	Body-opensea
cg14577707	0.005	0.661	0.61	0.73	0.13	4		IGR-opensea
cg01228271	0.002	0.661	0.72	0.85	0.13	3		IGR-shelf
cg01115380	0.008	0.661	0.34	0.46	0.12	6		IGR-shelf
cg02380802	0.002	0.661	0.50	0.62	0.12	16		IGR-shore
cg14883993	0.007	0.661	0.65	0.77	0.12	19	NFIC	Body-opensea
cg15059804	0.002	0.661	0.44	0.55	0.11	1	ZNF362	3'UTR-opensea
cg27158636	0.007	0.661	0.22	0.33	0.11	16		IGR-island
cg01810623	0.002	0.661	0.53	0.64	0.11	12		IGR-opensea
cg06381350	0.002	0.661	0.75	0.85	0.10	19	IRGC	TSS1500-shelf
cg13297560	0.007	0.661	0.58	0.68	0.10	15	IGF1R	Body-opensea
cg12363404	0.010	0.661	0.82	0.92	0.10	20	HNF4A	Body-opensea
cg08681685	0.009	0.661	0.44	0.54	0.10	16		IGR-island
cg08693082	0.005	0.661	0.74	0.84	0.10	2	UGGT1	Body-shelf
cg25711003	0.004	0.661	0.49	0.58	0.10	3	PHLDB2	5'UTR-opensea
cg04248937	0.001	0.661	0.81	0.90	0.09	5	SLC6A19	3'UTR-opensea
cg09744766	0.006	0.661	0.14	0.24	0.09	16		IGR-island
cg19494588	0.004	0.661	0.38	0.47	0.09	5	PPP2R2B	Body-opensea
cg19636519	0.001	0.661	0.29	0.38	0.09	7		IGR-opensea
cg10464773	0.001	0.661	0.51	0.60	0.09	6		IGR-opensea
cg27183454	0.003	0.661	0.72	0.81	0.09	6	SCAND3	Body-opensea
cg18516067	0.007	0.661	0.67	0.76	0.09	4		IGR-opensea
cg06098368	0.008	0.661	0.18	0.27	0.09	7		IGR-island
cg02907402	0.008	0.661	0.59	0.68	0.09	6	TRIM31	Body-opensea
cg21862992	0.008	0.661	0.45	0.54	0.09	11		IGR-opensea
cg07262395	0.007	0.661	0.42	0.51	0.09	10	MXI1	TSS1500-shore
cg14465207	0.006	0.661	0.55	0.64	0.08	2	PDIA6	Body-shore
cg26229092	0.009	0.661	0.83	0.92	0.08	10	ZEB1	3'UTR-opensea
cg07871442	0.010	0.661	0.17	0.25	0.08	5		IGR-island
cg24962827	0.006	0.661	0.64	0.72	0.08	3	THRB	Body-opensea

cg22435132	0.009	0.661	0.66	0.74	0.08	17	BCAS3	Body-opensea
cg21127601	0.009	0.661	0.78	0.87	0.08	8	DLGAP2	5'UTR-island
cg21978579	0.005	0.661	0.85	0.93	0.08	18		IGR-island
cg18124213	0.003	0.661	0.77	0.85	0.08	7		IGR-opensea
cg27041619	0.006	0.661	0.41	0.49	0.08	6		IGR-opensea
cg15701166	0.005	0.661	0.73	0.81	0.08	18		IGR-shelf
cg00219626	0.004	0.661	0.28	0.36	0.08	6		IGR-shore
cg22021022	0.004	0.661	0.73	0.81	0.08	1	NMNAT2	Body-opensea
cg16290737	0.004	0.661	0.17	0.24	0.08	14	CHGA	TSS200-island
cg00842595	0.004	0.661	0.44	0.52	0.08	17	C17orf97	Body-island
cg18405330	0.004	0.661	0.14	0.21	0.08	6		IGR-opensea
cg07619170	0.004	0.661	0.79	0.86	0.08	2	STAT4	Body-opensea
cg24599037	0.007	0.661	0.64	0.72	0.07	3	KIAA2018	5'UTR-opensea
cg17319011	0.005	0.661	0.67	0.74	0.07	2	RBMS1	Body-opensea
cg22737154	0.007	0.661	0.42	0.49	0.07	2		IGR-opensea
cg02688903	0.007	0.661	0.77	0.84	0.07	5	SRP19	TSS1500-shore
cg08262002	0.005	0.661	0.61	0.68	0.07	4	LDB2	Body-opensea
cg26015539	0.004	0.661	0.80	0.87	0.07	6		IGR-shelf
cg14709479	0.010	0.661	0.26	0.33	0.07	1	TTLL10	TSS1500-shore
cg16799737	0.004	0.661	0.72	0.80	0.07	8	HMBX1	5'UTR-opensea
cg15354877	0.007	0.661	0.78	0.85	0.07	12		IGR-opensea
cg21175976	0.007	0.661	0.26	0.33	0.07	8	BLK	Body-island
cg27324781	0.009	0.661	0.78	0.85	0.07	16		IGR-shelf
cg14995160	0.005	0.661	0.69	0.76	0.07	10	SLC18A2	3'UTR-opensea
cg24363820	0.003	0.661	0.43	0.50	0.07	22	CPT1B	5'UTR-island
cg19445044	0.001	0.661	0.42	0.49	0.07	12		IGR-opensea
cg18559571	0.004	0.661	0.83	0.90	0.07	12	LIMA1	3'UTR-opensea
cg19336191	0.008	0.661	0.79	0.86	0.07	11	RDX	Body-opensea
cg13512374	0.007	0.661	0.76	0.83	0.07	14	MARK3	Body-opensea
cg11808699	0.005	0.661	0.32	0.39	0.07	15	IL16	Body-opensea
cg18712348	0.002	0.661	0.77	0.83	0.07	5	CTNNA1	Body-opensea
cg25611443	0.007	0.661	0.81	0.87	0.07	1	ELK4	TSS1500-shore
cg01004980	0.006	0.661	0.63	0.69	0.07	3	PRKAR2A	Body-shore
cg02206980	0.007	0.661	0.20	0.26	0.06	6	SIRT5	TSS1500-shore
cg08159406	0.002	0.661	0.80	0.86	0.06	11		IGR-opensea
cg14020037	0.010	0.661	0.82	0.89	0.06	9		IGR-shelf

cg17662774	0.009	0.661	0.82	0.89	0.06	15		IGR-opensea
cg10087780	0.003	0.661	0.53	0.59	0.06	10		IGR-opensea
cg21443274	0.002	0.661	0.83	0.90	0.06	8	ZFPM2	Body-opensea
cg23061725	0.008	0.661	0.46	0.53	0.06	2	CASP8	5'UTR-opensea
cg23024358	0.004	0.661	0.81	0.87	0.06	10	SORCS1	Body-opensea
cg08170583	0.008	0.661	0.82	0.88	0.06	8	DOCK5	3'UTR-opensea
cg06532613	0.010	0.661	0.75	0.81	0.06	5	IPO11	TSS1500-opensea
cg14285533	0.008	0.661	0.09	0.16	0.06	7		IGR-shore
cg11721273	0.008	0.661	0.80	0.86	0.06	1	RFWD2	Body-opensea
cg04083076	0.003	0.661	0.55	0.61	0.06	1	SLC19A2	Body-shelf
cg25369262	0.004	0.661	0.41	0.48	0.06	1	TSPAN1	Body-opensea
cg05237374	0.003	0.661	0.61	0.68	0.06	14	GPHN	Body-shelf
cg11737757	0.010	0.661	0.54	0.60	0.06	1		IGR-island
cg15411840	0.006	0.661	0.75	0.81	0.06	6	CCDC162	TSS200-shelf
cg19408149	0.009	0.661	0.84	0.90	0.06	21	PRDM15	Body-island
cg16722001	0.001	0.661	0.69	0.75	0.06	10	VCL	Body-opensea
cg24313756	0.003	0.661	0.78	0.84	0.06	6		IGR-opensea
cg14545914	0.008	0.661	0.82	0.88	0.06	12	C12orf40	TSS1500-opensea
cg12388707	0.003	0.661	0.84	0.90	0.06	5		IGR-opensea
cg05495478	0.005	0.661	0.42	0.48	0.06	6		IGR-opensea
cg11071900	0.008	0.661	0.72	0.78	0.06	7	ANKIB1	5'UTR-shelf
cg27641240	0.010	0.661	0.86	0.92	0.06	5	C5orf56	Body-opensea
cg16102706	0.006	0.661	0.86	0.92	0.06	1	LYST	Body-opensea
cg22987992	0.010	0.661	0.75	0.81	0.06	3	FNDC3B	Body-opensea
cg13459077	0.003	0.661	0.83	0.89	0.06	9	ZCCHC7	Body-opensea
cg27296341	0.007	0.661	0.60	0.66	0.06	6	IPCEF1	Body-opensea
cg23050442	0.008	0.661	0.25	0.31	0.06	10	GAD2	TSS200-island
cg14369333	0.005	0.661	0.81	0.87	0.06	6		IGR-opensea
cg14288266	0.008	0.661	0.87	0.93	0.06	2	CTLA4	3'UTR-opensea
cg08124986	0.001	0.661	0.58	0.63	0.06	4		IGR-opensea
cg20853889	0.005	0.661	0.65	0.71	0.06	15		IGR-opensea
cg18134577	0.002	0.661	0.84	0.90	0.06	5	EXOC3	Body-opensea
cg22799510	0.007	0.661	0.82	0.87	0.06	3	PROK2	3'UTR-opensea
cg00687674	0.009	0.661	0.36	0.42	0.06	15	MIR548H4	Body-opensea
cg03905134	0.009	0.661	0.82	0.88	0.06	12		IGR-opensea

cg24406162	0.007	0.661	0.65	0.71	0.06	1	RPL11	TSS1500-shore
cg17722435	0.006	0.661	0.62	0.67	0.06	7		IGR-opensea
cg10608948	0.001	0.661	0.32	0.38	0.06	17		IGR-opensea
cg01802532	0.007	0.661	0.41	0.47	0.06	4	NMU	Body-opensea
cg27089146	0.009	0.661	0.87	0.93	0.06	2	ZNF512	Body-shelf
cg00727586	0.008	0.661	0.83	0.89	0.06	8		IGR-shore
cg07979579	0.002	0.661	0.86	0.92	0.06	13	C13orf1	Body-opensea
cg19449969	0.009	0.661	0.77	0.83	0.06	12	PPHLN1	Body-opensea
cg01963297	0.003	0.661	0.45	0.51	0.06	1	KCNN3	1stExon-opensea
cg22489931	0.003	0.661	0.26	0.32	0.06	15	RGMA	Body-shore
cg21500166	0.005	0.661	0.25	0.31	0.06	12	KCNC2	1stExon-island
cg11924806	0.003	0.661	0.30	0.36	0.06	4		IGR-shore
cg09440866	0.002	0.661	0.42	0.48	0.06	12		IGR-opensea
cg17731547	0.010	0.661	0.78	0.83	0.06	5	COL23A1	Body-opensea
cg26520396	0.003	0.661	0.73	0.78	0.06	13		IGR-opensea
cg18264728	0.005	0.661	0.39	0.45	0.06	5	DAB2	5'UTR-shelf
cg11276388	0.009	0.661	0.68	0.73	0.06	6	HIVEP1	Body-opensea
cg16163419	0.001	0.661	0.54	0.59	0.06	3	ABI3BP	5'UTR-opensea
cg20960181	0.006	0.661	0.83	0.89	0.06	1		IGR-opensea
cg23517954	0.004	0.661	0.82	0.87	0.06	2	PSMD14	5'UTR-shelf
cg20550536	0.008	0.661	0.87	0.92	0.05	15	GNB5	5'UTR-opensea
cg22904096	0.005	0.661	0.35	0.41	0.05	2	MYL1	TSS1500-opensea
cg00270625	0.005	0.661	0.60	0.66	0.05	22	CPT1B	1stExon-island
cg09395195	0.005	0.661	0.44	0.49	0.05	17	EVI2A	Body-opensea
cg00297966	0.002	0.661	0.84	0.89	0.05	8	NSMCE2	Body-opensea
cg13650580	0.008	0.661	0.87	0.93	0.05	5	CDC20B	Body-shelf
cg21534774	0.005	0.661	0.80	0.86	0.05	17		IGR-shelf
cg17439770	0.005	0.661	0.81	0.86	0.05	10	ADARB2	Body-shore
cg15028548	0.001	0.661	0.50	0.56	0.05	3	ABI3BP	5'UTR-opensea
cg08757924	0.000	0.661	0.50	0.55	0.05	4		IGR-opensea
cg20067334	0.009	0.661	0.11	0.17	0.05	7		IGR-shore
cg17428896	0.005	0.661	0.75	0.80	0.05	10	SVIL	5'UTR-opensea
cg14913512	0.006	0.661	0.81	0.86	0.05	6	CDYL	Body-shelf
cg03475756	0.009	0.661	0.85	0.90	0.05	5	COL23A1	Body-shore
cg22861548	0.003	0.661	0.67	0.72	0.05	8	LYNX1	TSS200-shore
cg13731523	0.005	0.661	0.54	0.59	0.05	4		IGR-shelf
cg04321126	0.003	0.661	0.54	0.59	0.05	6	KIF6	Body-opensea

cg21828197	0.004	0.661	0.88	0.93	0.05	17	ASPSCR1	Body-shore
cg16149164	0.006	0.661	0.70	0.75	0.05	14	JAG2	Body-island
cg03212568	0.008	0.661	0.79	0.84	0.05	8	PHF20L1	Body-opensea
cg27348423	0.003	0.661	0.60	0.65	0.05	4	C4orf19	5'UTR-shore
cg19860245	0.001	0.661	0.80	0.85	0.05	14		IGR-opensea
cg00180909	0.010	0.661	0.74	0.79	0.05	6	RPS6KA2	3'UTR-shore
cg19269956	0.007	0.661	0.31	0.36	0.05	6	PRR3	TSS200-island
cg24399529	0.010	0.661	0.21	0.26	0.05	15	MIR548H4	Body-opensea
cg13683848	0.004	0.661	0.83	0.88	0.05	3		IGR-opensea
cg23326313	0.004	0.661	0.16	0.21	0.05	6		IGR-opensea
cg14448588	0.004	0.661	0.87	0.92	0.05	9	S1PR3	3'UTR-shelf
cg26171271	0.009	0.661	0.83	0.88	0.05	6		IGR-shelf
cg22609511	0.008	0.661	0.70	0.75	0.05	7		IGR-shelf
cg00792107	0.005	0.661	0.26	0.31	0.05	12		IGR-shore
cg20571967	0.009	0.661	0.67	0.72	0.05	10	ASCC1	3'UTR-opensea
cg01975934	0.010	0.661	0.86	0.91	0.05	8		IGR-opensea
cg25006851	0.006	0.661	0.64	0.69	0.05	10	MYST4	Body-opensea
cg25636182	0.003	0.661	0.86	0.91	0.05	4	ABLIM2	Body-opensea
cg25782983	0.002	0.661	0.79	0.74	-0.05	11		IGR-shore
cg00461022	0.006	0.661	0.75	0.70	-0.05	5	FAM134B	TSS1500-shore
cg01526474	0.005	0.661	0.79	0.74	-0.05	6		IGR-island
cg12291829	0.009	0.661	0.28	0.23	-0.05	5		IGR-shore
cg17931227	0.002	0.661	0.55	0.50	-0.05	6		IGR-island
cg10476003	0.006	0.661	0.75	0.70	-0.05	6	LTA	1stExon-opensea
cg08118344	0.006	0.661	0.43	0.38	-0.05	1	RAP1GAP	Body-shelf
cg22901840	0.007	0.661	0.56	0.51	-0.05	1	DIRAS3	Body-island
cg03808172	0.004	0.661	0.22	0.17	-0.05	7	SHFM1	TSS200-shore
cg03930209	0.008	0.661	0.66	0.61	-0.05	7		IGR-island
cg24826527	0.003	0.661	0.18	0.13	-0.05	7	COBL	Body-island
cg03199745	0.007	0.661	0.44	0.39	-0.05	12	FLJ12825	Body-island
cg03928546	0.002	0.661	0.31	0.26	-0.05	19	CCDC105	5'UTR-island
cg01262952	0.007	0.661	0.80	0.75	-0.05	10	ANKRD1	1stExon-opensea
cg20656525	0.007	0.661	0.40	0.35	-0.05	14		IGR-island
cg08551619	0.003	0.661	0.27	0.22	-0.05	3	LNP1	TSS1500-shore
cg07835289	0.002	0.661	0.21	0.16	-0.05	1	LYST	5'UTR-island
cg23327859	0.004	0.661	0.45	0.40	-0.05	12	CCNT1	TSS1500-shore
cg01768131	0.004	0.661	0.67	0.62	-0.05	17	SIRT7	3'UTR-shore

cg12793711	0.001	0.661	0.36	0.31	-0.05	17	ACTG1	Body-shore
cg00606841	0.006	0.661	0.63	0.58	-0.05	21	WRB	Body-island
cg20419291	0.004	0.661	0.28	0.23	-0.05	11	ROBO4	TSS200- opensea
cg12148898	0.003	0.661	0.29	0.23	-0.05	6	GPR110	TSS1500- opensea
cg04645050	0.007	0.661	0.56	0.51	-0.05	16		IGR-shore
cg22159025	0.003	0.661	0.53	0.48	-0.05	15	SNRPN	5'UTR- island
cg08712054	0.007	0.661	0.35	0.30	-0.05	12	HOXC4	5'UTR- shore
cg26868250	0.002	0.661	0.59	0.53	-0.05	11	PSMA1	Body- opensea
cg15536663	0.006	0.661	0.21	0.16	-0.05	5	EPB41L4A	Body- opensea
cg18119735	0.007	0.661	0.58	0.53	-0.05	1	ACTN2	Body-island
cg10709282	0.004	0.661	0.18	0.12	-0.05	8		IGR- opensea
cg26818629	0.006	0.661	0.64	0.59	-0.05	6		IGR-island
cg04843085	0.006	0.661	0.71	0.65	-0.05	11	C11orf45	TSS1500- opensea
cg00828689	0.004	0.661	0.19	0.13	-0.05	3	PIGZ	TSS1500- island
cg25397054	0.008	0.661	0.43	0.37	-0.05	7	GNA12	Body- opensea
cg03019505	0.010	0.661	0.77	0.72	-0.05	22	TFIP11	Body-shelf
cg22803560	0.008	0.661	0.49	0.43	-0.05	4		IGR- opensea
cg01951459	0.003	0.661	0.81	0.76	-0.05	2	AGAP1	Body- opensea
cg20982606	0.002	0.661	0.29	0.24	-0.05	12	UNG	TSS1500- island
cg27547543	0.007	0.661	0.69	0.63	-0.05	6		IGR-island
cg17429075	0.005	0.661	0.84	0.79	-0.05	10		IGR- opensea
cg26204638	0.008	0.661	0.17	0.12	-0.05	20	TP53INP2	Body-island
cg02951974	0.006	0.661	0.23	0.17	-0.05	1		IGR- opensea
cg08961832	0.007	0.661	0.67	0.61	-0.05	11	NLRP6	Body-island
cg24524285	0.009	0.661	0.72	0.66	-0.06	11	NRXN2	Body-island
cg19298856	0.010	0.661	0.57	0.52	-0.06	19	FLT3LG	Body- opensea
cg03362689	0.010	0.661	0.28	0.23	-0.06	3	P4HTM	3'UTR- island
cg15911859	0.010	0.661	0.31	0.26	-0.06	22	RIBC2	Body-shore
cg01580578	0.003	0.661	0.57	0.51	-0.06	7		IGR- opensea
cg23258940	0.008	0.661	0.70	0.65	-0.06	19	NAT14	TSS1500- island
cg21620778	0.004	0.661	0.23	0.17	-0.06	2	WIPF1	TSS1500- shore
cg00121533	0.010	0.661	0.12	0.07	-0.06	1	CRYZ	TSS200- opensea
cg14520079	0.005	0.661	0.64	0.58	-0.06	3		IGR- opensea
cg22462835	0.004	0.661	0.57	0.52	-0.06	6		IGR- opensea
cg03625415	0.003	0.661	0.38	0.33	-0.06	5	NKX2-5	TSS1500- shore
cg13996395	0.006	0.661	0.70	0.64	-0.06	18		IGR-island
cg01721149	0.002	0.661	0.91	0.85	-0.06	1	C1orf61	5'UTR-shelf

cg07363131	0.009	0.661	0.80	0.74	-0.06	16		IGR-shore
cg17329164	0.002	0.661	0.39	0.34	-0.06	6	PPT2	TSS200-shore
cg02867991	0.007	0.661	0.75	0.69	-0.06	14	GNPNAT1	Body-opensea
cg06980531	0.005	0.661	0.78	0.72	-0.06	5	FBLL1	Body-island
cg01729837	0.003	0.661	0.48	0.42	-0.06	19	PALM	Body-island
cg13590414	0.009	0.661	0.83	0.77	-0.06	9		IGR-shelf
cg22872033	0.010	0.661	0.43	0.38	-0.06	14	HNRNPC	5'UTR-opensea
cg27176357	0.002	0.661	0.65	0.59	-0.06	19	ZNF264	TSS1500-shore
cg20302533	0.003	0.661	0.58	0.53	-0.06	7	POU6F2	Body-opensea
cg12000587	0.008	0.661	0.52	0.46	-0.06	17	C17orf79	TSS1500-shore
cg10156846	0.002	0.661	0.33	0.27	-0.06	7		IGR-shore
cg23704085	0.010	0.661	0.92	0.86	-0.06	6	COL11A2	Body-shelf
cg23622162	0.005	0.661	0.53	0.47	-0.06	10	UNC5B	3'UTR-opensea
cg06757133	0.008	0.661	0.63	0.57	-0.06	11		IGR-shelf
cg05898482	0.009	0.661	0.19	0.13	-0.06	7	XRCC2	1stExon-island
cg09263116	0.006	0.661	0.67	0.61	-0.06	22	BIK	TSS1500-shore
cg24320225	0.006	0.661	0.76	0.70	-0.06	8		IGR-shelf
cg26114043	0.009	0.661	0.20	0.14	-0.06	4		IGR-island
cg22506343	0.004	0.661	0.68	0.62	-0.06	3		IGR-shore
cg17007161	0.005	0.661	0.85	0.79	-0.06	2		IGR-opensea
cg06417885	0.009	0.661	0.82	0.76	-0.06	8		IGR-opensea
cg06951677	0.007	0.661	0.72	0.66	-0.06	1		IGR-shore
cg13600257	0.004	0.661	0.82	0.76	-0.06	6		IGR-shelf
cg22291762	0.002	0.661	0.67	0.61	-0.06	6		IGR-island
cg23435671	0.006	0.661	0.29	0.23	-0.06	8		IGR-shore
cg26842596	0.002	0.661	0.71	0.65	-0.06	19	CCDC105	TSS1500-shore
cg04762213	0.003	0.661	0.16	0.10	-0.06	6	BAT2	TSS1500-island
cg20932822	0.009	0.661	0.81	0.75	-0.06	3	CMTM8	TSS1500-shore
cg00675229	0.004	0.661	0.36	0.30	-0.06	4		IGR-opensea
cg18850127	0.004	0.661	0.56	0.50	-0.06	7	POU6F2	Body-opensea
cg03146625	0.010	0.661	0.56	0.50	-0.06	12	HOXC4	Body-shore
cg09470638	0.006	0.661	0.83	0.77	-0.06	19	CCDC105	TSS200-shore
cg16427107	0.005	0.661	0.39	0.33	-0.06	15	SNUPN	Body-opensea
cg20235510	0.008	0.661	0.81	0.75	-0.06	6	ZNF311	Body-opensea
cg24686644	0.007	0.661	0.38	0.32	-0.06	2		IGR-opensea
cg24173182	0.010	0.661	0.54	0.47	-0.06	17	HIC1	Body-island
cg04012535	0.008	0.661	0.44	0.38	-0.06	1		IGR-opensea

cg17499729	0.004	0.661	0.60	0.54	-0.06	21		IGR-shore
cg19082970	0.006	0.661	0.48	0.41	-0.06	1	HFM1	Body-opensea
cg01199952	0.006	0.661	0.58	0.51	-0.07	13		IGR-shore
cg04134958	0.005	0.661	0.80	0.73	-0.07	2	AGAP1	Body-opensea
cg27469738	0.009	0.661	0.74	0.68	-0.07	10	ANKRD2	Body-island
cg21766308	0.005	0.661	0.51	0.44	-0.07	3		IGR-island
cg00578511	0.009	0.661	0.54	0.47	-0.07	5		IGR-shelf
cg18049167	0.001	0.661	0.36	0.30	-0.07	6	PPT2	TSS200-shore
cg00556029	0.005	0.661	0.28	0.22	-0.07	1	MARCKSL1	TSS200-island
cg20149168	0.005	0.661	0.68	0.61	-0.07	1	DIRAS3	Body-island
cg24769969	0.010	0.661	0.47	0.40	-0.07	13	MIR548F5	Body-shore
cg20822540	0.005	0.661	0.72	0.66	-0.07	1	SLC2A7	Body-opensea
cg00186529	0.008	0.661	0.41	0.34	-0.07	6		IGR-island
cg13773741	0.005	0.661	0.73	0.66	-0.07	17	GAS7	Body-opensea
cg13727085	0.001	0.661	0.60	0.53	-0.07	10		IGR-shore
cg09179646	0.002	0.661	0.63	0.56	-0.07	6		IGR-island
cg07726288	0.008	0.661	0.57	0.50	-0.07	1		IGR-island
cg04008252	0.006	0.661	0.25	0.18	-0.07	4	NPFFR2	1stExon-island
cg22894896	0.006	0.661	0.37	0.30	-0.07	17	MIR193A	TSS200-island
cg01624068	0.008	0.661	0.68	0.61	-0.07	13		IGR-shelf
cg22912818	0.005	0.661	0.50	0.43	-0.07	13	TMCO3	Body-shore
cg25005368	0.005	0.661	0.54	0.47	-0.07	10		IGR-shore
cg11010561	0.009	0.661	0.64	0.57	-0.07	4		IGR-opensea
cg01219135	0.010	0.661	0.58	0.51	-0.07	7		IGR-island
cg14036627	0.009	0.661	0.57	0.50	-0.07	6		IGR-shore
cg16248798	0.002	0.661	0.80	0.72	-0.07	1		IGR-shelf
cg19398112	0.004	0.661	0.29	0.22	-0.08	19	DDX39	5'UTR-island
cg15244786	0.008	0.661	0.58	0.51	-0.08	12	HOXC4	5'UTR-shore
cg10399099	0.002	0.661	0.35	0.27	-0.08	16		IGR-island
cg22355184	0.006	0.661	0.66	0.59	-0.08	1		IGR-opensea
cg23467713	0.005	0.661	0.73	0.65	-0.08	14		IGR-opensea
cg15212455	0.003	0.661	0.75	0.68	-0.08	7	POU6F2	Body-opensea
cg14094460	0.005	0.661	0.53	0.46	-0.08	4		IGR-opensea
cg07589899	0.006	0.661	0.36	0.28	-0.08	2		IGR-opensea
cg03716852	0.007	0.661	0.78	0.71	-0.08	19	TRPM4	Body-island
cg24309739	0.004	0.661	0.76	0.68	-0.08	4	NAF1	TSS1500-shore
cg07624948	0.006	0.661	0.20	0.13	-0.08	16	NFATC2IP	Body-shore
cg05923226	0.004	0.661	0.62	0.54	-0.08	19	CCDC105	TSS200-shore

cg18888461	0.007	0.661	0.50	0.42	-0.08	11	LDHAL6A	1stExon-island
cg24935598	0.008	0.661	0.35	0.27	-0.08	3		IGR-shore
cg21529528	0.001	0.661	0.67	0.59	-0.08	18	SIGLEC15	Body-island
cg03406106	0.009	0.661	0.71	0.63	-0.08	16	PKD1L2	TSS200-opensea
cg26841862	0.008	0.661	0.60	0.52	-0.08	12		IGR-island
cg09743437	0.003	0.661	0.31	0.23	-0.08	5		IGR-island
cg07085632	0.004	0.661	0.73	0.64	-0.09	11		IGR-opensea
cg23785719	0.002	0.661	0.46	0.37	-0.09	7	STK17A	TSS200-shore
cg13443627	0.009	0.661	0.39	0.30	-0.09	1	TACSTD2	5'UTR-island
cg26519141	0.001	0.661	0.33	0.24	-0.09	15	ATP10A	TSS1500-island
cg16780454	0.003	0.661	0.45	0.36	-0.09	3		IGR-island
cg07381973	0.003	0.661	0.68	0.58	-0.10	17	KRT13	3'UTR-opensea
cg12695707	0.002	0.661	0.85	0.76	-0.10	19	CCDC105	TSS1500-shore
cg04134279	0.008	0.661	0.58	0.48	-0.10	8	C8orf42	TSS1500-shore
cg00561194	0.003	0.661	0.56	0.46	-0.10	10		IGR-island
cg03635442	0.002	0.661	0.39	0.29	-0.10	8		IGR-island
cg20723792	0.004	0.661	0.57	0.47	-0.10	10	FAM53B	Body-opensea
cg05655647	0.009	0.661	0.48	0.37	-0.10	12	ATF1	TSS1500-shore
cg07194839	0.007	0.661	0.45	0.34	-0.11	10	EBF3	Body-shore
cg07044276	0.009	0.661	0.76	0.65	-0.11	1		IGR-opensea
cg14785464	0.004	0.661	0.49	0.38	-0.11	21	HLCS	TSS200-island
cg15686782	0.003	0.661	0.49	0.38	-0.12	7	MAD1L1	Body-opensea
cg07018435	0.007	0.661	0.72	0.59	-0.13	1		IGR-opensea
cg05475109	0.006	0.661	0.32	0.19	-0.13	8		IGR-shore
cg08681904	0.006	0.661	0.38	0.25	-0.13	8		IGR-island
cg15969227	0.002	0.661	0.46	0.31	-0.15	6		IGR-opensea
cg11886187	0.009	0.661	0.22	0.06	-0.16	17		IGR-shore
cg22355889	0.005	0.661	0.38	0.04	-0.34	11	ELMOD1	TSS1500-shore

ANEXO2

TABLA22

Categoria	Termino	Cuenta	%	P valor	Fold Enrichment	Genes
GAD_DISEASE_CLASS	CARDIOVASCULAR	67	38.7	2.36E-05	1.54	MAD1L1, LIMA1, IL16, POU6F2, TDRP, GNA12, ATP10A, ANKRD2, PDIA6, ANKRD1, ZEB1, VCL, DAB2, CCDC105, HOXC4, AGAP1, FNDC3B, LTA, RBMS1, NMNAT2, COL23A1, SNRPN, LDB2, ACTN2, PROK2, CHGA, HNF4A, TACSTD2, LYST, TRIM31, ZFPM2, ABLIM2, COBL, BLK, UNG, EPB41L4A, SORCS1, PPT2, RDX, SLC19A2, ABI3BP, ATF1, RGMA, IGF1R, STAT4, GAD2, GPHN, CDYL, KIF6, PPP2R2B, NKX2-5, CPT1B, ZNF264, ADARB2, PPHLN1, HMBOX1, CTLA4, DOCK5, GAS7, SLC6A19, PSMD14, RPS6KA2, SVIL, KCNN3, SLC18A2, HIVEP1, KAT6B
	PSICOLOGICAS	37	21.4	2.10E-04	1.84	MAD1L1, COBL, IL16, THRB, POU6F2, ATP10A, GNA12, JAG2, ABI3BP, PKD1L2, IGF1R, RGMA, PRKAR2A, GAD2, GPHN, UNC5B, KIF6, ROBO4, AGAP1, PPP2R2B, LTA, ZCCHC7, NMU, ELMOD1, TFIP11, NRXN2, DLGAP2, SNRPN, CTLA4, SIRT5, LDB2, ACTN2, CHGA, KCNN3, SLC18A2, CMTM8, BIK
	QUIMIODEPENDENCIA	56	32.4	4.04E-04	1.51	MAD1L1, THRB, POU6F2, TDRP, ATP10A, CCNT1, GNA12, PDIA6, DAB2, UNC5B, NSMCE2, FNDC3B, LTA, RBMS1, HFM1, NMNAT2, COL23A1, LDB2, ACTN2, RFWD2, FAM134B, LYNX1, HNF4A, ZFPM2, ABLIM2, COBL, EPB41L4A, SORCS1, PKD1L2, IGF1R, GAD2, GPHN, STAT4, KIF6, ANKIB1, IPCEF1, PPP2R2B, NMU, ELMOD1, ADARB2, DLGAP2, PPHLN1, IPO11, HMBOX1, CTLA4, GAS7, RPS6KA2, SVIL, KCNN3, SLC18A2, CMTM8, HIVEP1, BIK, KAT6B, NFIC, PHLDB2
	NEUROLOGICAL	46	26.6	0.001	1.56	MAD1L1, COBL, THRB, POU6F2, ATP10A, TDRP, JAG2, ASCC1, ANKRD2, SORCS1, STK17A, ZEB1, MXI1, SRP19, VCL, IGF1R, GAD2, DAB2, CDYL, UNC5B, CASP8, ROBO4, NSMCE2, BCAS3, PPP2R2B, COL11A2, LTA, NMU, RBMS1, ELMOD1, CPT1B, ADARB2, CTLA4, LDB2, CRYZ, RFWD2, HNF4A, EBF3, KCNN3, SVIL, SLC18A2, CMTM8, HIVEP1, KAT6B, NFIC, PHLDB2
	METABOLICA	66	38.2	0.02189	1.23	MAD1L1, XRCC2, TSPAN1, THRB, POU6F2, TDRP, GNA12, ATP10A, PDIA6, ANKRD1, ZEB1, DAB2, CASP8, NSMCE2, FAM53B, AGAP1, COL11A2, LTA, RBMS1, TFIP11, COL23A1, LNP1, GCSAML, LDB2, MARK3, FAM134B, PROK2, HNF4A, LYST, ZFPM2, COBL, RAP1GAP, EPB41L4A, SORCS1, SLC19A2, ZNF512, ABI3BP, PKD1L2, RGMA, IGF1R, STAT4, GAD2, CDYL, NPFFR2, IPCEF1, WIPF1, BCAS3, PPP2R2B, PHF20L1, NMU, ASPSCR1, CPT1B, ZNF264, ADARB2, DLGAP2, HMBOX1, IPO11, CTLA4, GAS7, RPS6KA2, EBF3, SVIL, KCNN3, SLC18A2, CMTM8, HIVEP1
	HEMATOLOGICA	22	12.7	0.08761	1.41	ATP10A, TDRP, CTLA4, LDB2, SORCS1, ZEB1, SLC19A2, FAM134B, PROK2, DAB2, RPS6KA2, RIBC2, CMTM8, ZFPM2, RPL11, AGAP1, BCAS3, PPP2R2B, KAT6B, NKX2-5, FNDC3B, C5ORF56
	ENVEJECIMIENTO	15	8.7	0.09715	1.55	MAD1L1, COBL, IL16, ADARB2, UNG, ASCC1, SIRT5, HLCS, ACTG1, IGF1R, CASP8, ZFPM2, PPP2R2B, COL11A2, HFM1

ANEXO 3. DMP's (sitios CpG's) COMPARATIVO HomC vs HomNC (mujeres)

CpG	P. Value	adj. P.Val	HomNC_ LES_AVG	HomC_ LES_AVG	Delta Beta	CHR	gene	feat.cgi
cg24506221	0.004	0.875	0.363	0.623	0.260	1	GSTM1	TSS200-island
cg24147543	0.006	0.875	0.099	0.216	0.117	6	HLA-DRB1	Body-shelf
cg14709479	0.005	0.875	0.255	0.355	0.100	1	TTLL10	TSS1500-shore
cg02380802	0.008	0.875	0.503	0.601	0.098	16		IGR-shore
cg20062057	0.009	0.875	0.350	0.445	0.095	2	NRXN1	Body-opensea
cg19636519	0.004	0.875	0.288	0.382	0.093	7		IGR-opensea
cg06153448	0.010	0.875	0.522	0.615	0.093	2		IGR-opensea
cg20608895	0.004	0.875	0.358	0.447	0.089	13		IGR-opensea
cg02175321	0.005	0.875	0.353	0.441	0.088	11	PDGFD	Body-opensea
cg26131019	0.007	0.875	0.183	0.271	0.088	3	LRIG1	1stExon-island
cg01004980	0.008	0.875	0.638	0.717	0.079	3	PRKAR2A	Body-shore
cg06276663	0.008	0.875	0.464	0.539	0.076	10	SH3PXD2A	Body-opensea
cg12944573	0.010	0.875	0.494	0.569	0.074	6	OPRM1	TSS1500-opensea
cg23114616	0.009	0.875	0.251	0.325	0.074	1	TNFRSF25	TSS200-shore
cg16340422	0.010	0.875	0.648	0.720	0.072	17	PLD6	TSS1500-island
cg00304520	0.007	0.875	0.126	0.198	0.072	1		IGR-shore
cg01011898	0.004	0.875	0.329	0.401	0.072	2		IGR-opensea
cg27152312	0.009	0.875	0.612	0.681	0.070	7		IGR-opensea
cg12976463	0.007	0.875	0.513	0.582	0.069	6		IGR-opensea
cg13266435	0.005	0.875	0.272	0.341	0.068	18	ANKRD30B	TSS200-island
cg16242260	0.009	0.875	0.756	0.822	0.066	X	FRMPD4	Body-island
cg00541718	0.007	0.875	0.546	0.612	0.065	7	PRKAR1B	Body-shore
cg07600193	0.009	0.875	0.663	0.728	0.065	5	SLC6A18	Body-shore
cg01963297	0.009	0.875	0.449	0.513	0.065	1	KCNN3	1stExon-opensea
cg03289180	0.009	0.875	0.380	0.444	0.064	13		IGR-opensea
cg23919844	0.010	0.875	0.553	0.616	0.063	13	ARHGEF7	Body-opensea
cg22983282	0.008	0.875	0.337	0.400	0.063	5		IGR-opensea
cg08716584	0.009	0.875	0.202	0.265	0.063	11	MS4A7	Body-opensea
cg04321126	0.005	0.875	0.532	0.595	0.062	6	KIF6	Body-opensea
cg10608948	0.010	0.875	0.318	0.380	0.062	17		IGR-opensea
cg04083076	0.009	0.875	0.548	0.610	0.062	1	SLC19A2	Body-shelf
cg14443470	0.009	0.875	0.510	0.572	0.062	9	FAM125B	Body-opensea
cg02286809	0.007	0.875	0.755	0.816	0.061	15		IGR-island
cg14507445	0.006	0.875	0.780	0.840	0.060	22		IGR-shelf
cg16334795	0.006	0.875	0.505	0.564	0.059	21	BACE2	TSS1500-shore
cg12769599	0.007	0.875	0.191	0.250	0.059	11		IGR-opensea

cg00419117	0.009	0.875	0.865	0.924	0.059	1	C1orf69	Body-shore
cg15020206	0.009	0.875	0.672	0.729	0.057	5		IGR-opensea
cg08314666	0.008	0.875	0.892	0.948	0.057	10	VTI1A	Body-opensea
cg14280181	0.010	0.875	0.429	0.485	0.056	2	SGPP2	Body-shore
cg09870385	0.006	0.875	0.819	0.875	0.056	17		IGR-opensea
cg10720000	0.007	0.875	0.567	0.623	0.056	7		IGR-island
cg18927740	0.008	0.875	0.842	0.898	0.055	15	RGMA	Body-shelf
cg12686441	0.006	0.875	0.168	0.223	0.055	8		IGR-opensea
cg00586527	0.010	0.875	0.751	0.806	0.055	10		IGR-island
cg22151131	0.005	0.875	0.531	0.586	0.055	X	EFNB1	TSS200-island
cg07679836	0.006	0.875	0.398	0.452	0.054	6	BAK1	TSS1500-opensea
cg06134964	0.007	0.875	0.525	0.579	0.054	3	ITIH1	TSS1500-opensea
cg03571145	0.005	0.875	0.503	0.557	0.053	8		IGR-shelf
cg12711054	0.006	0.875	0.708	0.761	0.053	7	VKORC1L1	Body-opensea
cg16887422	0.006	0.875	0.531	0.583	0.052	2	HDAC4	Body-shore
cg19762533	0.009	0.875	0.799	0.851	0.052	7	POU6F2	Body-opensea
cg16766828	0.005	0.875	0.502	0.554	0.052	3		IGR-shore
cg09658497	0.009	0.875	0.649	0.700	0.052	7	GNA12	Body-opensea
cg06942649	0.006	0.875	0.127	0.178	0.051	8		IGR-opensea
cg21885361	0.008	0.875	0.657	0.606	-0.050	7		IGR-island
cg13902024	0.006	0.875	0.805	0.755	-0.050	7	PLXNA4	Body-opensea
cg24059119	0.007	0.875	0.220	0.170	-0.051	19		IGR-island
cg14553895	0.007	0.875	0.548	0.497	-0.051	3	PIK3CA	5'UTR-opensea
cg08787968	0.006	0.875	0.478	0.427	-0.051	11	WT1	Body-shore
cg12272488	0.006	0.875	0.611	0.559	-0.052	19	C3P1	TSS200-opensea
cg19590598	0.009	0.875	0.541	0.488	-0.053	2		IGR-island
cg08604223	0.010	0.875	0.899	0.846	-0.054	5	IQGAP2	Body-opensea
cg03021892	0.010	0.875	0.849	0.795	-0.054	X	SLC38A5	TSS1500-opensea
cg16501028	0.004	0.875	0.545	0.491	-0.054	11	WT1	Body-shore
cg04387820	0.005	0.875	0.677	0.622	-0.054	10		IGR-shore
cg20049005	0.008	0.875	0.565	0.510	-0.055	11		IGR-shore
cg04902871	0.008	0.875	0.823	0.765	-0.058	11	KCNQ1	TSS1500-shore
cg20892840	0.005	0.875	0.777	0.719	-0.058	3	CCNL1	TSS1500-shore
cg03269218	0.010	0.875	0.206	0.144	-0.062	10		IGR-opensea
cg13727085	0.007	0.875	0.595	0.532	-0.064	10		IGR-shore
cg10781513	0.005	0.875	0.320	0.256	-0.064	3		IGR-shore
cg16248798	0.006	0.875	0.797	0.733	-0.064	1		IGR-shelf
cg00176675	0.006	0.875	0.746	0.681	-0.065	8	EIF2C2	Body-opensea
cg17024919	0.006	0.875	0.209	0.144	-0.065	3	ZNF385D	Body-opensea

cg18850127	0.007	0.875	0.545	0.476	-0.068	7	POU6F2	Body-opensea
cg25548594	0.006	0.875	0.353	0.284	-0.068	3		IGR-island
cg23109344	0.010	0.875	0.851	0.782	-0.069	8	C8orf42	TSS1500-shore
cg21198712	0.007	0.875	0.723	0.652	-0.071	9		IGR-opensea
cg12881363	0.009	0.875	0.260	0.189	-0.071	22	MOV10L1	TSS200-island
cg18049167	0.007	0.875	0.373	0.302	-0.071	6	PPT2	TSS200-shore
cg01729837	0.009	0.875	0.482	0.410	-0.072	19	PALM	Body-island
cg03115019	0.004	0.875	0.839	0.766	-0.074	17	FN3K	Body-island
cg13301003	0.010	0.875	0.509	0.434	-0.075	11	WT1	Body-island
cg20030294	0.010	0.875	0.728	0.649	-0.078	14		IGR-opensea
cg03731740	0.010	0.875	0.640	0.557	-0.084	1	YTHDF2	TSS1500-shore
cg12006284	0.007	0.875	0.382	0.295	-0.087	11	WT1	Body-island
cg20723792	0.008	0.875	0.562	0.474	-0.088	10	FAM53B	Body-opensea
cg03635442	0.007	0.875	0.388	0.299	-0.089	8		IGR-island
cg08578320	0.005	0.875	0.760	0.669	-0.091	6	HLA-DRB1	Body-island
cg24864161	0.008	0.875	0.282	0.186	-0.097	22	MOV10L1	TSS200-island
cg12695707	0.007	0.875	0.851	0.754	-0.097	19	CCDC105	TSS1500-shore
cg16619378	0.009	0.875	0.592	0.490	-0.102	17	HS3ST3B1	Body-island
cg12064134	0.004	0.875	0.700	0.598	-0.102	16	DEF8	5'UTR-island
cg03860256	0.004	0.875	0.360	0.256	-0.104	22	MOV10L1	TSS200-island
cg13798585	0.006	0.875	0.348	0.229	-0.119	7	MAD1L1	Body-shore
cg05082466	0.010	0.875	0.774	0.655	-0.120	6	SERPINB6	Body-opensea
cg07180897	0.009	0.875	0.899	0.771	-0.128	6	HLA-DQB2	Body-shore
cg21931717	0.010	0.875	0.162	0.034	-0.128	5	SDHAP3	TSS200-island
cg00101728	0.006	0.875	0.685	0.554	-0.131	6	SERPINB6	Body-opensea
cg06742077	0.009	0.875	0.592	0.461	-0.131	8	MIR596	TSS1500-island
cg16523850	0.009	0.875	0.692	0.560	-0.133	6		IGR-opensea
cg04134279	0.005	0.875	0.582	0.448	-0.134	8	C8orf42	TSS1500-shore
cg21728101	0.008	0.875	0.447	0.306	-0.141	7	MAD1L1	Body-shore
cg00809820	0.006	0.875	0.541	0.399	-0.142	17	TBCD	TSS1500-island
cg22325292	0.005	0.875	0.729	0.581	-0.148	17	FN3K	Body-island
cg24960960	0.009	0.875	0.198	0.048	-0.150	5	SDHAP3	TSS200-island
cg21167402	0.010	0.875	0.250	0.089	-0.161	5	SDHAP3	TSS200-island
cg15969227	0.007	0.875	0.453	0.292	-0.162	6		IGR-opensea
cg08422420	0.008	0.875	0.197	0.029	-0.168	5	SDHAP3	TSS200-island

ANEXO 4

TABLA 29

Categoria	Termino	Cuenta	%	PValue	Fold Enrichment	Benjamini	FDR	Genes
GAD_ DISEASE _CLASS	CARDIOVASCULAR	26	0.315	0.002	1.682	0.038	1.562	OPRM1, HLA-DQB2, MAD1L1, PLXNA4, HLA-DRB1, POU6F2, GNA12, PPT2, LRIG1, SLC19A2, GSTM1, RGMA, CCDC105, KIF6, PDGFD, KCNQ1, SDHAP3, FRMPD4, NRXN1, SLC6A18, VTI1A, HDAC4, KCNN3, BACE2, TBCD, ZNF385D
	PSICOLÓGICA	15	0.182	0.007	2.097	0.059	4.878	OPRM1, MAD1L1, HLA-DRB1, POU6F2, GNA12, NRXN1, GSTM1, RGMA, HDAC4, PRKAR2A, ITIH1, KIF6, KCNN3, ZNF385D, PIK3CA
	QUÍMIODEPENDENCIA	22	0.267	0.008	1.668	0.047	5.786	OPRM1, MAD1L1, MS4A7, SH3PXD2A, PLXNA4, HLA-DRB1, VKORC1L1, POU6F2, GNA12, LRIG1, IQGAP2, MOV10L1, NRXN1, VTI1A, WT1, GSTM1, KIF6, KCNN3, ZNF385D, PDGFD, KCNQ1, MVB12B
	METABOLICO	26	0.315	0.041	1.363	0.171	26.377	OPRM1, MAD1L1, PLXNA4, HLA-DRB1, VKORC1L1, POU6F2, FN3K, GNA12, IQGAP2, LRIG1, SLC19A2, GSTM1, RGMA, PIK3CA, FAM53B, KCNQ1, MVB12B, SH3PXD2A, SDHAP3, FRMPD4, NRXN1, VTI1A, HDAC4, BACE2, KCNN3, ZNF385D
	OTRO	11	0.133	0.050	1.903	0.168	31.325	GSTM1, OPRM1, BAK1, HLA-DRB1, POU6F2, IQGAP2, PDGFD, NRXN1, KCNQ1, WT1, HS3ST3B1
	DESCONOCIDO	11	0.133	0.053	1.882	0.151	33.061	GSTM1, OPRM1, BAK1, HLA-DRB1, KIF6, EFN1, PPT2, PIK3CA, NRXN1, KCNQ1, HS3ST3B1
	FARMACOGENÓMICO	15	0.182	0.084	1.524	0.203	47.760	OPRM1, PLXNA4, HLA-DRB1, TNFRSF25, IQGAP2, FRMPD4, SLC19A2, GSTM1, BAK1, HDAC4, CCDC105, BACE2, PIK3CA, PDGFD, KCNQ1
	HEMATOLOGICO	10	0.121	0.085	1.806	0.182	48.126	GSTM1, BAK1, HLA-DRB1, ITIH1, ARHGEF7, SDHAP3, ZNF385D, NRXN1, KCNQ1, SLC19A2