



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA

**Perfiles de metilación del ADN en células THP-1 estimuladas con ácido
araquidónico (AA) o ácido oleico (AO) y su impacto transcripcional**

Tesis que presenta

Guillermo Antonio Silva Martínez

para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

en la Especialidad de

Biotecnología de Plantas

Co-Directores de Tesis: Dra. Gertrud Lund y

Dr. Silvio Zaina*

***Universidad de Guanajuato**

Irapuato, Guanajuato

Febrero 2017

Por este medio declaro que yo he preparado este trabajo de tesis de forma independiente y sin ayuda externa. Especialmente declaro que he citado de forma correcta y explícita a los autores y trabajos en los que esta tesis se apoya, así como las contribuciones de las personas que coadyuvaron en su desarrollo.

Irapuato, Guanajuato a los 15 días del mes de Febrero del 2017.

Guillermo Antonio Silva Martínez

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN - Unidad Irapuato, Departamento de Ingeniería Genética, Laboratorio de Epigenética en conjunto con la Universidad de Guanajuato Campus León, Departamento de Ciencias Médicas División de Ciencias de la Salud, bajo la codirección de la Dra. Gertrud Lund y el Dr. Silvio Zaina gracias al apoyo otorgado por el Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Guanajuato (CONCyTEG) con el no. 08-03-K662-020-A01; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los Proyectos de Ciencia Básica no. 83401 y la beca para estudios de doctorado no. 334370. Este trabajo fue realizado del 01 de Marzo de 2012 al 30 de Junio de 2016.

Miembros del Comité de Asesores:

Dra. Laila Pamela Partida

Dra. Nalleyi Marsch Martínez

Dra. Gloria Barbosa Sabanero

Dr. Stefan De Folter

Fecha de examen de grado: 15 de Febrero de 2017

Agradecimientos

Agradezco a mi familia, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo a través del tiempo.

A mi mejor amiga, colega y compañera de vida, Fabiola E. Tristán-Flores, quien siempre me ha dado su apoyo incondicional en todo momento. Gracias por todo, te amo.

A mis directores de tesis, la Dra. Gertrud Lund y el Dr. Silvio Zaina, por brindarme la oportunidad de pertenecer a un increíble grupo de trabajo y el haberme permitido realizar mi trabajo de investigación.

A la BQ. Dalia Rodríguez-Ríos y a la Dra. Yolanda Alvarado-Caudillo, por su asesoría durante el desarrollo del apartado experimental de este proyecto.

A los miembros de mi comité, Dra. Laila Partida, Dra. Gloria Barbosa, Dra. Nalleyi Marsch y Dr. Estefan de Folter por sus valiosas aportaciones a lo largo del desarrollo de éste trabajo experimental, que sin duda ayudaron a enriquecerlo en varios aspectos. Al Dr. Luis Delaye por facilitarnos el acceso a su nodo computacional (proyecto CONCYTEG “Laboratorio de aprendizaje e investigación en cómputo biológico: LAICBIO, Clave: GTO-2012-C02-187442”)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca nacional no. 334370 para la realización de estudios de doctorado y al Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato, por la formación recibida en el programa de Biotecnología de Plantas.

A todo el personal académico, administrativo y de mantenimiento del CINVESTAV Unidad Irapuato por facilitarme todas las herramientas necesarias para el trabajo de laboratorio y tramites en este centro.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Índice General	
Índice de Tablas	VII
Índice de Figuras.....	VIII
Índice de Abreviaturas	X
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción	3
Epigenética: Definición y efectores principales.....	3
Metilación del ADN.....	3
Mecanismos de metilación y desmetilación del ADN.....	4
Contexto y distribución genómica de la metilación del ADN.....	5
Metilación del ADN y la transcripción	6
Mecanismos de regulación transcripcional mediadas por la metilación del ADN:.....	7
Modulación de la metilación diferencial del ADN	8
Durante el desarrollo	8
En enfermedad.....	9
Componentes en la dieta y modificaciones epigenéticas	11
Ácidos grasos	11
Ácidos grasos: Su efecto en procesos biológicos y en enfermedad	12
Los ácidos grasos pueden modificar el metiloma humano	14
Ácidos grasos, β -oxidación y mADN: Antecedentes directos del proyecto	14
Hipótesis	16
Objetivo.....	16
Objetivos Específicos.....	16
Materiales y métodos	17

Cultivos celulares	17
Microarreglo para determinar mADN.....	17
Microarreglo de expresión	18
Detección del estado de metilación de elementos ALU en células THP-1	18
Análisis comparativo de los perfiles de metilación con datos públicos.....	19
Resultados.....	22
Identificación de CpGs que muestran cambios en la metilación dependiente de la dosis de AA o AO.....	22
Efecto del AA y AO sobre los niveles de metilación de los elementos repetidos ALU en células THP-1	27
Características de las regiones génicas que muestran cambios en la metilación dependiente de AA Y AO	28
Expresión diferencial inducida a por ácidos grasos y su relación con la metilación	35
Evaluación de la relevancia biológica de los efectos del AA o AO en la mADN mediante epigenómica comparativa.....	40
Discusión.....	49
Conclusiones.....	54
Perspectivas.....	56
Bibliografía	57
Anexos	75
Material Suplementario	75
<i>Curriculum vitae</i>	76
Lista de publicaciones y participaciones en congresos con el trabajo de tesis.	79

Índice de Tablas

Tabla I: Características de estudios referenciados que se realizaron bajo la plataforma 450k.....	20
Tabla II: Lista de genes diferencialmente metilados (DM) en respuesta al estímulo de diferentes dosis (1, 10 y 100 μ M) de AA.	24
Tabla III: Lista de genes diferencialmente metilados (DM) en respuesta al estímulo de diferentes dosis (1, 10 y 100 μ M) de AO.	25
Tabla IV: Relación entre metilación del ADN y la transcripción.....	39
Tabla V: Principales rutas metabólicas/señalización enriquecidas dentro del programa <i>DAVID</i>	46

Índice de Figuras

Figura 1: Compartimentos génicos y la distribución topográfica en referencia a la ICG.....	6
Figura 2: Epigenética y factores de transcripción.....	7
Figura 3: Metilación del ADN, densidad del contenido CG y regulación en la transcripción.	8
Figura 4: Principales causas de muerte a nivel mundial al año 2014.	10
Figura 5: Análisis de clustering no supervisado del microarreglo de alta densidad de la metilación del ADN (450k) de células THP-1 estimuladas con AGs.....	23
Figura 6: Distribución de la metilación de CpGs que muestran cambios dependientes de la dosis de AGs.	27
Figura 7: Efecto de AG puros en la metilación del ADN de elementos ALU en monocitos THP-1.	28
Figura 8: Distribución de CpG diferencialmente metiladas en respuesta al estímulo de AA, en función a su distribución génica y contexto CpG.	30
Figura 9: Distribución de CpG diferencialmente metiladas en respuesta al estímulo de OA, en función a su distribución génica y contexto CpG.	30
Figura 10: Blancos génicos sometidos a la metilación diferencial mediada por el AA..	31
Figura 11: Blancos génicos sometidos a la metilación diferencial mediada por el AO.	32
Figura 12: Ejemplos de algunos perfiles de metilación ejercidos por el AA o AO.....	34
Figura 13: Asociación entre los cambios de mADN y los niveles de expresión inducidos por el AA.....	37
Figura 14: Asociación entre los cambios de mADN y los niveles de expresión inducidos por el AO.....	38

Figura 15: Metilación del ADN dentro del cuerpo del gen correlaciona de manera positiva con los niveles de expresión de algunos genes selectos.....	39
Figura 16: Análisis de “Clustering” de aquellas CpGs que son comunes entre las AACpGs o AOCpGs o ambas, y a aquellos CpGs de tejido enfermo o sano.....	42
Figura 17: Frecuencia de genes DMen los arreglos analizados.....	44
Figura 18: Genes seleccionados al azar, pertenecientes a los diferentes grupos clasificados por SG y su identificación en los diferentes estudios analizados basados en el 450k.	45
Figura 19: Correlación entre la densidad de sondas dentro del 450K y sus características génicas.	45

Índice de Abreviaturas

450k	Microarreglo <i>Infinium HumanMethylation450</i> de Illumina
5caC	5-carboxilcitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
AA	Ácido Araquidónico
AACpG	CpG diferencialmente metiladas con comportamiento dosis-dependiente al estímulo de AA
AGs	Ácidos grasos
AID	Citidina-deaminasa inducida por activación
AO	Ácido Oleico
AOCpG	CpG diferencialmente metiladas con comportamiento dosis-dependiente al estímulo de AO
AP	Ácido Palmítico
DM	Diferencialmente Metilado
DNMTs	ADN metiltransferasa
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ENT	Enfermedades no transmisibles
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FT	Factor de transcripción
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
ICG	Isla CpG
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MA	Mar abierto (región genómica no relacionada con ICG)

mADN	Metilación del ADN
MBP	Proteínas de unión a CpG metiladas (por sus siglas en ingles)
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados (por sus siglas en ingles)
PPARs	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (por sus siglas en ingles)
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados(por sus siglas en ingles)
RDM	Región diferencialmente metilada
SFA	Ácidos grasos saturados (por sus siglas en ingles)
THP-1	Línea celular derivada de la fracción rica en linfocitos T de sangre periférica humana
TSS	Sitio de inicio de la transcripción (por sus siglas en ingles)
UTR	Región no traducida (por sus siglas en ingles)
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (por sus siglas en ingles)

Resumen

Una de las modificaciones epigenéticas de la cual se tiene un amplio registro en varios tipos de enfermedades -incluyendo enfermedades metabólicas- es la metilación del ADN (mADN). El metabolismo y biodisponibilidad anormales de los ácidos grasos (AGs) están asociados con la aparición y progresión de enfermedades crónico-degenerativas. Gracias al gran avance en el desarrollo de tecnologías de secuenciación de última generación, se han observado alteraciones en los patrones de mADN en este tipo de enfermedades, por lo cual es concebible que los AGs sean uno de los factores que causen cambios patológicos en el epigenoma. Dos AGs llaman nuestra atención en particular, el ácido araquidónico (AA) y oleico (AO), ya que se les atribuyen propiedades opuestas en los procesos inflamatorios. Con el fin de entender el efecto de estos AGs sobre el epigenoma y su relación con algunas enfermedades, hemos analizado los perfiles de mADN en cultivos celulares (monocitos THP-1) estimulados con diferentes concentraciones fisiológicamente relevantes de AA o AO, para posteriormente compararlos con perfiles de tejido sano o enfermo previamente publicados y públicamente disponibles. El material genético de las células estimuladas fue analizado mediante el uso de las plataformas *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina) y *Human Exon 1.0 ST array* (Affymetrix). La comparación con los datos públicamente disponibles se realizó mediante procedimientos bioinformáticos estándares. El AA y AO generaron una respuesta opuesta en la metilación global del ADN, caracterizadas por una hipermetilación y una hipometilación, respectivamente. La respuesta divergente de AA y AO fue sobresaliente dentro de la región del cuerpo del gen en aquellas regiones génicas blanco, donde correlacionaba de manera positiva con la transcripción. Los perfiles de mADN inducidos por el AA fueron similares a los perfiles descritos por ácido palmítico, aterosclerosis, diabetes, obesidad y autismo, pero distintos a aquellos perfiles inducidos por AO. Además, perfiles de mADN asociados con el grado de lesión aterosclerótica, fueron significativamente enriquecidos en los perfiles inducidos por AA. En conclusión, AA y AO ejercen efectos distintos en la mADN. Las observaciones de que AA puede contribuir al remodelado del epigenoma de importantes enfermedades metabólicas, apoya y expande los tratamientos terapéuticos basados en la dieta con el fin de prevenirlas.

Abstract

One of the most studied epigenetic modifications in human disease -including metabolic diseases- is DNA methylation (DNAm). Abnormal FA metabolism and bioavailability of fatty acids (FAs) have been in many cases associated with metabolic disease etiology. Since changes in DNAm patterns have been related to these diseases thanks to advances in next-generation sequencing technologies, it is conceivable that FAs are one of the factors that causes pathological changes in the epigenome. We focused on two notable FAs, arachidonic acid (AA) and oleic acid (OA), since they are considered to exert opposite effects on inflammation. In order to understand the effects of these FAs on the epigenome and their relationship with disease, we have analyzed the DNAm profiles of culture THP-1 monocytes stimulated with different physiologically relevant concentrations of AA or OA, and compared those profiles with previously published, publicly available corresponding profiles of healthy or diseased tissue. DNA and RNA from stimulated cells were analyzed by using *Infinium HumanMethylation450* platforms BeadChip (Illumina) and the *Human Exon 1.0 ST array* (Affymetrix). The comparisons with publicly available data sets were carried out by standard bioinformatics methods. The AA and AO generated opposite global DNAm responses, characterized by hypermethylation and hypomethylation, respectively. The divergent responses of AA and OA were particularly obvious within the gene body, where DNAm correlated positively with transcription levels. DNAm profiles induced by AA were similar to the profiles described for palmitic acid, atherosclerosis, diabetes, obesity and autism, but different to profiles induced by AO. Furthermore, DNAm profiles previously found to be associated with the severity of aortic atherosclerosis were significantly enriched in AA-induced profiles. In conclusion, AA and OA have different effects on the DNAm. The observation that AA can contribute to remodeling the epigenome of important metabolic conditions, supports and expands therapeutic diet-based strategies aimed at disease prevention and treatment.

Introducción

Epigenética: Definición y efectores principales

En la década de los 40s, Conrad H. Waddington introdujo el término *epigenética* en el ámbito del desarrollo celular, definiéndolo como “las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo” (Waddington, 1942). Con el rápido avance en el área de la genética, una re-definición en un contexto contemporáneo era inminente. En el 2008, durante una reunión realizada en Cold Spring Harbor, se redefinió la epigenética como “aquel fenotipo heredable de manera estable resultante de los cambios en un cromosoma sin alteraciones en la secuencia del ADN” (Berger *et al.*, 2009). Sin embargo, esta definición no reconoce que las modificaciones epigenéticas son, en algunos casos, dependientes de la secuencia del ADN (Kerkerl *et al.*, 2008). Dicha definición involucraría la heredabilidad de un fenotipo a través de la mitosis o meiosis, resultado de la interacción de tres tipos de “señales”: 1) Aquella señal que emana del entorno y desencadena una respuesta intracelular, 2) Aquella señal que modifica la cromatina en respuesta al primer estímulo y 3) Aquella señal encargada de mantener el entorno de la cromatina tal que permita que este sea heredable. Este conjunto de señales culminan en el establecimiento del estado epigenético heredable de manera estable, hasta que un nuevo estímulo re programe la cromatina (Berger *et al.*, 2009). Las modificaciones covalentes del ADN o de proteínas de histonas, son los principales determinantes de la regulación epigenética. Estos incluyen la metilación o hidroxilación del ADN y las múltiples modificaciones en proteínas de histonas, tales como la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación (revisado por Yao *et al.* 2016). Algunos autores incluyen a los ARNs no codificantes (los cuales funcionan como reguladores de la transcripción) entre los reguladores epigenéticos.

Metilación del ADN

La metilación del ADN (mADN) es la modificación epigenética más ampliamente estudiada. Esta es esencial para el desarrollo en mamíferos y desempeña un papel crucial en una gran variedad de eventos biológicos tales como la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X, la carcinogénesis y algunas enfermedades no trasmisibles (ENT; Wang, Meissner y Jaenisch, 2004; Portela y Esteller, 2010). La mADN consiste en la unión covalente de un grupo metilo (CH₃) a una de las bases del ADN. El proceso de mADN más frecuente en el genoma de mamíferos es la

incorporación del grupo metilo al carbono-5 del anillo de la citosina, formando la 5-metil citosina (5mC; revisado en Schubeler, 2012).

Mecanismos de metilación y desmetilación del ADN

Los mecanismos moleculares mediante los cuales ocurre la mADN son relativamente bien conocidos. La formación de la 5mC es el resultado de la acción de una familia de ADN metiltransferasas (DNMTs), compuesta por la DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L (Goll y Bestor 2005). Las enzimas DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L son las ADN metiltransferasas encargadas de realizar la metilación *de novo*, estableciendo nuevos patrones de metilación sobre sitios CpG previamente desmetilados o hipometilados, mientras que la DNMT1 actúa principalmente como una metiltransferasa de mantenimiento mediante la metilación de secuencias hemimetiladas durante la replicación del ADN (Bostick *et al.*, 2007; Sharif *et al.*, 2007; Jones y Liang, 2009). De esta manera los patrones de mADN son preservados a lo largo de las divisiones celulares.

El proceso de desmetilación del ADN es mucho más complejo que su contraparte, la metilación. Este puede ser pasivo, activo o una combinación de ambos. La desmetilación pasiva toma lugar cuando la tasa de replicación del ADN rebasa la actividad de las DNMTs, mientras que el proceso activo es mediado en parte por proteínas de la familia de hidroxilasas TET (*Ten-Eleven Translocation*; TET1, TET2 y TET3), las cuales oxidan la 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC). En posteriores reacciones de oxidación, la 5hmC forma los productos 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC), los cuales pueden activar mecanismos de reparación del ADN (revisado en Rasmussen y Helin 2016). Otros participantes en la ruta de desmetilación activa son las enzimas de deaminación (como la citidina-deaminasa inducida por activación, AID) las cuales median la deaminación de la citosina y la convierte a uracilo, lo que también desencadena una respuesta de reparación del ADN. En ambos casos, la 5mC termina siendo reemplazada por una citosina no metilada (Bhutani, Burns y Blau, 2011). La desmetilación activa participa en el re-establecimiento de patrones de mADN durante etapas tempranas del desarrollo (revisado por Schuermann *et al.* 2016).

Contexto y distribución genómica de la metilación del ADN

En mamíferos, la mADN ocurre de manera predominante en el dinucleótido CpG, sin embargo existe una diferencia en el contexto de la mADN dependiendo del nivel de diferenciación celular. En células somáticas cerca del 98% de la mADN ocurre en dinucleótidos CpG, mientras que en células madres embrionarias el 25% ocurre en un contexto CHG o CHH (donde la H denota A, C o T), es decir en un contexto no-CpG (Lister *et al.* 2009).

En cuanto a la distribución genómica de la mADN en el genoma humano, aquellas CpGs localizadas en secuencias repetidas, regiones intergénicas y dentro del cuerpo del gen, están generalmente metiladas, mientras que regiones promotoras y regiones reguladoras de la transcripción están generalmente poco o no metiladas (Thurman *et al.*, 2012). La ausencia de metilación en regiones promotoras coincide, en algunos casos, con la presencia de “islas CpG” (ICG), la cual se define como una secuencia mayor de 200bp, rica en nucleótidos C y G (>50%) y con una frecuencia esperada de CpGs >0.6 (**Figura 1A**, Bird *et al.* 1985). Cerca del 70% de los promotores génicos anotados, sobre todo en genes constitutivos son caracterizados por la presencia de una ICG (Blackledge y Klose, 2011; Deaton y Bird, 2011). Las ICGs escapan de la metilación generalizada que es observada en el resto del genoma por mecanismos que aún no se encuentran completamente claros. Se ha propuesto que la composición rica en guanina y citosina dentro de estas regiones, favorece la formación de un híbrido ADN-ARN, el cual inhibe la unión de las ADN metiltransferasas a la ICG (Lister *et al.*, 2009; Ginno *et al.*, 2012). Existe una clasificación topográfica del genoma con referencia a las ICGs, donde se denominan “playas CpG” a las regiones de 2kb que flanquean la ICG y “arrecife CpG” a las regiones inmediatamente adyacentes a las playas. El resto del genoma, no relacionado con las demás regiones se indica como “mar abierto” (MA; **Figura 1B**; Sandoval *et al.* 2011).

Comúnmente se asume que la región promotora y el cuerpo del gen son dos compartimentos génicos diferentes, sin embargo la mayoría de los genes poseen al menos otro sitio de inicio de la transcripción dentro del cuerpo del gen que puede estar relacionado con ICG o no. En la mayoría de los genes, el cuerpo del gen es pobre en el dinucleótido CpG, aún esa región contiene múltiples elementos repetidos y trasposantes, razón por la cual presenta una extensa metilación.

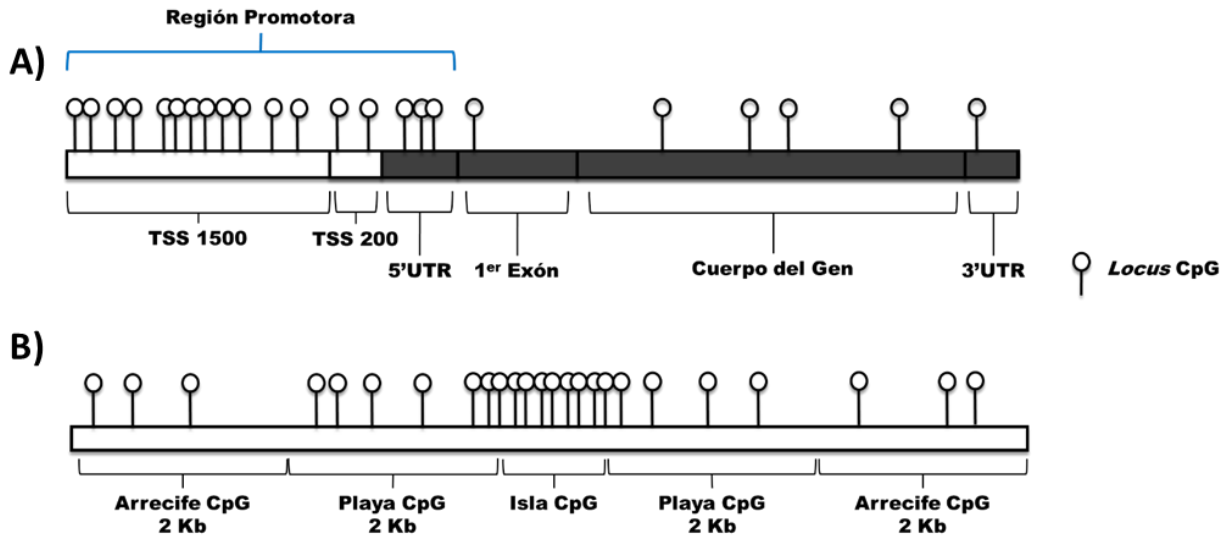


Figura 1: Compartimentos génicos y la distribución topográfica en referencia a la ICG. A) La región promotora del gen es rica en el dinucleótido CpG, mientras que la región río debajo de esta, se posee una densidad pobre de CpG. B) Esquema representativo de la distribución topográfica en referencia a la presencia de ICG.

Metilación del ADN y la transcripción

La mADN tiene un impacto complejo sobre la transcripción, determinado por varios factores tales como la posición respecto al compartimento génico en el que se encuentre, como sitios de inicio de la transcripción (TSS), cuerpo del gen o regiones no traducidas (UTR). Por lo general se ha observado que la mADN en regiones promotoras regula de manera negativa el estado transcripcional del gen (**Figura 2**; Huck-Hui y Bird 1999). Ejemplo de esto incluye la metilación de ICG de uno de los dos cromosoma X en hembras o la impronta genómica (Li, Beard y Jaenisch, 1993; Jaenisch y Bird, 2003). Por otro lado, la mADN dentro del cuerpo del gen tiende a correlacionar de manera positiva con la transcripción (Huh *et al.*, 2013). Además, algunos estudios han documentado una mayor mADN en exones en comparación con la región correspondiente a los intrones. También, una disminución en la mADN en exones alternativos suele marcar una diferencia entre estos y los exones constitutivos (Hodges *et al.*, 2009; Gelfman *et al.*, 2013). Estas observaciones implican una participación de la mADN en el proceso de splicing. En cuanto a las regiones limitantes no codificantes –UTRs- no existe una correlación bien definida entre metilación y expresión (Martino y Saffery, 2015), sin embargo, se sugiere que el estado de metilación del 5'UTR se asocia negativamente con el inicio de la transcripción del primer exón (Hodges *et al.*, 2009). Otras funciones propuestas de la mADN dentro de las regiones UTR, es la

regulación en la elongación durante la transcripción y estabilización del ARN mensajero (Choi *et al.*, 2009).

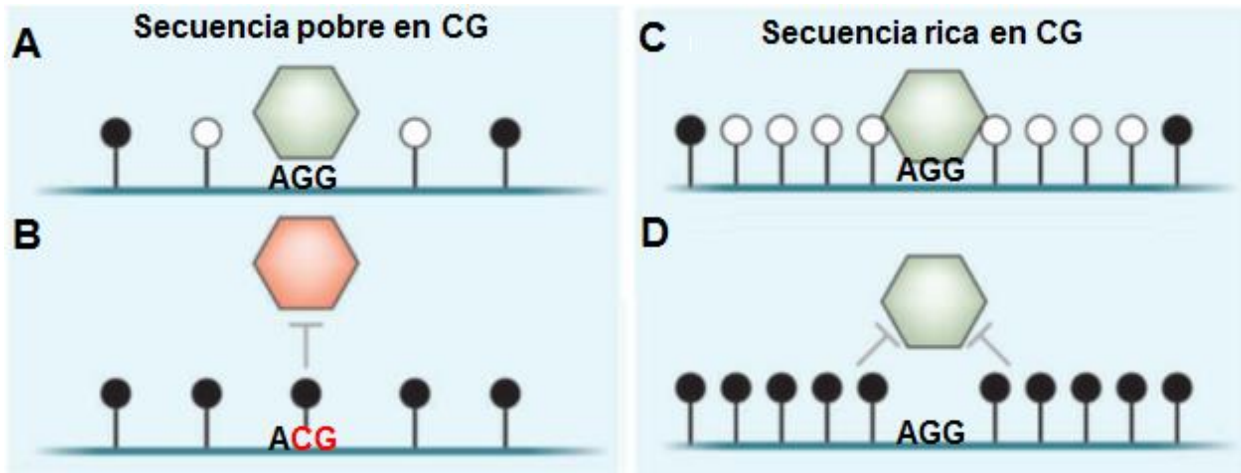


Figura 2: Epigenética y factores de transcripción. A) La unión de factores de transcripción a regiones pobres de contenido de CG favorece un estado local no-metilado, B) aunque algunos factores de transcripción pueden ser sensibles a la metilación aun en regiones pobres en CG. C) Aquellos factores de transcripción que se unen a regiones ricas en CG (ICG) requieren que la región se encuentre en un estado no-metilado, y D) puede ser bloqueada la unión de este si se encuentra metilada (Figura adaptada de Schubeler 2012). La paleta blanca describe un locus CpG no metilado, mientras que la paleta negra denota un locus CpG metilado.

Mecanismos de regulación transcripcional mediadas por la metilación del ADN:

Existe evidencia de que la mADN en regiones promotoras puede impedir directamente la unión de factores de transcripción a su secuencia afín de ADN o indirectamente a través de interacciones con otros modificadores epigenéticos (Suzuki y Bird, 2008). Tal es el caso de la familia de proteínas de unión a CpG metiladas (*Methyl-CpG-binding proteins*, MBPs por sus siglas en Inglés), que incluyen MBD1, 2, 4 y MeCP2 (Nan, Meehan y Bird, 1993). Las MBPs pueden interactuar con varios tipos de proteínas, p. ej. con las proteínas histona desacetilasas (HDACs, por sus siglas en inglés), lo que resulta en una remodelación de la cromatina, reduciendo la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al ADN (Bogdanović y Veenstra, 2009). Además, la mADN aumenta la modificación de histonas por *polycomb* en regiones promotoras, la cual media la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27m3), modificación epigenética identificada como una marca represiva de transcripción (**Figura 2 y 3**; Mohn *et al.* 2008).

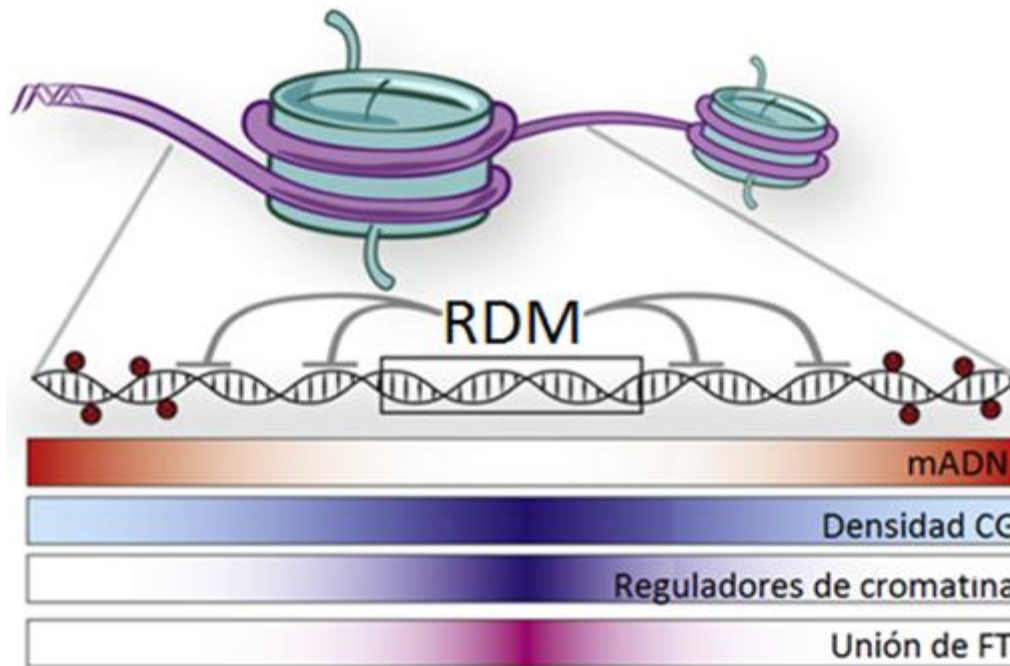


Figura 3: Metilación del ADN, densidad del contenido CG y regulación en la transcripción. Una alta densidad del contenido CG protege a la secuencia que lo contiene de la metilación, reclutando reguladores de la cromatina que favorecen la unión de factores de transcripción (FT), los cuales aumentan la actividad transcripcional. Todo lo opuesto ocurre en aquellas regiones en las cuales disminuye el contenido CG, favoreciendo la hipermetilación e impidiendo la actividad transcripcional (Figura adaptada de Meissner 2011). RDM; Región Diferencialmente Metilada.

Modulación de la metilación diferencial del ADN

Durante el desarrollo

Una propiedad fundamental de la mADN es su potencial reversibilidad, como se observa en el desarrollo embrionario. En etapas tempranas, los patrones de mADN sufren profundos cambios ya que el genoma paterno es rápidamente desmetilado, mientras que el genoma materno exhibe hipometilación gradual hasta la etapa de 8 células. Posteriormente, los patrones de metilación son re-establecidos *de novo* en el embrión en desarrollo (Reik, Dean y Walter, 2001; Surani, Hayashi y Hajkova, 2007; Sasaki y Matsui, 2008; Smith *et al.*, 2012; Hackett y Surani, 2013). También el proceso de envejecimiento se ve asociado con cambios generales en la mADN, donde se observa un aumento en los niveles de mADN (hipermetilación) de promotores selectos y una hipometilación global del genoma, además existe una disminución en la expresión de DNMTs (Heyn *et al.* 2012; revisado por Jung y Pfeifer 2015).

En enfermedad

En la actualidad, las ENT son las principales causas de muerte, siendo responsables de cerca del 70% de los fallecimientos a nivel global (Bloom *et al.*, 2011; World Health Organization, 2015; **Figura 4**). Un caso en particular es la cardiopatía isquémica, la cual destaca siendo la primer causa de muerte en México y el mundo (Naghavi *et al.*, 2014) . La progresión de las ENT depende de factores no-modificables (p. ej. sexo, edad o la genética) y factores modificables. Estos últimos incluyen el consumo de tabaco o alcohol, una dieta no saludable, falta de actividad física, sobrepeso u obesidad, presión arterial alta, infecciones crónicas y contaminación medioambiental, por mencionar algunos (Bonita, Beaglehole y Kjellstrom, 2006). La contribución de algunos de estos factores sobre la enfermedad (cáncer, diabetes, y enfermedades cardiovasculares –ECV–) varían entre ellos. Por ejemplo, se estima que cerca del 40% de los casos de cáncer (Danaei *et al.*, 2009) y el 80% de los casos relacionados con ECV, derrame cerebral y diabetes tipo II (McGill, McMahan y Gidding, 2008) son directamente causados por la dieta, cuyos componentes fundamentales incluyen a los ácidos grasos (AGs).

Dado que el epigenoma puede ser modificado por estímulos derivados del medio ambiente y de la dieta, se ha explorado el papel de la epigenética en las enfermedades. En la actualidad, la disponibilidad de tecnologías de secuenciación del ADN modificado con bisulfito y plataformas (microarreglos) de amplia cobertura, han facilitado la caracterización de los metilomas de varias ENTs (Keating y El-Osta, 2015). En todos los casos analizados, el estado de metilación de genes específicos se encuentra alterados en cada enfermedad y pueden variar con la severidad de ésta.

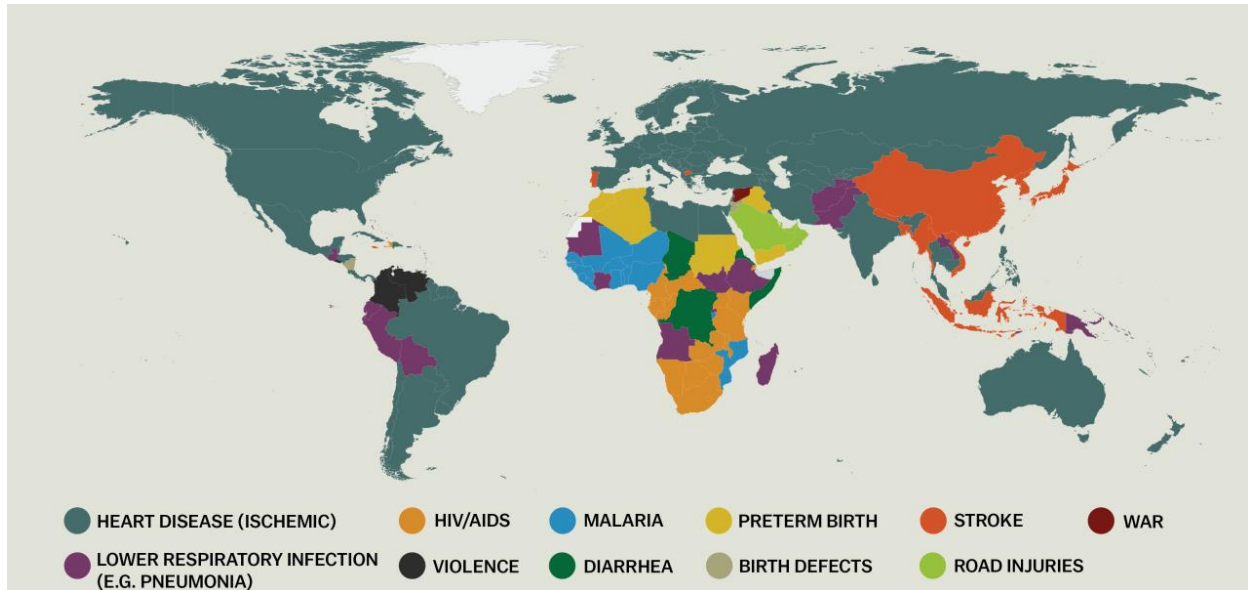


Figura 4: Principales causas de muerte a nivel mundial al año 2014. Figura adaptada de Naghavi *et al.* 2014.

El caso más estudiado es el cáncer, el cual se caracteriza por la presencia de una hipometilación global del genoma y al mismo tiempo, hipermetilación en algunas ICG de promotores, sobre todo de genes supresores de tumor (Feinberg y Tycko, 2004). En varios tipos de cáncer, esta hipometilación global se observa sobre todo en secuencias repetidas de ADN – p. ej. elementos *ALU* y *LINE-1*-, las cuales normalmente se encuentran metiladas (Ehrlich, 2002). El estado de metilación de estos elementos repetidos tiene un impacto sobre los niveles de transcripción de algunos genes tumorales (Sirivanichsuntorn *et al.*, 2013). Otro componente de la firma epigenética del cáncer es la metilación diferencial de las "playas CpG" en comparación con el estado de metilación de dichas playas en tejidos sanos (Doi *et al.*, 2009; Irizarry *et al.*, 2009). Sin embargo, en otras enfermedades – como la diabetes - aquellas ICGs que se caracterizan por poseer un estado metilado en tejido sano, pasan a un estado hipometilado (Dayeh *et al.*, 2014), y el cambio opuesto se observa frecuentemente en algunas ICGs en cáncer.

Otro ejemplo es la aterosclerosis, caracterizada por cambios dinámicos en la metilación de ADN a lo largo de la progresión de la enfermedad (Castillo-Díaz *et al.*, 2010; Zaina, 2014; Valencia-Morales *et al.*, 2015; Zaina *et al.*, 2015). En particular, se ha identificado una hipermetilación global del ADN durante etapas tempranas de la enfermedad mientras que en la lesión avanzada predomina la hipometilación del ADN en ICG y secuencias repetidas.

Componentes en la dieta y modificaciones epigenéticas

La dieta representa un factor importante en el desarrollo de ENTs. De manera interesante, los efectos de la dieta no solo afectan al individuo expuesto a ella, sino que también ejercen un efecto a nivel transgeneracional (revisado en Soubry, 2015). Por ejemplo, datos epidemiológicos han revelado que la diabetes y ECV en niños pueden ser influenciadas por el estado nutricional de sus padres y abuelos (Kaati, Bygren y Edvinsson, 2002). Dada la importancia de la dieta en ENT, existen varios estudios epidemiológicos en humanos que han identificado componentes en la dieta que son benéficos o perjudiciales para la salud. De igual forma, varios estudios han investigado los efectos epigenéticos de varios componentes de la dieta, muchos de ellos hechos en modelos murinos (Waterland y Jirtle, 2003; Dolinoy *et al.*, 2006). Estos estudios han mostrado que el fenotipo de ratones puede ser modificado a través de mecanismos epigenéticos a nivel global o gen-específico, mediados por la exposición nutricional a corto o mediano plazo (Mckay y Mathers, 2011; Bermingham *et al.*, 2013; Delaney *et al.*, 2013; Heyman-Lindén *et al.*, 2015).

Ácidos grasos

Los AGs son componentes esenciales del metabolismo de prácticamente todos los organismos. Forman parte de las membranas biológicas, proveen energía mediante su oxidación y además participan en rutas de señalización intracelular que regulan un amplio rango de respuestas celulares (Duplus y Forest, 2002; Cao *et al.*, 2008; Zhang y Rock, 2009). Convencionalmente los AGs se dividen en tres grupos en función al número de enlaces insaturados que posea su estructura química: saturados, los cuales carecen de dobles enlaces; monoinsaturados, que solo poseen un doble enlace y poliinsaturados, los cuales contienen al menos dos dobles enlaces (SFA, MUFA y PUFA, respectivamente por sus siglas en inglés). Los MUFA y PUFA, pueden pertenecer a los grupos Ω (-3,-6,-9, etc.), basados en la posición del carbono que participa en el primer doble enlace a partir del último carbono de la cadena, es decir del grupo metil. Los AGs Ω -3 y Ω -6 son denominados esenciales dado que son necesarios, ya que el cuerpo humano no puede sintetizarlos (o los sintetiza en una tasa menor a la necesaria) y la única o predominante fuente de estos es mediante la alimentación. Se considera *indispensable* la ingesta del ácido linoleico y α -linolenico (Ω -6 y -3, respectivamente), ya que el cuerpo humano no los puede sintetizar y ambos son indispensables precursores de varias biomoléculas.

Ácidos grasos: Su efecto en procesos biológicos y en enfermedad

La función de los AGs en la gran diversidad de los procesos biológicos en los cuales participan, recae principalmente en la longitud y el patrón de saturación/desaturación de la cadena alifática. Por consiguiente, la correcta elongación y desaturación es esencial para el mantenimiento de la homeostasis lipídica (revisado en Guillou *et al.* 2010). Por ejemplo, el grado de insaturación de los AGs ejerce diferentes efectos sobre las propiedades físicas de las membranas biológicas como la fluidez, que a su vez puede afectar a la homeostasis celular.

Los AGs libres -aquellos que no se encuentran acoplados a otras biomoléculas- y sus derivados, pueden regular procesos intracelulares a varios niveles, tal es el caso de la regulación transcripcional de genes, modificaciones post-transcripcionales de proteínas (p. ej., acilación) y dirigiendo la modulación directa de la actividad enzimática funcionando como un co-activador (revisado por Papackova y Cahova 2015). Estos pueden regular el metabolismo celular actuando como agonistas de diferentes receptores nucleares que tienen función de factores de transcripción. Los receptores nucleares que tienen como ligandos a los AG pertenecen a varias familias, de las cuales destaca la familia de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs por sus siglas en inglés), siendo una de las familias más extensamente estudiadas (revisado por Grygiel-Górniak 2014). La unión de AGs a los PPARs es relativamente inespecífica, pero existe preferencia por PUFAs de cadena larga (Forman *et al.*, 1995). La familia de PPARs comprende tres isoformas: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , las cuales difieren en términos de la distribución en tejidos, la especificidad a ligandos y sus papeles fisiológicos (Berger y Moller, 2002). Todas participan en la homeostasis lipídica y en la regulación de glucosa (Willson *et al.*, 2000). La expresión de PPAR α se observa a la alza en tejidos con una alta demanda metabólica (p. ej. hígado, corazón, músculo) y se encuentra implicado en el metabolismo de lípidos, ya que se ha observado su activación cuando existen niveles bajos de estos (Neschen *et al.*, 2007). Por otra parte, PPAR γ abunda en tejido adiposo y es importante para la regulación de la adipogénesis, balance de energía y biosíntesis de lípidos (Lehrke y Lazar, 2005; Medina-Gomez *et al.*, 2007). La isoforma PPAR β/δ ha sido poco estudiada en comparación a las otras formas antes mencionadas. Esta isoforma se expresa de manera ubicua en todos los tejidos; sin embargo en aquellos tejidos involucrados en el metabolismo de lípidos (p. ej. Hígado o riñón) no solo participa en la oxidación de AGs, sino que también participa en la regulación de los niveles de colesterol y glucosa en sangre (Wang *et al.*,

2003; Stephen *et al.*, 2004). En general, los PPARs desencadenan una respuesta transcripcional una vez que estos son activados por los AGs, ya que se translocan al núcleo donde forman heterodímeros con otro receptor nuclear –receptor X de retinoide (RXR)- para posteriormente unirse al elemento de respuesta a PPAR (PPREs, por sus siglas en inglés) de los genes blanco de los PPARs, Los genes que contienen PPREs por lo general se encuentran involucrados con el metabolismo de AGs (revisado en Berger y Moller 2002).

De particular interés -para el desarrollo de esta tesis- es la relevancia de los AGs sobre la salud. En un organismo, el conjunto de AGs en circulación está compuesto por aquellos provenientes de la dieta (exógenos) y aquellos sintetizados *de novo* (endógenos). Sin embargo, cambios en dicho conjunto han sido asociados en la aparición y progresión de varias ENTs, en particular con aquellas relacionadas con enfermedades metabólicas, como la diabetes (Randle *et al.* 1963), aterosclerosis (revisado en Thijssen y Mensink 2005) y cáncer (revisado en Currie *et al.* 2013; Khankari *et al.* 2016). Estudios epidemiológicos indican que el consumo de SFAs y AGs-*trans*, se encuentran asociados con una alza en los casos de varios tipos de cáncer y ECV (De Marzo *et al.* 2007; Yu *et al.* 2014; Shivappa *et al.* 2015). El caso de la diabetes es diferente, ya que muestra una tendencia heterogeneidad entre la incidencia de la enfermedad y los niveles de SFA (de Souza *et al.*, 2015). Uno de los efectos negativos de una dieta rica en SFA es el aumento en los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), incrementando el riesgo de desarrollar una ECV. Por otro lado, la ingesta de MUFA y PUFA disminuye el riesgo de ECV (Hooper *et al.*, 2015).

Existe un nexo claro entre algunos AGs y la inflamación. Los AGs liberados de los fosfolípidos de la membrana mediante la acción de las fosfolipasas celulares, son sustratos para la síntesis de varias moléculas pro- y anti-inflamatorias (Adkins y Kelley, 2010). En general, PUFAs Ω -6 se asocian con la producción de moléculas pro-inflamatorias. Un ejemplo es el ácido araquidónico (AA), que normalmente forma parte de los fosfolípidos de la membrana celular y es muy abundante en el cerebro, hígado y en músculo, donde constituye una molécula clave en la respuesta inflamatoria (Calder, 2009). Por otro lado, PUFAs Ω -3 y Ω -9 se asocian con efectos anti-inflamatorios (Bagga *et al.*, 2003; Gao, Griffiths y Bailey, 2009).

Los ácidos grasos pueden modificar el metiloma humano

Se ha reportado que ciertas lipoproteínas pueden inducir cambios globales en la mADN de células monocíticas THP-1 (Lund *et al.*, 2004; Rangel-Salazar *et al.*, 2011). En particular, se observó una respuesta mayor en la mADN inducida por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en comparación con lipoproteínas de alta densidad (HDL) o LDL. Dado que la composición de las VLDL es rica en triglicéridos, se sugiere que los AGs, o sus metabolitos, pueden ser los mediadores de esta respuesta epigenética a las VLDL. De hecho, existen reportes *in vivo* e *in vitro* de que AGs específicos pueden inducir cambios en la mADN. Por ejemplo, concentraciones bajas (<10 μM) de AA, inducen hipometilación en células de la vena endotelial de humano (Kiec-Wilk *et al.* 2007; Kiec-Wilk *et al.* 2009). El ácido palmítico (AP) provoca un incremento en la mADN en islotes pancreáticos humanos (Hall *et al.* en el 2014) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) en células promonocíticas (U937) provoca una hipometilación en regiones promotoras de genes supresores de tumor (Ceccarelli *et al.*, 2011). Nuestro grupo ha mostrado un comportamiento similar al descrito por los efectos del AA y EPA en sangre periférica, es decir, una asociación positiva entre el porcentaje de estos y los niveles de mADN (de la Rocha *et al.*, 2016). En ratones, se sabe que dietas altas en AGs -como la dieta occidental- regulan la expresión de genes asociados a procesos de β -oxidación, además de que cambios en la mADN son asociados con este tipo de dieta hipercalórica (Wang *et al.*, 2003; Uriarte *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015). Asimismo, nuestro grupo de investigación observó que en la progenie de ratones suplementados con AA y eláidico en etapa de lactancia, aumentaban los niveles globales de la mADN, además de presentar cambios a nivel transcripcional (Flores-Sierra *et al.*, 2016).

Un posible mecanismo por el cual los AGs pueden modificar el metiloma es la interacción con receptores nucleares -arriba mencionados- que una vez activados pueden favorecer marcas epigenéticas permisivas de la transcripción (Jiang *et al.*, 2007; Sugii y Evans, 2011; Blattler y Farnham, 2013).

Ácidos grasos, β -oxidación y mADN: Antecedentes directos del proyecto

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo revelaron que el AA induce una hipermetilación global del ADN de manera dosis dependiente en células THP-1, en un rango de 0 a 200 μM . La amplitud de la hipermetilación a 100 μM de AA relativo a la concentración de 1 μM fue del

~10.5% en el contenido global de 5mdC. El caso de los efectos del ácido oleico (AO), este indujo una hipometilación modesta y generalizada en la mADN en el rango de dosis de 1 μ M y 100 μ M. Estos efectos no solo fueron observados en el modelo THP-1, sino que también fueron consistentes en otros modelos celulares tales como células de riñón humano (HEK293T).

Durante la estancia de investigación de la Dra. Lund (Grupo de Biología de la Cromatina del Dr. Alejandro Vaquero, IDIBELL, Barcelona), se realizó un experimento donde células THP-1 fueron estimuladas con tres diferentes concentraciones de AGs (1, 10 y 100 μ M de AA o AO) durante 24 horas para posteriormente utilizar el ADN y ARN sobre dos plataformas de microarreglos (*Infinium HumanMethylation450 BeadChip* y *GeneChip® Human Exon*; respectivamente) con el fin de analizar los efectos de los AGs sobre la mADN y expresión. Posteriormente, realizó la validación de los perfiles de mADN mediante la pirosecuenciación de 11 CpGs correspondientes a 6 genes elegidos aleatoriamente entre aquellas CpGs que mostraran un cambio en la mADN > 1% entre las dosis de 1-100 μ M. Siete de los CpGs a analizar se encontraban representados dentro del arreglo para el análisis de la mADN y 4 CpGs que flanqueaban la secuencia representada (Silva-Martinez *et al.*, 2016). Además, se encontró evidencia bioquímica de que PPAR α , sirtuina 1 y procesos relacionados con β -oxidación se encuentran dentro de los factores que median los cambios en la mADN inducidos por los AGs (Silva-Martinez *et al.*, 2016).

El propósito de esta tesis, es identificar aquellas regiones y/o genes que cambian su mADN en respuesta a estímulos con el AA o AO; además, los mecanismos moleculares y el impacto transcripcional de dichos cambios, mediante el análisis bioinformático de los datos obtenidos por nuestro laboratorio.

Hipótesis

Existen regiones génicas cuyo estado de metilación cambia en respuesta al ácido araquidónico o ácido oleico, afectando los niveles de transcripción.

Objetivo

Identificar los genes que cambian su metilación del ADN (mADN) en respuesta a estímulos con el AA o AO; además, los mecanismos moleculares y el impacto transcripcional de dichos cambios.

Objetivos Específicos

- Identificar secuencias que muestran cambios en la mADN en células THP-1 estimuladas con concentraciones diferentes de AA o AO mediante el uso de un microarreglos de metilación del ADN.
- Evaluar el estado de metilación de secuencias repetidas (ALU) en células THP-1 estimuladas con los AGs.
- Identificar características del ADN que estén asociados con cambios en la mADN (distribución génica, contenido de CpG, genes, vías de señalización) en respuesta al estímulo de los AGs.
- Analizar la respuesta transcripcional de células THP-1 al estímulo de los AGs, posteriormente sondear si existe una relación entre metilación y expresión génica.
- Evaluar la relevancia biológica del AA o AO en los efectos en la mADN mediante comparaciones *in silico* contra otros perfiles de mADN.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Cultivos celulares de monocitos THP-1 fueron cultivados en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 2 mM de L-Glutamina (Sigma), 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). Se mantuvieron a una concentración no mayor a 1.5×10^6 células/ml. Los AGs puros (Sigma) se conjugaron con albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) libre de AGs grado cultivo celular (Sigma) a una relación AG: BSA 6:1, tal cual se describe en Marshall *et al.* 2007. Cultivos que contenían $5-6 \times 10^6$ células en 10 ml de medio (2% SFB y sin antibióticos) fueron estimulados con la mezcla 100x AG: BSA, ajustando el volumen para las concentraciones de 1, 10 y 100 μM . Todos los experimentos en los cuales se utilizaron estas células, contaron con al menos un triplicado técnico y biológico, a excepción de los experimentos de los microarreglos, los cuales se realizaron con una mezcla del material génico de tres réplicas biológicas.

Microarreglo para determinar mADN

Con el propósito de identificar los cambios en la mADN inducidos por el estímulo de AGs, se utilizó el microarreglo *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* de Illumina (450k), el cual incluye 485,764 *loci* de citosinas distribuidas a lo largo del genoma humano, cubriendo cerca del 99% de los genes anotados y cerca del 96% de las ICG. Tres replicas biológicas de cada experimento con diferentes concentraciones de los AGs, fueron agrupadas en igual porción con el fin de disminuir la variación y el ruido en los datos (Peng *et al.*, 2003). La calidad del ADN, conversión con bisulfito, hibridación, normalización de los datos con el software *GenomeStudio* (Illumina) y determinación del parámetro Beta (β) se realizaron según las recomendaciones del proveedor. Fueron removidas aquellas sondas que no cumplieron con el criterio de detección ($P\text{-value} > 0.05$) sobre el fondo o aquellas que se encontraran relacionadas a SNP (Valencia-Morales *et al.*, 2015). Los niveles de metilación de cada citosina, expresados como un valor β , se calcularon de acuerdo a los niveles de fluorescencia entre los dos tipos de canales que posee el arreglo, uno rojo (CpG no metilada) y uno verde (CpG metilada). Toma valores de 0 a 1 (no metilado y metilado, respectivamente). El valor logarítmico de los valores de β (valor M) fue utilizado -solo cuando se indica- para realizar algunas pruebas estadísticas (Du *et al.*, 2010). La anotación

relacionada a las ICGs usa la siguiente nomenclatura: “playa”, región de 2kb que flanquea a la ICG; “arrecife, región de 2kb inmediatamente adyacente a la playa; “mar abierto”, aquel ADN no incluido en las ICG, playas o arrecifes. La anotación génica TSS1500 o TSS200 indican la región -1500 pb o -200 pb del sitio de inicio de la transcripción, respectivamente (Sandoval *et al.*, 2011). Los datos obtenidos del microarreglo 450k fueron depositados dentro del *Gene Expression Omnibus* (Edgar, Domrachev y Lash, 2002) del *NCBI* con el número de accesión GSE67331; dichos datos se encuentran disponibles al público.

Microarreglo de expresión

Con el propósito de analizar los cambios a nivel transcripcional inducidos en células THP-1 estimuladas con AGs, y su posible relación con los cambios en los niveles de mADN, se analizó la expresión génica mediante el microarreglo *GeneChip® Human Exon* de Affymetrix. Este microarreglo permite analizar niveles de transcripción por exones y permiten identificar eventos de transcripción alternativa; además brinda la expresión a nivel de genes y la posibilidad de analizar más de 1, 000, 000 de sondas individuales y analizarlas con bases de datos de transcritos como lo es *ENSEMBL*. El ARN utilizado proviene de las mismas células utilizadas para el experimento con la plataforma 450k -tres replicas biológicas de cada experimento con diferentes concentraciones de los ácidos grasos y agrupadas en igual porción-, la calidad y concentración de éste se analizó mediante metodología estándar. Mediante el uso del software *Affymetrix Expression Console™* (versión 1.3) y el algoritmo RMA, se normalizaron y analizaron los datos obtenidos del microarreglo. Se utilizó la librería *HuEx-1_0-st-v2.r2.pgf*, además de dos juegos de datos para las sondas, uno para determinar los niveles de expresión a nivel génico (*HuEx-1_0-st-v2.r2.dt1.hg18.extended.mps*) y a nivel de exones (*HuEx-1_0-st-v2.r2.dt1.hg18.full.mps*). Los datos obtenidos se depositaron en el *Gene Expression Omnibus* (Edgar, Domrachev y Lash, 2002) con el número de accesión GSE57076. La validación de genes selectos se realizó mediante RT-PCR semi-cuantitativo y normalizado con niveles de expresión de *GAPDH*.

Detección del estado de metilación de elementos ALU en células THP-1

Los elementos ALU son una familia de retrotransposones que se encuentran en abundante proporción a lo largo del genoma humano, por lo que el estado de metilación de estos elementos ha sido utilizado como un sustituto para determinar de manera indirecta el contenido total de

5mdC. El estado de metilación de los elementos ALU se determinó de acuerdo a lo descrito por Sirivanichsuntor (2013). Brevemente, ADN tratado con bisulfito (EZ DNA Methylation Kit, Zymo) fue utilizado como template para amplificar una región consenso en el elemento repetido ALU de 117pb con los oligonucleótidos específicos AluF: 5'-GGY GYG GTG GTT TAY GTT TGT AA-3' y AluR: 5'-TTA ATA AAA ACR AAA TTT CAC CAT ATT AAC CAA AC-3' bajo las siguientes condiciones: 95°C por 30s, 53°C por 20s (40 ciclos) y 72°C por 20s. Posteriormente, el amplicón se digirió a 65°C con la enzima *TaqI* (toda la noche; Invitrogen), generando tres productos de diferente tamaño dependiendo del estado de metilación de los elementos ALU: estado no metilado (^uC^uC, 117pb), parcialmente metilado (^mC^uC y ^uC^mC, 74 y 75pb, respectivamente) o completamente metilado (^mC, 42 y 43pb). Fueron separados por electroforesis con un gel de agarosa al 3%, teñido con GelRed. Los niveles de metilación se determinaron por densitometría con el software ImageLab (BioRad).

Análisis comparativo de los perfiles de metilación con datos públicos

En la actualidad existen varias tecnologías de amplia cobertura genómica, sin embargo una de las más utilizadas es el microarreglo de Illumina (450k). Esta plataforma ha sido utilizada para obtener el perfil de metilación del ADN de varias enfermedades, así como perfiles de metilación tejido-específico. Con el fin de validar y comparar nuestros resultados, perfiles de mADN de diferentes estudios obtenidos bajo la misma plataforma (450k) y públicamente disponibles, fueron utilizados para analizar la relevancia de nuestros resultados. Dichos estudios comprenden enfermedades metabólicas (diabetes tipo 2, pérdida de peso después de un *bypass* gástrico y aterosclerosis), desordenes psiquiátricos (autismo y esquizofrenia) y cáncer (colorrectal, hepático, leucemia pediátrica y sangre de pacientes con cáncer de mama). La inclusión de estos estudios se justifica por el hecho de la gran relevancia de los AGs como fuente de energía, por sus metabolitos biológicamente activos y su relación con desordenes psiquiátricos. Además, a manera de control se utilizaron 8 perfiles de metilación correspondientes a tejidos sanos. Las características y referencias de los estudios analizados, se encuentran descritos en la **Tabla I**. Cabe resaltar que los perfiles utilizados para realizar la comparación, fueron aquellos reportados por sus respectivos autores. Así pues, se generaron varios *scripts* computacionales para curar y acoplar las diferentes bases de datos. La relación entre los diferentes perfiles de mADN se realizó mediante el cálculo de distancia Euclidiana.

Tabla I: Características de estudios referenciados que se realizaron bajo la plataforma 450k.

Estímulo, Enfermedad o tejido	Muestras de comparación	Criterio de corte del $\Delta\beta$
Diabetes Tipo 2 (Dayeh <i>et al.</i> , 2014)	Isletas pancreáticas de provenientes de pacientes diabéticos y no diabéticos (n=15 y n=34, respectivamente)	0.05
Islotes pancreáticos humanos (Hall <i>et al.</i> , 2014)	Islotes pancreáticos humanos estimulados con palmitato a 1mM (n=13)	0.001
Obesidad (Benton <i>et al.</i> , 2015)	Tejido adiposo subcutáneo antes y después de una cirugía de <i>bypass</i> gástrico y pérdida de peso (15 pares)	0.02
Autismo (Nardone <i>et al.</i> , 2014)	Córtex prefrontal (BA10) y su control (12 pares) de pacientes con autismo	0.05
	Córtex del cíngulo anterior (BA24) y su control (11 pares) de pacientes con autismo.	0.05
Esquizofrenia (Wockner <i>et al.</i> , 2014)	Córtex frontal de tejido cerebral <i>post-mortem</i> de individuos diagnosticados con esquizofrenia y controles (24 pares)	0.14 [‡]
Ateroesclerosis (Zaina <i>et al.</i> , 2014)	Aortas ateroscleróticas y no ateroscleróticas (15 pares)	0.15
Adenocarcinoma colorrectal (Naumov <i>et al.</i> , 2013)	Tejido mucoso sano o enfermo de pacientes con cáncer (22 pares) y 19 individuos saludables	0.2
Hepatocarcinoma (Shen <i>et al.</i> , 2013)	Tumor de hepatocarcinoma y tejido adyacente no tumoral (n=66)	0.2
Leucemia (Nordlund <i>et al.</i> , 2013)	Muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con leucemia linfocítica aguda (n=764) y médula ósea (n=137) de individuos sanos	0.2
Cáncer de mama (Heyn <i>et al.</i> , 2013)	Muestras de sangre periférica de gemelos, uno diagnosticado con cáncer de mama y uno sano (8 pares)	Prueba de rango Wilcoxon (p<0.001)

Enfermedad, tejido o modelo	Muestras de comparación	Criterio de corte del $\Delta\beta$
Envejecimiento (Steeenga <i>et al.</i> , 2014)	Células mononucleadas de sangre periférica de hombres jóvenes y adultos (5 pares)	0.05
Sangre*		
Hígado*		
Colon*		
Mama*	Comparado contra los otros 7 tejidos somáticos-excluyendo el que se está analizando- de individuos saludables (n=50)	0.2
Tiroides*		
Riñón*		
Pulmones*		
Próstata*		
*(Lowe <i>et al.</i> , 2015)		

Resultados

Identificación de CpGs que muestran cambios en la metilación dependiente de la dosis de AA o AO

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han identificado cambios en la mADN en células THP-1 estimuladas con diferentes concentraciones -metabólicamente significativa- de AA y AO. Con el fin de identificar aquellas regiones génicas que presentan una mADN diferencial dependiente de la dosis de los AGs, se optó por realizar un análisis a nivel del dinucleótido CpG a lo largo del genoma de células THP-1 usando la plataforma 450k de Illumina. Dicha plataforma permite conocer el estado de metilación de >485,000 CpG distribuidos a lo largo del genoma, abarcando regiones intragénicas, intergénicas y elementos no repetidos (Sandoval *et al.*, 2011). Los datos del arreglo 450k fueron generados a partir de ADN extraído de monocitos THP-1 estimulados con 1, 10 y 100 μM de AA o AO por 24 horas. Cabe resaltar que los estímulos con AGs representan dosis fisiológicamente significativas y que la proliferación celular no se ve afectada en células THP-1, como lo han reportado otros investigadores (Finstad *et al.*, 1994; Higashiyama *et al.*, 2015).

Teniendo como propósito analizar la similitud existente entre los perfiles de mADN obtenidos en respuesta al estímulo de los AGs, se optó por realizar un análisis de *clustering* no supervisado, es decir sin establecer parámetro alguno sobre los datos. Este método es una primera aproximación para determinar el nivel de divergencia entre los perfiles de mADN en respuesta a los diferentes estímulos de AA o AO (**Figura 5**). El resultado obtenido por este método valida de manera independiente las observaciones previas de nuestro grupo, puesto que se observa una divergencia entre los perfiles de mADN obtenidos a las concentraciones altas y bajas, siendo más similares aquellos perfiles obtenidos bajo la concentración intermedia. Teniendo claro el efecto opuesto y dependiente de la dosis en la mADN por efecto del AA y AO, se prosiguió a analizar las características generales de los datos sin filtrar obtenidos del arreglo 450k. La diferencia entre la suma de los valores de β de aquellos CpGs más metilados ($\beta > 0.75$) y aquellos CpGs menos metilados ($\beta < 0.25$), mostraron un incremento del 4.4% dependiente de la dosis y un decremento del 2.6% entre las dosis de 1 y 100 μM de células estimuladas con AA o AO, respectivamente (datos no mostrados).

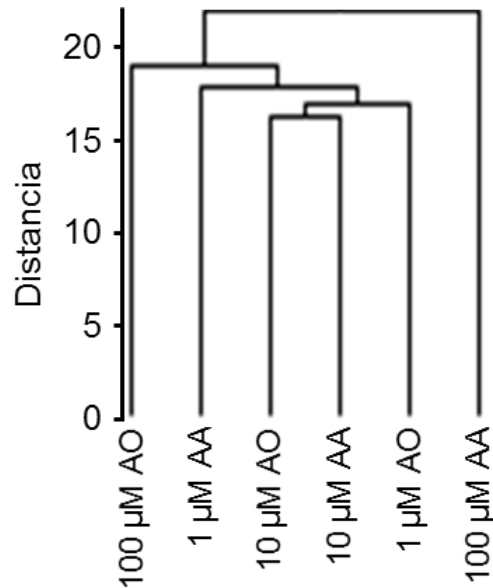


Figura 5: Análisis de *clustering* no supervisado del microarreglo de alta densidad de la metilación del ADN (450k) de células THP-1 estimuladas con AGs. Fueron tomados los datos normalizados de los perfiles de mADN correspondientes, sin aplicar ningún criterio de selección. Calculándose con el algoritmo de distancia Euclidiana.

Posteriormente, al haber observado evidencia de que el AA ejerce una respuesta de hipermetilación del ADN y el AO una hipometilación del ADN, ambos de manera dosis dependiente, establecimos un criterio de búsqueda de CpGs que presentaran un cambio en la mADN de manera dosis dependiente en respuesta al estímulo de los AGs, entre las dosis consecutivas de 1, 10 y 100 μM ($\Delta\beta$). En un principio, establecimos un criterio donde se tomarían en cuenta aquellas CpG que mostraran un $\Delta\beta > 0.1$ entre las dosis consecutivas de AGs, con el fin de identificar perfiles dosis-dependiente de las dosis de AGs. Bajo este criterio, se detectaron 283 y 275 CpGs que mostraron metilación dependiente de la dosis en células estimuladas con AA o AO, respectivamente (**Figura 6A**). Sesenta y seis por ciento (187/283) de las CpGs que responden al estímulo con AA mostraron hipermetilación con un incremento promedio de un $\Delta\beta = 0.20$ (20%; 0.10-0.97). Por el contrario, 77% (213/275) de CpGs diferencialmente metiladas en células estimuladas con AO mostraron una hipometilación con un $\Delta\beta = -0.16$ promedio (16%; entre -0.10 y -0.88). El Delta-Beta de la hipermetilación de ADN por efecto del AA es mayor que aquel de la respuesta a hipometilación por efecto del AO (ANOVA $F = 6.45$; $p = 0.01$). Estas CpGs detectadas como diferencialmente metiladas en respuesta al estímulo del AA o AO representan 184 y 194 genes, respectivamente, donde en promedio se detectaron 1 CpG/gen (**Tabla II y III**; respectivamente). De manera notable,

solo un gen, aquel que codifica para la histona desacetilasa 4 (*HDAC4*) mostró más de 3 CpGs que variaban su estado de metilación en respuesta a la dosis de los AGs.

Tabla II: Lista de genes diferencialmente metilados (DM) en respuesta al estímulo de diferentes dosis (1, 10 y 100 μ M) de AA.

Genes $\Delta\beta > 10\%$ AACpG				
RAP1GAP	SMN1	TFIP11	WDR36	TUSC3
KIAA1522	NRXN3	ELF2	TMEM200B	PGM1
VEPH1	ODZ4	DPPA2	FLT4	RANBP17
NKD2	DIP2C	METT10D	POMZP3	ZIC4
FANCM	DGKQ	FAM190B	SPATS2	RAPGEF6
TREX2	SRPX	PRDM16	ADAMTS19	ZBTB16
HDAC4	C12orf77	PLEKHB1	SYNPO	TRPC6
CASZ1	ZFR	IQSEC3	CDK14	PHACTR2
NEURL	TMBIM4	SLC6A18	PUM2	HOOK1
AQP12B	MYH10	PDZK1IP1	ACSF3	CYP2E1
GNAS	VWA2	TDRD10	DLG2	C10orf140
JPH2	KCNA1	CAST	GPR63	DLK1
HLA-DRB5	C6orf10	REXO1	SLC6A3	FSD1L
SLC37A4	C1orf228	PTPRS	DSP	LOC399959
ATP8B3	C12orf29	MAGI1	TBL1X	NKX2-6
BTBD16	COCH	RARA	HLA-B	ZNF391
TRAPPC9	PPM1L	IQSEC2	SLAIN1	TMEM171
MIR510	CYP2C19	DGKE	SGCE	TOX2
AHRR	DACH1	TMEM132B	SLC35F1	DKK2
NCF4	LAMA5	GPR125	NET1	MEG8
ETV6	CCDC144C	OR52J3	AREG	ASB18
ADARB2	PET112L	NOTO	FAM160A1	GRM3
LOC100128239	MIR548F5	NUP214	EYA4	MIR1181
ABCA10	CA10	ALPK1	GPR150	KCNK17
SNORD116-7	ZDHHC13	MITF	ZNF207	SRGAP1
MCF2L	PCNX	BICD1	SYNE1	KIF1A
TRIO	FBRSL1	TMEM91	PLEC1	C6orf127
ERBB4	CDH12	RAD51L1	PRKACB	ARHGEF4
RBM46	LOC100132831	CPT1A	SOST	CAPN10
DAB1	PLAC1L	PRKCQ	NFIA	RIC3
PDGFD	SLC12A7	CHFR	SPI1	RHOQ
TCERG1L	FAM71B	CTSS	LRRC16A	ADRB3
C1QL2	ANXA5	STT3A	ISM1	SH3BGRL2
SLC6A9	BCAS3	CRAMP1L	MYLK	SPTBN1
PHF21B	LY6K	DOK7	VTI1B	KIF2C
TSPY4	SMPD3	BAI1	FARP1	AJAP1
SMYD3	ATF1	NBLA00301	KCNMA1	

Tabla III: Lista de genes diferencialmente metilados (DM) en respuesta al estímulo de diferentes dosis (1, 10 y 100 μ M) de AO.

**Genes $\Delta\beta > 10\%$
AOCpG**

DIP2C	FRAS1	ITPR3	CHGA	STIL
HDAC4	MMP17	AVPR1A	PTP4A1	CDH6
CD177	SSH1	EXOC3	C12orf23	KLF6
PRKAR1B	DRD1	CTNNA3	LMO7	CHN2
ATP13A3	SPSB4	MTA1	psiTPTE22	DIAPH3
IGFBPL1	UBB	TUBB2B	SLC2A13	TTC28
RBMS1	IGFL2	KIAA1826	CHCHD1	FGFBP2
ANXA5	CACNA1A	HIST1H4D	FARS2	ZPLD1
FAM149B1	CDH4	LHFP	CCDC50	C5orf30
OR4E2	MECOM	RBM8A	RNF128	TAS1R1
HCG27	TEPP	CNOT8	PTPRN2	NFIA
ABCB4	MFSD9	GUCY1A2	HOXC8	OR10G8
PFN1	CRMP1	RASSF8	SLC7A14	KLHDC4
CASC5	DLX6AS	ACPT	TRPM8	LHFPL2
LOC284578	LOC200726	LAMA4	EIF4A3	INS-IGF2
REEP3	EXT1	TERT	ACVR1	C4orf21
LDLR	SETBP1	ADAM21P1	TRIM26	DIRAS3
SHANK2	CTSC	CNTFR	MGLL	ENTPD5
PIGL	FAM134A	IGF1R	ESR2	LOC100216001
CREM	LOC100133091	LCN1	AUTS2	FOXE1
FRS2	RPL23P8	MAN1A1	ANAPC5	GZMA
TRIM42	STAG1	ZC3H12C	ART3	ACSL4
CENPP	ACVR2A	LPCAT1	VGLL2	C14orf106
DOCK9	SPARCL1	PKD2	TRPC3	SND1
TBC1D22A	ASCC3	LOC100134868	UBE2I	DYNLL1
SCN3B	ATHL1	PDE2A	GPSM3	IL22
UNC80	ARL6IP5	PALLD	ADK	FRMD5
KERA	DMBX1	RNF152	KLF13	DAB2
PCDHB18	HIVEP1	SLC41A3	C3orf57	PAX2
ARNTL2	TCEAL3	C10orf25	SLC38A2	LOC442454
ITPR1	SLC1A3	LOC90784	ZNRF2	ROBO2
HBP1	FRMD4A	C7	TBX5	MAML2
FNDC1	BCL2L13	MICA	RBPM5	GRK5
FERMT2	SPATS2L	TPRA1	PCDHGA5	ZNF207
CCDC92	ZNF521	OXCT1	L3MBTL3	MANSC1
F2RL1	BANP	ZNF585A	PDE4C	HSPA1L
UGGT2	GNB1	GNG12	PCDHB12	GPR148
GPR63	FLJ42709	FOXK2	ERI1	RAPGEF6
TTC7B	ALX4	CXCL12	CUL4A	

A pesar de que el criterio aplicado anteriormente a los datos del arreglo 450k permitió la identificación de CpGs diferencialmente metiladas en respuesta al estímulo de AG, el pequeño número de dichas CpGs no explica la magnitud del efecto a nivel de 5mC total previamente identificado por nuestro grupo. Esta discrepancia en los resultados nos llevó a buscar la posible existencia de pequeños pero numerosos cambios en la mADN distribuidos de manera global en el genoma inducidos por el tratamiento con los AGs. Se adoptó un criterio más laxo para el manejo de los datos, buscando cambios con un $\Delta\beta > 0.005$ entre las dosis consecutivas de los AGs. Los datos fueron separados en dos subgrupos en función al comportamiento del $\Delta\beta$ (positivo o negativo en el caso respectivo de hipermetilación o hipometilación) entre las dosis de los extremos para posteriormente realizar una prueba de correlación de Spearman (r). Se incluyeron aquellos CpGs que tuvieran una $r > 0.985$, correspondiente a un valor de $p < 0.05$. Aquellos CpGs selectos serán referidos como AACpG o AOCpG. Este análisis identificó 57,187 AACpGs y 48,917 AOCpGs (**Figura 6B**), correspondientes a 14,483 y 13,194 genes, respectivamente. El valor absoluto del $\Delta\beta$ entre las dosis de 100 y 1 μM de AG oscila entre 0.29-0.01 para los dos subgrupos. Una minoría de AACpGs (6,432 o 11.2%) fueron detectados dentro del grupo de AOCpGs, que corresponden a 3,728 genes (**Tabla Suplementaria I**). Ninguno de los grupos de AACpG o AOCpG alcanzaron un valor de $p < 10^{-7}$ para ser considerado como cambios significativos en todo el genoma.

A pesar de que la metilación diferencial inducida por el AA o AO no alcanzó significancia genómica, es evidente una clara tendencia hacia la hipermetilación inducida por el AA y una hipometilación inducida por el AO, sugiriendo que los cambios de metilación son biológicamente relevantes aunque de magnitud modesta. La mayoría de los AACpGs (76.4%) y AOCpGs (74.7%) mostraron un patrón de hiper- o hipometilación dependiente de la dosis, respectivamente ($P = 6.7 \times 10^{-32}$, prueba Chi-cuadrada). Así pues, la magnitud neta de la hipermetilación de las AACpGs fue mucho mayor que su contraparte con tendencia hacia la hipometilación, ya que la suma de los $\Delta\beta$ entre las dosis de 100 y 1 μM de AA fue de 1,661.4 y -408.7 para ambos tipos de datos, respectivamente. Ahora bien, el efecto neto de las AOCpGs tendía hacia la hipometilación, ya que la suma de las $\Delta\beta$ entre las dosis de 100 y 1 μM de AO fue de 381.6 y -1,308.7 hacia la hiper- o hipometilación de los AOCpGs, respectivamente. Dicho comportamiento divergente entre los perfiles de metilación inducidos por AA o AO incluían 6,432 CpGs comunes entre ambos perfiles, los cuales presentaban una correlación negativa entre ambos sets de datos ($r = -0.14$, $P < 10^{-6}$).

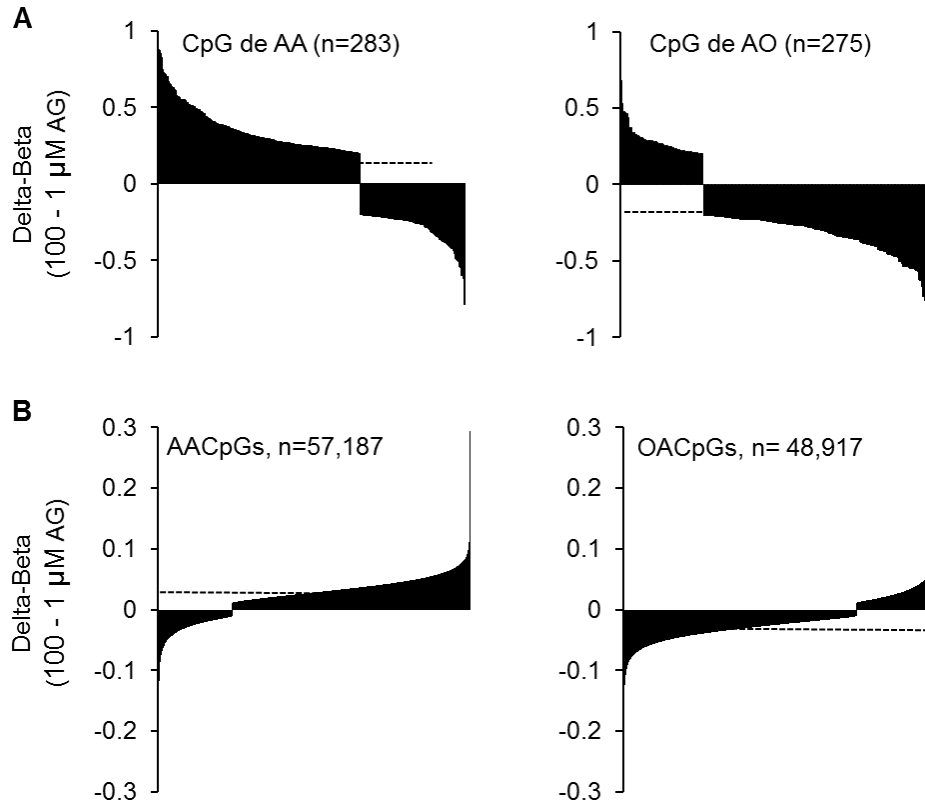


Figura 6: Distribución de la metilación de CpGs que muestran cambios dependientes de la dosis de AGs. Los datos de AA y AO se encuentran ordenados de manera decreciente. La línea punteada representa el $\Delta\beta$ promedio para cada juego de datos.

Efecto del AA y AO sobre los niveles de metilación de los elementos repetidos ALU en células THP-1

Para validar de manera independiente los efectos globales en la mADN por efecto de AA y AO, se realizó un ensayo de metilación específico para elementos ALU. Cultivos de células THP-1 fueron estimulados por 24 horas con las diferentes concentraciones de AG (AA o AO) previamente descritas. El AA induce un incremento significativo (~7.5%) dependiente de la dosis en la metilación de los elementos ALU mientras que el tratamiento con AO mostró una tendencia hacia una hipometilación del ADN, pero no significativa en un rango de 1-100 μM de los AG (**Figura 7**). Este patrón es muy similar a aquel observado en la medición de la mADN del arreglo 450k,

además de que este incremento en la mADN representa una porción significativa de la 5mC global detectada por ensayos previos del grupo (cerca del 11%).

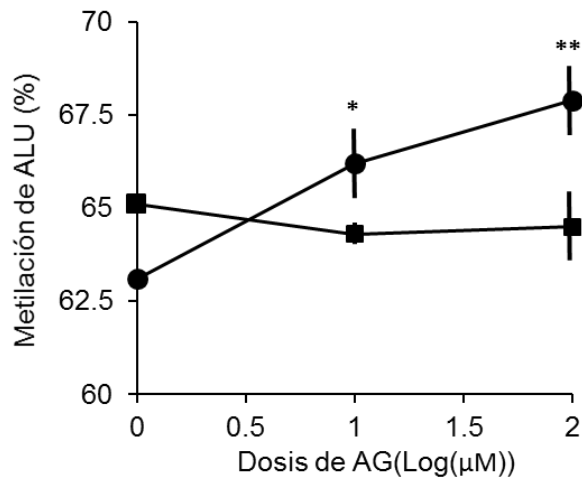


Figura 7: Efecto de AG puros en la metilación del ADN de elementos ALU en monocitos THP-1. Niveles de metilación del ADN en elementos ALU, 24 horas después de un estímulo con AA (círculos) o AO (cuadrados). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con su respectiva dosis de 1 μM. *, p<0.05; **, p<0.01 (prueba Scheffé *post hoc*)

Características de las regiones génicas que muestran cambios en la metilación dependiente de AA Y AO

En el apartado de antecedentes se discutió la importancia de la distribución génica de la mADN, puesto que ésta puede determinar la susceptibilidad de ciertas regiones a sufrir cambios en la mADN. Con este fin, se analizó la distribución génica y asociación a ICG de las AA- o AOCpGs, los cuales se dividieron en dos subgrupos cada uno, aquellas CpGs que presentaban hipermetilación y aquellas que presentaban hipometilación. Para ambos AG, los cambios de la mADN ocurren de manera preferencial en regiones intergénicas y dentro del cuerpo del gen (región que abarca desde el primer exón hasta el último exón) en comparación con los extremos UTR ($p=0.0012$ y $p=4.26 \times 10^{-6}$ por AA y AO, respectivamente) y en un contexto asociado con mar abierto ($P=0.031$; para AA). Para aquellas que mostraron una hipermetilación, se pudo observar que en respuesta a ambos AG, los cambios ocurren preferentemente en regiones intergénicas y en el cuerpo del gen (región que abarca desde el codón de inicio hasta el codón de terminación) en comparación con los extremos UTR del cuerpo del gen (**Figura 8A-B; 9A-B**). En cuanto a la hipometilación del ADN se observaron diferencias en el comportamiento en respuesta a los AG (**Figura 8C-D; 9C-D**). Solamente para AACpG, se observó una preferencia hacia la región del

cuerpo del gen ($p=2.5 \times 10^{-6}$) y las ICG ($P=0.009$), los demás CpGs no mostraron preferencia alguna sobre alguna región en particular. Ambos grupos de CpGs (hiper-, hipometilados) pertenecientes a los estímulos con los AGs presentaron una distribución de la mADN idéntica en cuanto al compartimento génico identificado, sin embargo difieren en el contexto relacionado a ICG, ya que se observa un enriquecimiento en los cambios de mADN en ICG por parte del AA. Estos resultados sugieren que los blancos de AA- y AOCpGs son distintos, con un amplio significado biológico y mecanismos específicos, más que si se tratase de efectos observados de manera aleatoria.

Una cuestión que nos preguntamos era que si el efecto de estos AG sobre la mADN mostraba preferencia por un estado de metilación inicial en aquellas secuencias afectadas. Por lo tanto, se analizó la distribución de las AA- y AOCpGs en función a su estado de metilación (valor β) mostrado sobre el perfil de metilación a la dosis de 1 μ M de cada AG. Se establecieron tres grupos para este análisis: CpGs inicialmente hipometiladas ($\beta < 0.3$); medianamente metiladas ($0.3 \leq \beta \leq 0.6$) e inicialmente hipermetiladas ($\beta > 0.6$). Para ambos AG observamos un claro enriquecimiento en el grupo de CpGs inicialmente hipermetiladas el cual fue independiente de la dirección del cambio en la mADN (**Figura 10 y 11**).

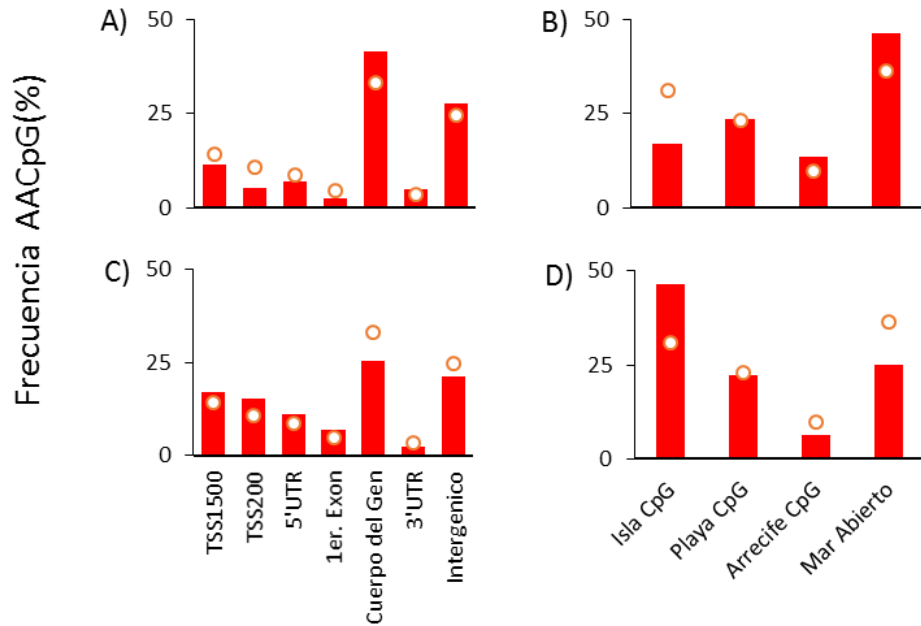


Figura 8: Distribución de CpG diferencialmente metiladas en respuesta al estímulo de AA, en función a su distribución génica y contexto CpG. Distribución de AACpG hipermetiladas en función a su (A) distribución génica o (B) relación a CpG. Distribución de AACpG hipometiladas en función a su (C) distribución génica o (D) relación a CpG. Los círculos indican la distribución esperada de acuerdo al diseño del 450k.

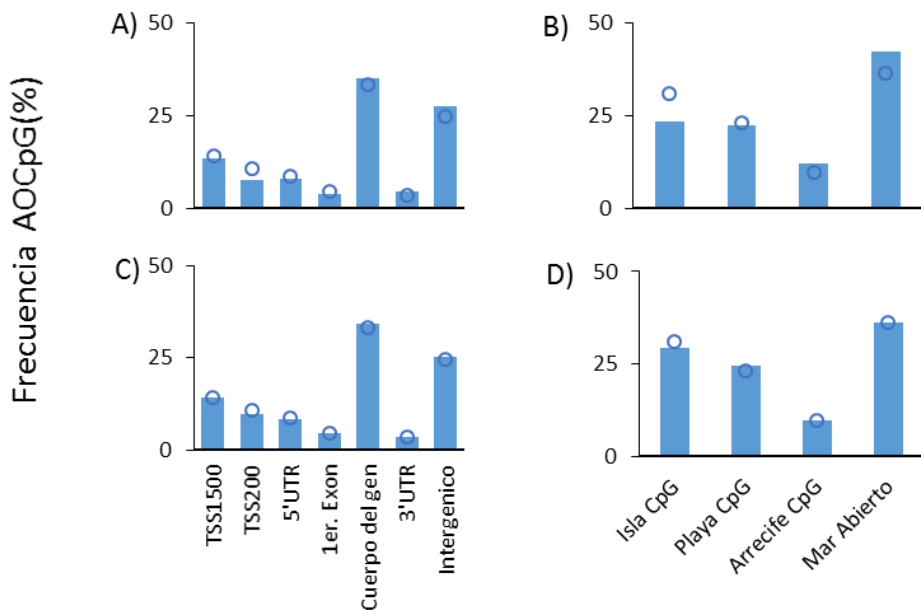


Figura 9: Distribución de CpG diferencialmente metiladas en respuesta al estímulo de OA, en función a su distribución génica y contexto CpG. Distribución de AOCpG hipermetiladas en función a su (A) distribución génica o (B) relación a CpG. Distribución de AOCpG hipometiladas en función a su (C) distribución génica o (D) relación a CpG. Los círculos indican la distribución esperada de acuerdo al diseño del 450k.

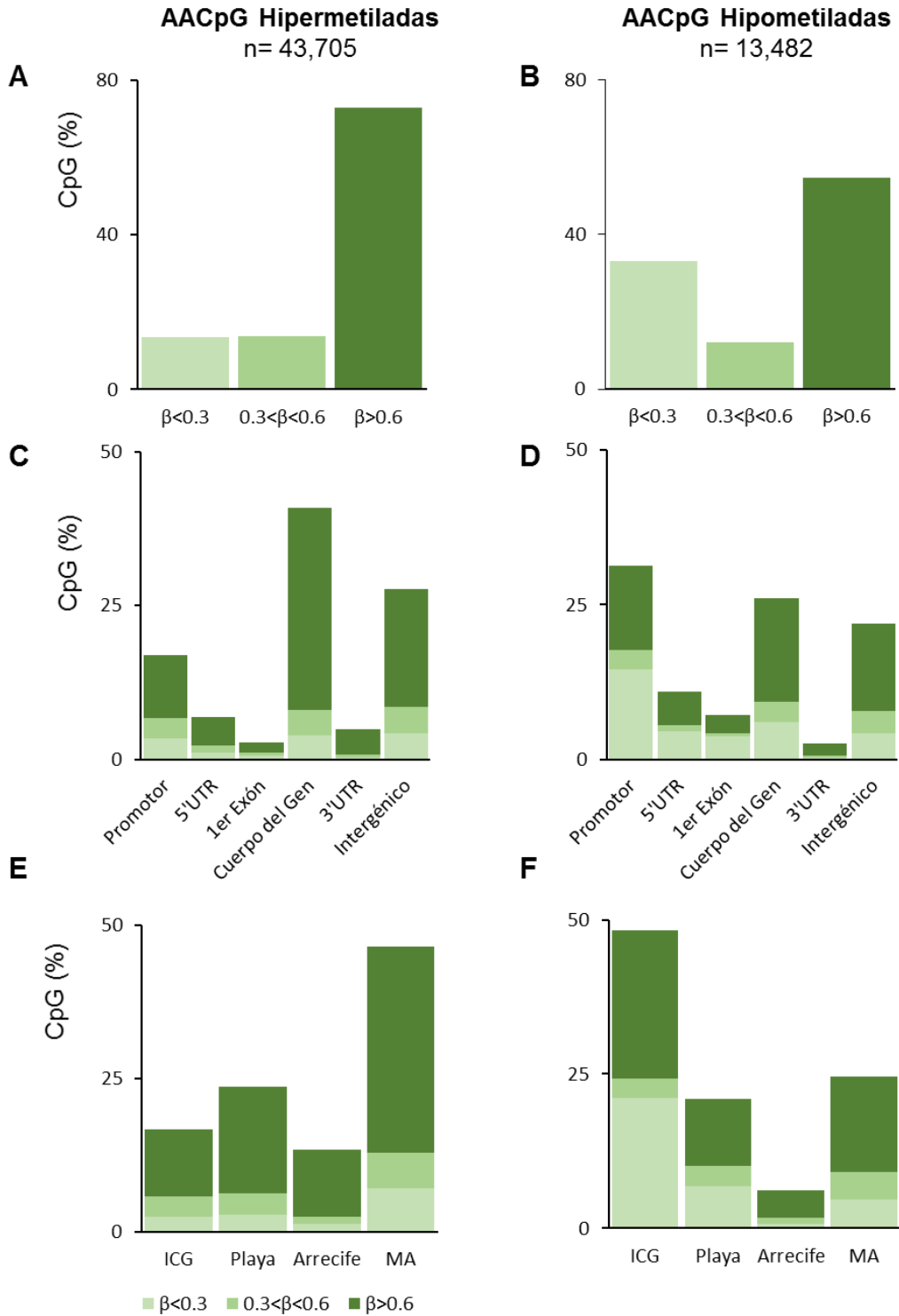


Figura 10: Blancos génicos sometidos a la metilación diferencial mediada por el AA. Los paneles izquierdo y derecho representan AACpG Hiper- e Hipometiladas, respectivamente. La figura muestra la distribución de las AACpG relativo a (A-B) el estado de metilación inicial; (C-D) contexto génico y (E-F) relación a ICG.

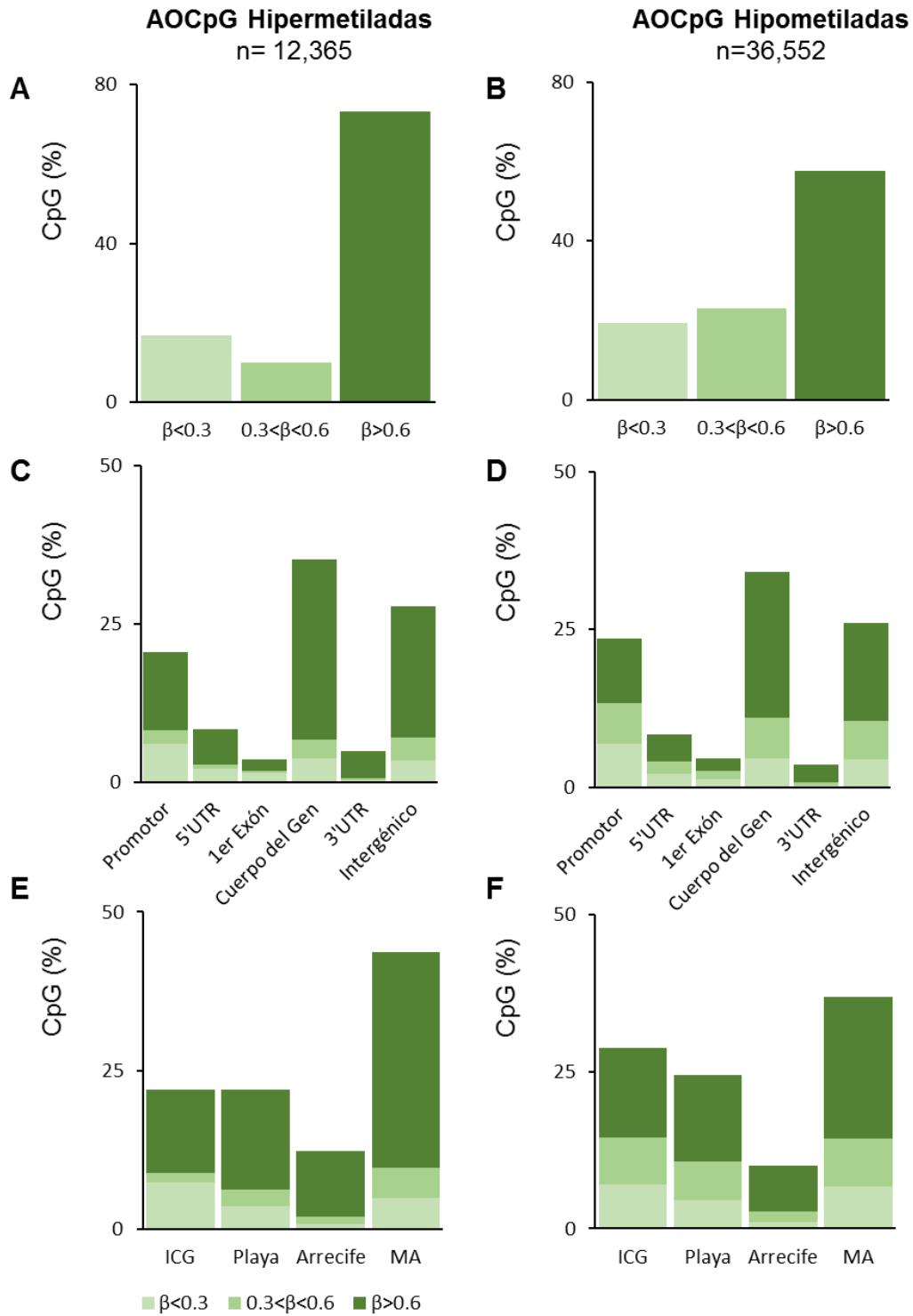


Figura 11: Blancos génicos sometidos a la metilación diferencial mediada por el AO. Los paneles izquierdo y derecho representan AOCpG Hiper- e Hipometiladas, respectivamente. La figura muestra la distribución de las AOCpG relativo a (A-B) el estado de metilación inicial; (C-D) contexto génico y (E-F) relación a ICG.

A nivel génico, la mayoría de las AACpG y AOCpG se localizaban en el cuerpo del gen y en regiones promotoras, que al mismo tiempo, presentaban una divergencia sorprendente en cuanto a la dirección del cambio en la mADN. Para aquellos genes presentes en ambas listas, las AACpG y AOCpG mostraban una hiper- o hipometilación, respectivamente, entre las dosis de 1 y 100 μM ($P < 10^{-5}$ en todos los casos). Dicha tendencia era particularmente evidente en aquellos genes que poseía más de 50 AACpG o AOCpG/gen, los cuales incluían *protein tyrosine phosphatase*, *protein tyrosine phosphatase, receptor type N2 (PTPRN2)*, *mitotic arrest deficient-like 1 (MAD1L1)*, *PR domain containing 16 (PRDM16)*, *tenascin-XB (TNXB)*, *regulatory-associated protein of mTOR (RPTOR)*, *inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase (INPP5A)*, *adenosine deaminase, RNA-specific, B2 (ADARB2)*, *sidekick cell adhesion molecule 1 (SDK1)*, *ATPase, class VI, type 11A (ATP11A)*, *tubulin folding cofactor D (TBCD)*, y *disco-interacting protein homolog 2 (DIP2C)*. Ejemplos de esta divergencia a nivel de algunos genes puede ser observado en la **Figura 12**, en la cual se tomaron algunos genes que poseían > 50AA- o AOCpGs distribuidos a lo largo del gen, además de que se puede observar el efecto inverso de aquellos CpG que se superponen entre las AACpGs y AOCpGs.

Posteriormente, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional utilizando los primeros 150 genes ordenados de manera descendiente en función al valor absoluto de la diferencia entre los valores de β correspondientes a 100 – 1 μM ($\Delta\beta$; DB-CpG) promedio por gen, el cual no mostró ningún enriquecimiento para rutas de señalización. Comúnmente se asume que cambios de gran magnitud en los niveles de metilación sugieren un papel relevante a nivel biológico, sin embargo el análisis de enriquecimiento funcional no mostró resultado alguno. De manera interesante, esta lista presentaba un sesgo muy visible, puesto que todos los miembros de la lista poseían un número de sondas/gen mayor que el promedio (~18 sondas/gen), lo que indicaba un enriquecimiento en el valor del $\Delta\beta$ para aquellos con mayor número de sondas/gen. Por este motivo, realizamos una normalización en la cual tomamos el número de AGCpGs/gen y lo dividimos entre el número de sondas/gen representados en el 450k (N-CpG), antes de ordenarlos en función al valor absoluto del $\Delta\beta$. Así pues, el mismo tipo de análisis se realizó utilizando los primeros 150 genes bajo la normalización descrita. Este análisis reveló un enriquecimiento significativo en la rutas de señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y la ruta de señalización olfatoria (REACT_14797 y hsa04740, respectivamente). De manera interesante, los valores promedios del valor absoluto del $\Delta\beta$ de los 150 N-AA- y N-AOCpGs fue aproximadamente 4

veces menor en comparación con DB-AACpGs y DB-AOCpGs (0.042 y 0.044 contra 0.174 y 0.161 en promedio, respectivamente), nuevamente señalando que los efectos observados por los estímulos de AGs son pequeños pero muestran efectos biológicos relevantes. Adicionalmente, el análisis de enriquecimiento funcional de los 20 elementos más significativos para sitios de unión para factores de transcripción (TFBS; por sus siglas en inglés) reveló varios sensores de nutrientes que funcionan como reguladores del metabolismo energético, como lo son *Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF4)*, *PPAR γ* y *PPAR α* ; estos resultados validan en gran medida los datos bioquímicos obtenidos por el grupo de investigación (Silva-Martinez *et al.*, 2016), los cuales implican la participación de *PPAR α* y *Sirt1*.

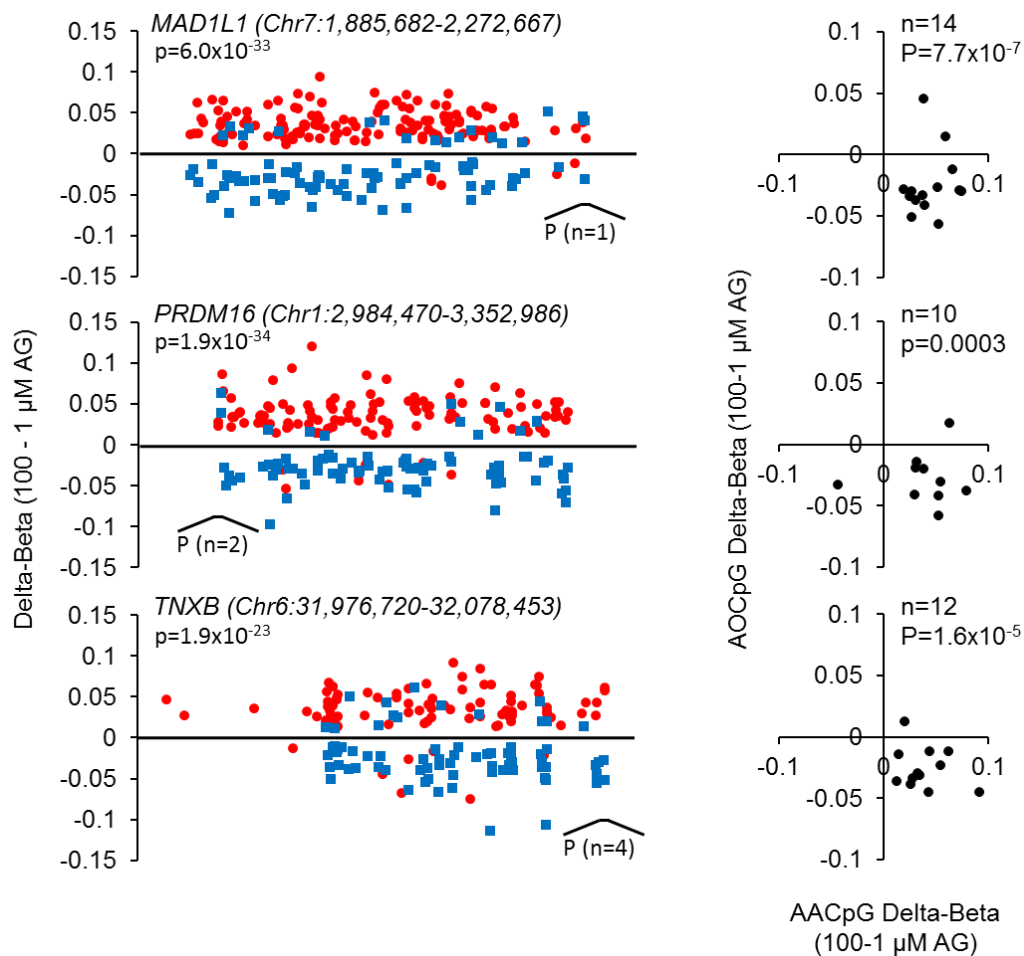


Figura 12: Ejemplos de algunos perfiles de metilación ejercidos por el AA o AO. Las gráficas en la izquierda muestran los cambios en la metilación del ADN de los AACpGs (rojo) y AOCpGs (azul). El valor P indica la posición y el número de CpGs que se localizan dentro de la región promotora. Las gráficas a la derecha muestran los valores de delta beta de aquellas CpGs comunes entre AA y AO, correspondiente al gen mostrado a la izquierda. Los valores de p se refieren a las pruebas no paramétricas individuales (izquierda) y pareada (derecha; Prueba Mann-Whitney U y la prueba Wilcoxon, respectivamente).

Expresión diferencial inducida a por ácidos grasos y su relación con la metilación

Hasta este punto es claro el efecto de los AGs (AA y AO) sobre la metilación diferencial del ADN en células THP-1, sin embargo se desconoce el impacto transcripcional de estos estímulo, con este fin, se utilizó la plataforma *Human Exon 1.0 ST* de Affymetrix. Dicha plataforma permite interrogar cambios transcripcionales a nivel de exones (o exones potenciales), lo cual nos permite realizar dos análisis complementarios al mismo tiempo –expresión génica y *splicing* alternativo. Cabe resaltar que el material genético utilizado sobre esta plataforma es proveniente de las mismas células de las cuales se extrajo el ADN para el análisis del microarreglo 450k.

Los datos a nivel exónico arrojados por el microarreglo no revelaron indicios de alteración en los patrones del *splicing* de los genes, ya que no se alcanzaron los niveles de significancia para inferir este tipo de eventos. En cuanto al nivel de genes, se detectaron cambios en la transcripción de genes (*fold change*, $FC > 1.5$) entre las dosis extremas de los AGs (100 y 1 μM). En el caso del AA, se identificaron 1,172 genes regulados diferencialmente, de los cuales 648 estaban regulados de manera positiva, con un FC promedio de 1.84 (1.5-11.72); mientras que aquellos regulados de manera negativa (524 genes) poseían un FC promedio de -1.78 (-1.5- -6,82). Para los transcritos regulados por AO, se detectaron 455 genes regulados de manera positiva con un FC promedio de 1.86 (1.5-6.61) y 380 genes regulados negativamente con un FC promedio de -1.84 (-1.5- - 10.27; **Tabla Suplementaria II**).

De manera interesante, solo unos pocos transcritos se encontraban regulados de manera dosis dependiente, siendo solo 14 y 7 los que mostraron cambios en la expresión bajo los estímulos de AA o AO, respectivamente. El 86% (12/14) de los transcritos expresados de manera diferencial dependientes de la dosis del AA caen dentro de la categoría de ARN no codificante (ARNnc), mientras que solo 2 transcritos codifican para proteína. De manera interesante, para aquellos expresados de manera diferencial por efecto del AO, el 100% de los transcritos caen dentro de la categoría de ARNnc. Los ARNnc representaron el 90% (19/21) de los transcritos regulados diferencialmente. Los dos transcritos que codifican para proteínas fueron *PDE4B* y *PRDMI* (Blimp-1). Este último, presentó un incremento de 12 veces en la expresión, en respuesta a las diferentes dosis a AA. Este gen es considerado como un regulador maestro de la diferenciación de células plasmáticas (Martins *et al.*, 2006). Aún más interesante es la asociación de Blimp-1 con

varios modificadores epigenéticos, ya que al unirse al ADN, sirve como *scaffold* para proteínas pertenecientes a la familia histonas deacetil transferasas (Su *et al.*, 2009). El hecho de que la mayoría de los transcritos sean ARNnc da pie a pensar que existen mecanismos de regulación mediados por ARNnc en respuesta a los estímulos de los ácidos grasos y de manera específica para cada uno de ellos.

Un análisis de enriquecimiento funcional para aquellos genes regulados diferencialmente entre las dosis de AG, se encontró un enriquecimiento en las rutas de señalización por GPCR ($FDR < 10^{-4}$ en ambos casos), reflejando el mismo enriquecimiento funcional observado en los perfiles de mADN inducido por los mismo AG, después de normalizar por el número de sondas/gen. Cabe resaltar, que a pesar de que el enriquecimiento funcional se encuentra sobre la misma ruta de señalización, los genes blancos son diferentes. Estos resultados son interesantes, puesto que presentan el mismo enriquecimiento funcional que aquellos obtenidos con el perfil de mADN, pero de manera interesante, estos no tienen relación alguna en cuanto a los genes que se encuentran enriqueciendo en ambos estudios.

De los datos obtenidos de la plataforma 450k para los AGs, cerca del 24% de los datos obtenidos se encuentran dentro de regiones exónicas, incluyendo las regiones 5' - y 3'UTR (15, 515 y 11,898, AA- y AOCpGs, respectivamente). Al observar este enriquecimiento en la región exónica, decidimos evaluar el impacto de la mADN sobre la transcripción mediante un acoplamiento de los datos con los de expresión a nivel de exones. Buscando una manera fácil y visual de interpretar los datos, se graficaron los valores del $\Delta\beta$ correspondientes a los AA- o AOCpG contra sus valores correspondientes de expresión por exón y se separaron por compartimento génico (**Figura 13 y 14**). Así pues, mientras la mADN cambia en cualquier contexto genómico, mostrando asociaciones tanto negativas como positivas con la transcripción, descubrimos correlaciones dependientes del contexto, p. ej., una correlación negativa en la región 5'UTR y primer exón ($n=4,731$, $r=-0.246$; $p < 0.0001$ y $n = 8,235$, $r=-0.296$, $p < 0.0001$; respectivamente) y una correlación positiva con el cuerpo del gen y la región 3'UTR ($n=20,997$, $r=0.139$, $p < 0.0001$ y $n=8,064$, $r=0.272$, $p < 0.0001$, respectivamente; **Tabla IV**). Además, hemos observado que la mADN dentro del cuerpo del gen se encuentra asociada más frecuentemente con una alza en la tasa transcripcional, ya que el promedio de la $\Delta\beta$ de AACpGs exónicas eran más alto en comparación a las AOCpG exónicas (0.023 y -0.021, respectivamente), esta tendencia se observó para todas las AA- y AOCpGs; debido

a estos resultados obtenidos mediante el acoplamiento de los datos de mADN y expresión, hemos concluido que la metilación dentro del cuerpo del gen correlaciona de manera positiva con los niveles expresión. Además, decidimos validar dicha asociación mediante ensayos de RT-PCR sobre algunos genes, los cuales mostraron efectos opuestos y dependientes de la dosis de AGs en la mADN después de la estimulación con AA o AO (en base a lo observado en la información del 450k). Se extrajo ARN de células THP-1 estimuladas con las concentraciones extremas de los AGs (1 y 100 μM) y se sintetizó ADNc. El resultado se puede observar en la **Figura 15**, donde se observa una asociación positiva entre la mADN y la expresión génica. Fue corroborada la asociación positiva entre mADN y la expresión génica.

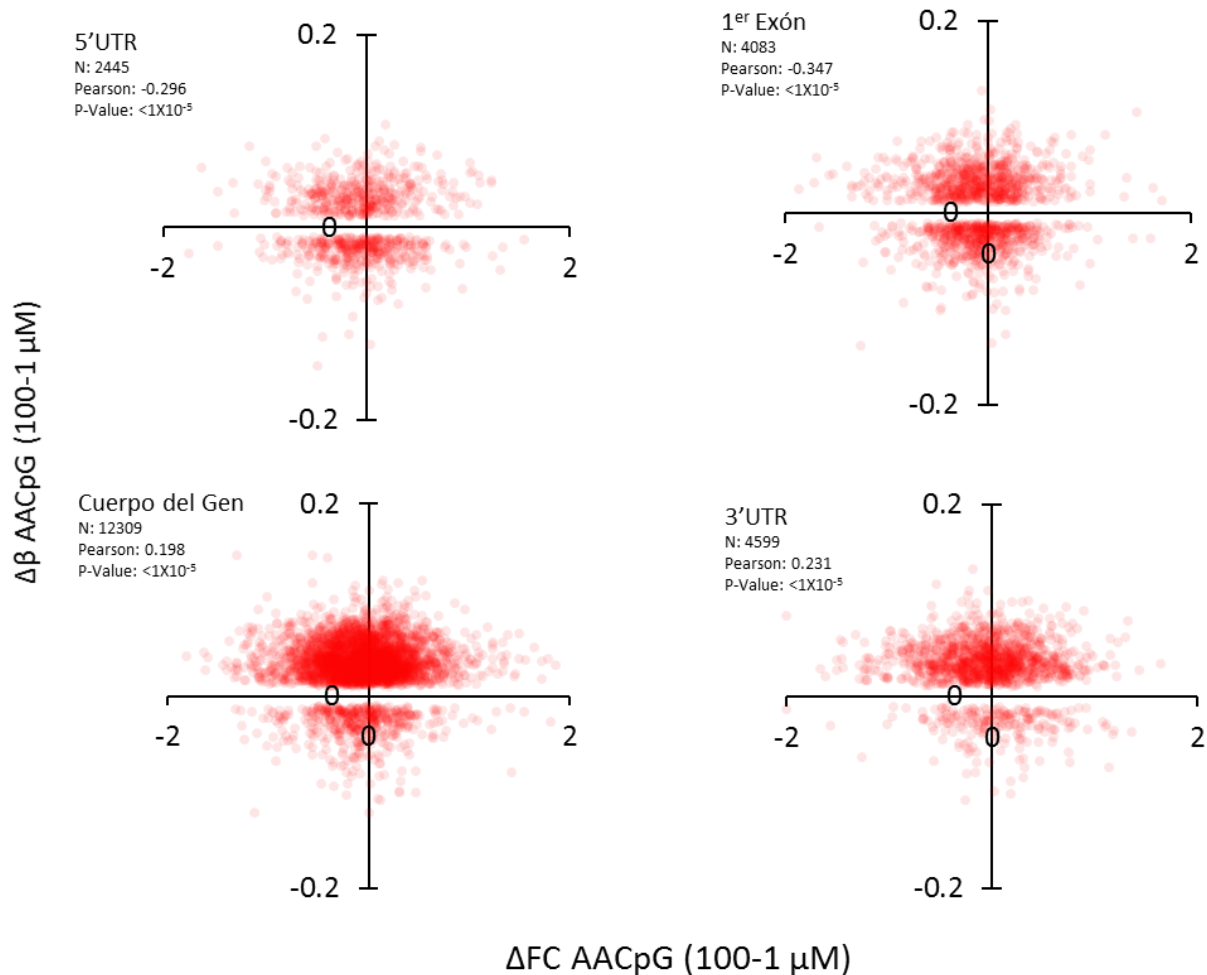


Figura 13: Asociación entre los cambios de mADN y los niveles de expresión inducidos por el AA. Sobre el eje X se toman los valores correspondientes a la tasa de cambio en los niveles de expresión correspondiente a aquella AACpG cuyo $\Delta\beta$ se grafica sobre el eje Y. Los valores Pearson, corresponden al coeficiente Pearson, al cual le corresponde un valor de P (P -value) el cual es significativo si $P < 0.05$.

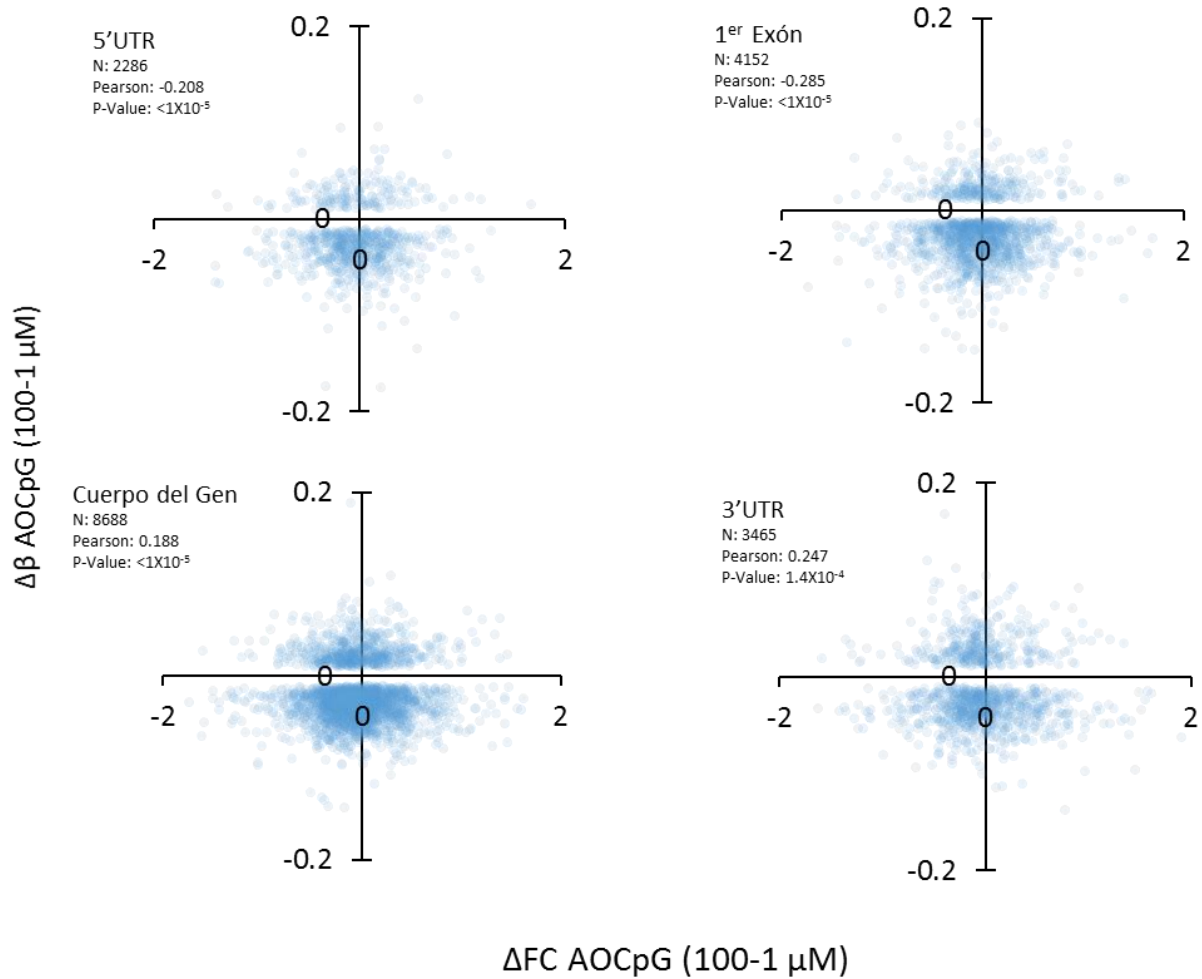


Figura 14: Asociación entre los cambios de mADN y los niveles de expresión inducidos por el AO. Sobre el eje X se toman los valores correspondientes a la tasa de cambio en los niveles de expresión correspondiente a aquella AOCpG cuyo $\Delta\beta$ se grafica sobre el eje Y. Los valores Pearson, corresponden al coeficiente Pearson, al cual le corresponde un valor de P (P -value) el cual es significativo si $P < 0.05$.

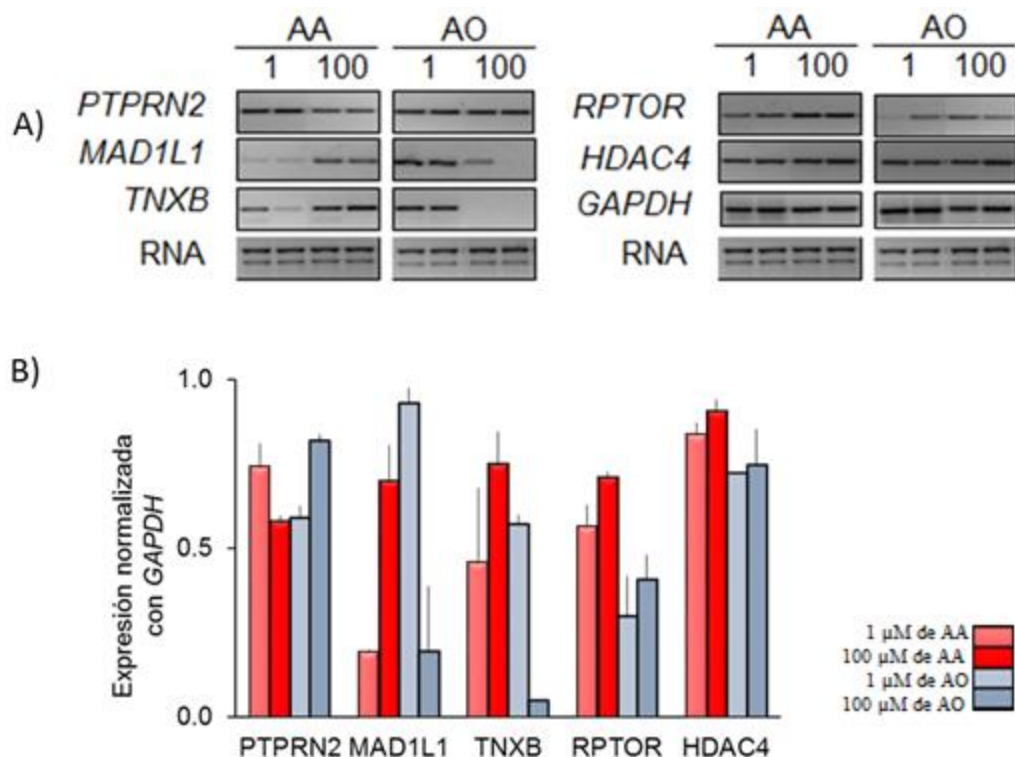


Figura 15: Metilación del ADN dentro del cuerpo del gen correlaciona de manera positiva con los niveles de expresión de algunos genes elegidos. En el panel A) se muestran las fotografías de los RT-PCRs para los genes seleccionados, partiendo del cDNA sintetizado a partir de la muestra de RNA de células THP-1 estimuladas por 24 horas con AG (AA o AO) a las concentraciones de 1 y 100 μM. B) Gráfica de los niveles de expresión de los genes selectos normalizados con la expresión de GAPDH. Las líneas sobre las barras denotan el error correspondiente a cada grupo de mediciones (replica biológica y técnica)

Tabla IV: Relación entre metilación del ADN y la transcripción.

Posición	AACpGs			AOCpGs		
	Pearson	<i>P</i>	n	Pearson	<i>P</i>	n
5'UTR	-0.29	<10 ⁻⁵	2,445	-0.21	<10 ⁻⁵	2,286
1 ^{er} Exón	-0.35	<10 ⁻⁵	4,083	-0.28	<10 ⁻⁵	4,152
Cuerpo del Gen	0.20	<10 ⁻⁵	12,309	0.19	<10 ⁻⁵	8,688
3'UTR	0.23	<10 ⁻⁵	4,599	0.25	1.4x10 ⁻⁴	3,465

Evaluación de la relevancia biológica de los efectos del AA o AO en la mADN mediante epigenómica comparativa

Para determinar la relevancia biológica general de nuestros datos de 450k, se decidió comparar las AA- y AOCpGs con los resultados obtenidos bajo la misma plataforma en células primarias de isletas pancreáticas humanas (*ex vivo*) estimuladas con ácido palmítico (AP), un modelo celular de diabetes (Hall *et al.*, 2014). En primera instancia, esta comparativa surgió ya que los autores reportaron hipermetilación global inducida por el AP, muy similar a lo observado en los monocitos THP-1 estimulados con el AA. Por lo tanto, se buscaron CpGs diferencialmente metiladas compartidas entre los tres metilomas de células estimuladas con AA, OA y AP. Se encontró una coincidencia del 10-12% entre las CpG, siendo un total de 445 CpGs –correspondientes a 430 genes- que fueron comunes entre AA-, AO- y APCpGs (referidas como AGCpGs; **Tabla Suplementaria III**). Es notable que estas coincidencias existen a pesar de las diferencias en el diseño experimental, el modelo celular (isletas pancreáticas y monocitos THP-1, respectivamente), las concentraciones de los ácidos grasos (1 mM y 1-100 μ M) y el tiempo de incubación con el AG (48 y 24 horas). De manera interesante, el análisis funcional de los primeros 150 genes N-APCpGs, revelaron un enriquecimiento significativo sobre la ruta de señalización olfatoria y GPCR.

Las similitudes detectadas entre los perfiles de mADN inducidos por AG en células THP-1y el modelo pancreático estimulado con AP, dieron pauta a una pregunta: ¿Es posible que los perfiles de mADN obtenidos por el estímulo de AG tuvieran alguna relación con perfiles de mADN en tejidos patológicos o normales? Para abordar esta cuestión, comparamos los AA- y AOCpGs con perfiles de mADN de humanos obtenidos bajo la misma plataforma y que fueran de acceso público, los cuales se describen en el apartado de *Métodos*. Cerca del 12 al 17% de las CpGs identificadas en cada estudio eran idénticas a las AA- o AOCpGs. Además, dejando a un lado las diferencias entre los criterios establecidos como corte en el $\Delta\beta$, observamos que no existía una correlación significativa entre el porcentaje de similitud y los valores de corte en el $\Delta\beta$. Posteriormente, se comparó el estado de metilación de las AA- y AOCpGs con aquellas que fueran idénticas en los perfiles de metilación que representaban una enfermedad o un tejido sano. Con este fin, se realizó un estudio de *clustering* (**Figura 16**) a nivel de genes, promediando los niveles de metilación de cada CpG ($\Delta\beta$). Dicho estudio mostró claramente que los perfiles de metilación inducidos por el estímulo de AA y AP eran más similares entre ellos que aquel inducido por AO. Además, dichos

perfiles se encuentran dentro del mismo grupo en el que se ubican las enfermedades metabólicas, envejecimiento y autismo; por otro lado, los perfiles de cáncer, esquizofrenia y los perfiles de metilación de tejidos sanos se agrupaban lejos de los perfiles generados por el estímulo de los AGs. Por ejemplo, la mayoría de los genes eran consistentemente hipermetilados después de ser estimulados con AA o AP, mientras que al ser estimulados con AO estos se encontraban hipometilados.

También hemos observado una similitud muy baja con los perfiles de cáncer en comparación con los perfiles asociados a enfermedades metabólicas, psiquiátricas y tejidos normales ($P < 0$; Prueba de Scheffé *post-hoc* de 0.01 en todas las comparaciones; el set correspondiente al perfil de envejecimiento no fue incluido en este análisis debido a que representaba un solo estudio). De este modo, no se encontró correlación significativa entre el porcentaje de similitud y el número de CpG identificados en cada estudio ($r = -0.12$, $n = 20$, $P = 0.62$), nuestros datos sugieren que la similitud con los otros perfiles no es aleatorio a pesar del elevado número de AA- y AOCpGs.

Bajo la observación de que las AACpGs se agrupaban con los perfiles provenientes de enfermedades metabólicas, nos preguntamos si existía similitud con un juego de datos generados dentro de nuestro grupo de trabajo pertenecientes a una variedad de severidades histológicas de lesiones ateroscleróticas en aortas humanas (Valencia-Morales *et al.*, 2015). Dicho estudio identificó 1,985 CpGs autosomales, los cuales cambiaban significativamente su estado de metilación conforme aumentaba la progresión de la lesión (Progresión-CpGs), donde la mayoría cambiaban hacia hipermetilación conforme aumentaba el grado de severidad de la lesión. Dichas CpGs mostraron un enriquecimiento significativo dentro de las AACpGs, donde 510 CpGs eran idénticas en los dos juegos de datos y 324 mostraron la misma tendencia en la mADN ($P = 0.011$ para el enriquecimiento determinado por una prueba hipergeométrica; **Tabla Suplementaria IV**). La mayoría de ellas (311 de 324) sufren hipermetilación en respuesta al incremento en la dosis de AA y con la progresión de la lesión.

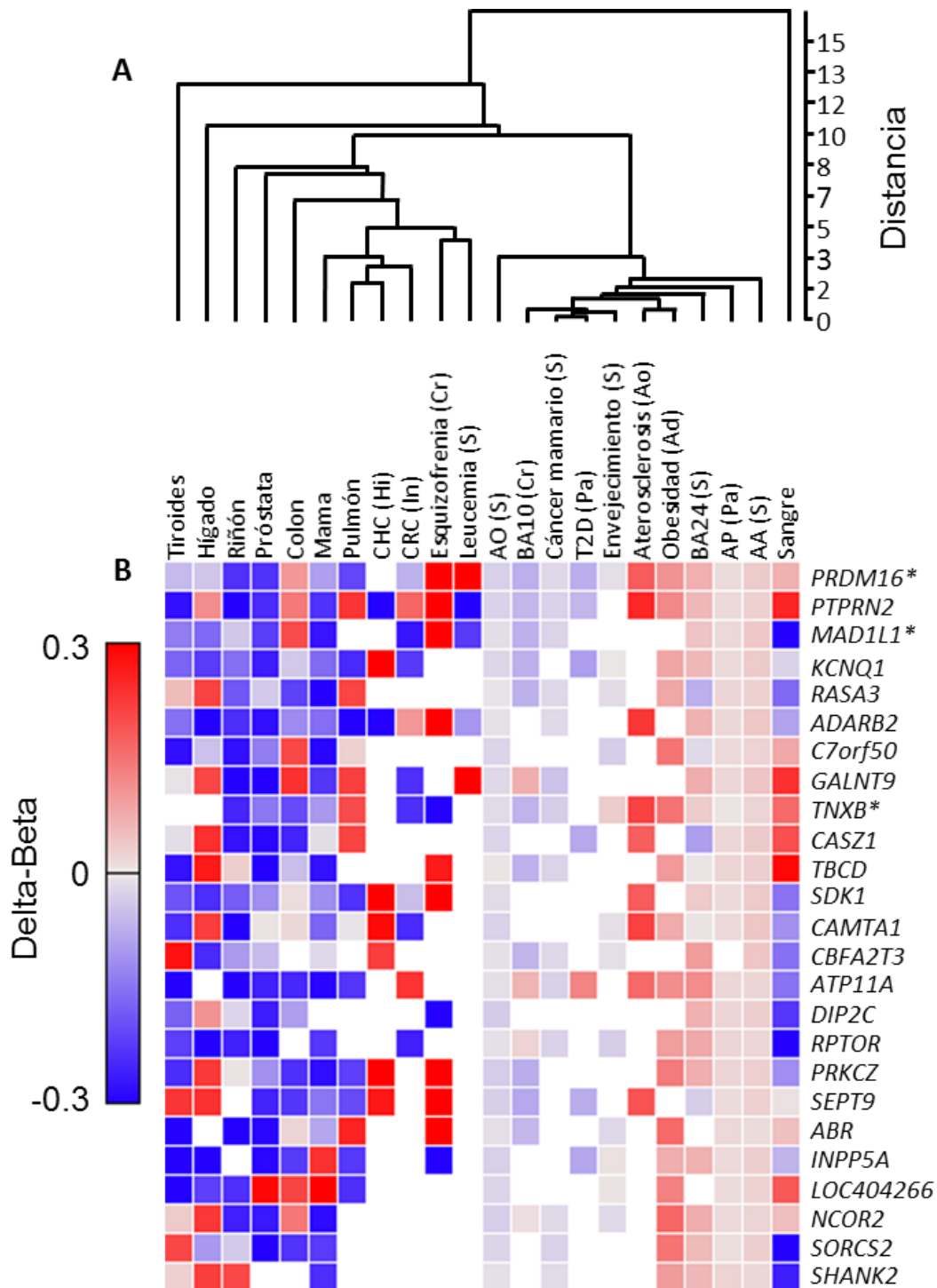


Figura 16: Análisis de “Clustering” de aquellas CpGs que son comunes entre las AACpGs o AOCpGs o ambas, y a aquellos CpGs de tejido enfermo o sano. A) Dendrograma correspondiente a la asociación de los perfiles de metilación. B) Top 25 de los genes ordenados por el número total de CpGs incluidos en el análisis de cluster. Los asteriscos indican aquellos genes que se tomaron como representación en la Figura 16. El tejido de origen: Ad: Adipocitos; Ao, Aorta; Cr, Cerebro; Hi, Hígado; In, Intestino; Pa, Páncreas; S, Sangre.

Este resultado –similar al observado en los perfiles de AGs- nos hizo cuestionarnos el diseño en la distribución de sondas por gen en el arreglo 450k, ya que da pauta a pensar que existe un sesgo en la detección de sondas diferencialmente metiladas, puesto que ciertos genes presentan una mayor densidad de sondas por gen arriba de la media (~18 sondas/gen). En función a esto, nos dimos a la tarea de analizar la distribución de los genes diferencialmente metilados (DM) –p.ej. genes que contienen al menos una CpG metilada diferencialmente- en cuatro grupos formados en función al número de sondas por gen (SG) en el arreglo 450k: $SG \leq 10$; $10 < SG \leq 50$; $50 < SG \leq 100$; y $SG > 100$ (**Tabla Suplementaria V**). Encontramos que la frecuencia de genes DM –porcentaje de genes dentro de los grupos- seguían una relación lineal entre los grupos en la mayoría de los perfiles analizados (**Figura 17**). Para descartar un enriquecimiento aleatorio de los genes DM en cada grupo, seleccionamos 15 genes por cada grupo e identificamos la frecuencia de CpG-DM por gen en todos los perfiles estudiados. Así pues, encontramos un enriquecimiento mayor de CpG-DM en aquellos genes con $SG > 100$ en comparación de aquellos genes pertenecientes al grupo de $SG < 10$ (**Figura 18**).

Conociendo que el número de SG favorecía la detección de genes DM, nos preguntamos si el porcentaje de CG dentro de los genes era la base de esta distribución de número de SG. Entonces, una correlación fuerte indicaría que aquellos genes con un alto número de sitios susceptibles a cambios en la mADN son más frecuentemente detectados como DM y por lo tanto que la distribución de los genes DM refleja algunas características biológicas. Como aproximación para determinar el número de CpG por gen, utilizamos el contenido CG y la longitud del gen (**Figura 19**). La correlación con el número de SG en ambos casos no fue significativa, indicando un sesgo el 450k que se origina por criterios de diseño del arreglo y no por características biológicas.

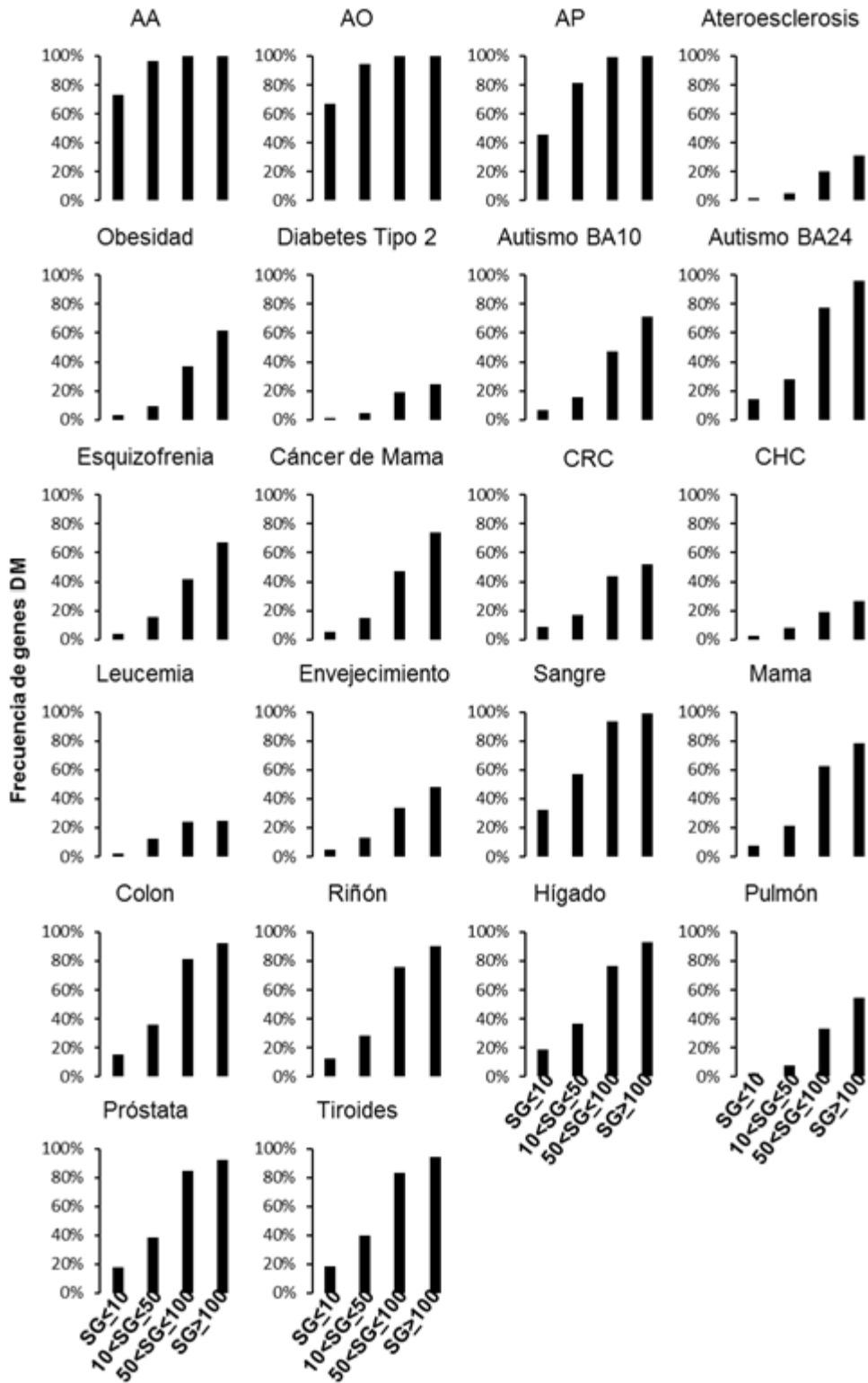


Figura 17: Frecuencia de genes DM en los arreglos analizados. BA, área Brodmann; CRC, Cáncer Colorrectal; CHC, Cáncer Hepatocelular

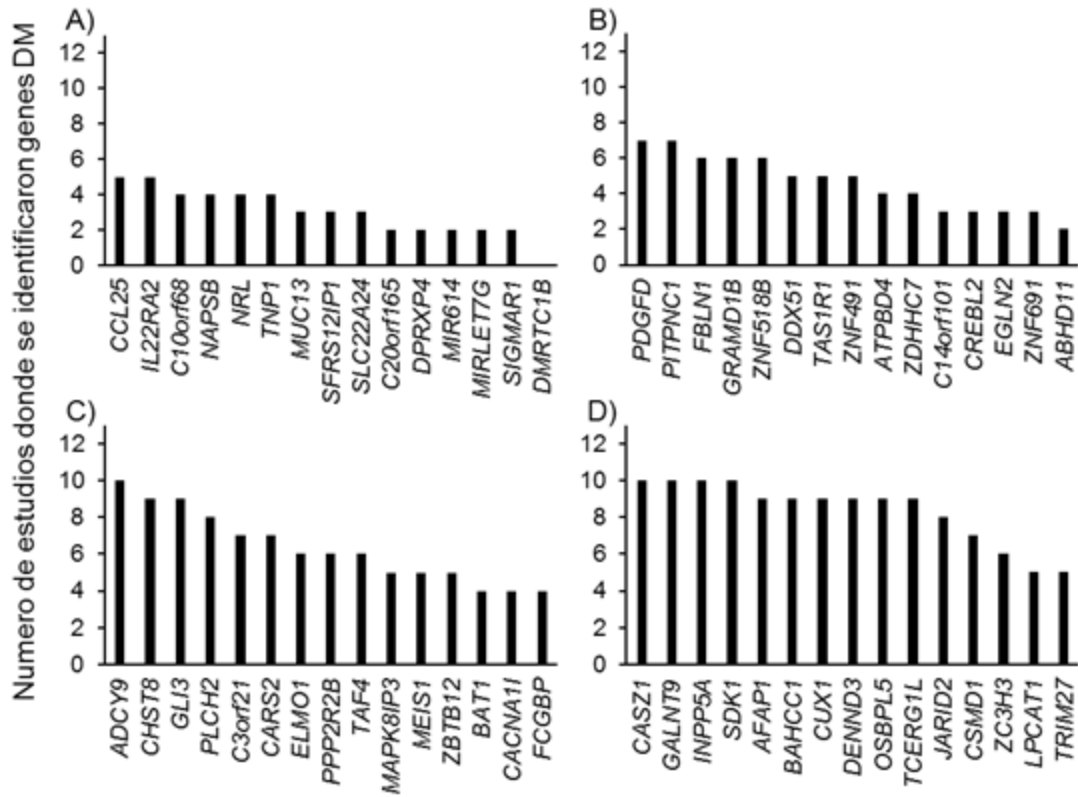


Figura 18: Genes seleccionados al azar, pertenecientes a los diferentes grupos clasificados por SG y su identificación en los diferentes estudios analizados basados en el 450k. A), B), C), y D): $SG \leq 10$; $10 < SG \leq 50$, $50 < SG \leq 100$, $SG > 100$, respectivamente. Los genes fueron ordenados de mayor a menor de acuerdo a la frecuencia presentada en los diferentes estudios.

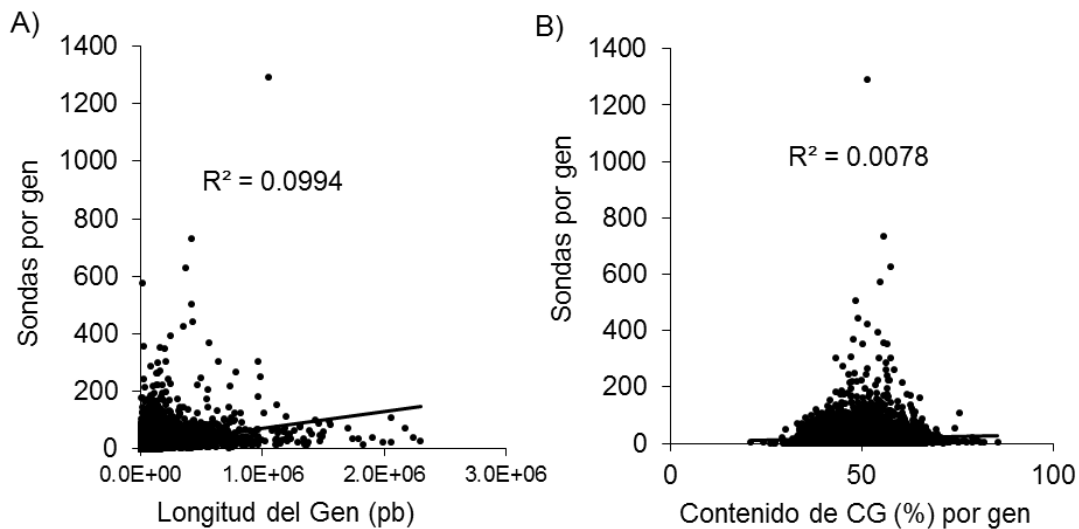


Figura 19: Correlación entre la densidad de sondas dentro del 450K y sus características génicas.

Con el fin de corregir este sesgo, se realizó la normalización de los datos como se hizo con aquellos obtenidos para los AG (NCpGs) y nuevamente tomamos los primeros 15 genes de cada lista, donde el enriquecimiento más alto lo tuvo el gen *CARD16*, el cual solo apareció en 5 perfiles de los 22 analizados. Cabe resaltar que cerca del 34% de los genes (94/278) de los primeros 15 genes identificados por el método de normalización, caían dentro de la categoría de ARN no-codificantes, a pesar de que esta categoría se encuentra muy poco representada en el 450k - 0.85% (4,168/485,764) de las sondas.

Posteriormente, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional en rutas de señalización tomando los primeros 150 genes de las listas de NCpG de cada perfil. De manera interesante, se encontró un enriquecimiento en las rutas de señalización mediada por proteínas G y olfatoria en los perfiles correspondientes a cáncer (colorrectal, leucemia y hepático) y diabetes tipo 2, mismas rutas enriquecidas en los perfiles obtenidos por AG, confirmando la relevancia biológica de estos en el establecimiento del epigenoma relacionado a enfermedad. En las muestras restantes, se observaron enriquecimientos particulares o nulos en rutas de señalización (**Tabla III**).

Tabla V: Principales rutas metabólicas/señalización enriquecidas dentro del programa DAVID

Estímulo/enfermedad o tejido	Término	Conteo de Genes	p-value	FDR
Araquidónico	Transducción Olfatoria	15	3.6E-09	3.2E-06
	Señalización mediada por GPCR	17	5.5E-06	3.9E-03
Oleico	Señalización mediada por GPCR	11	5.6E-05	3.6E-02
	Transducción Olfatoria	8	1.4E-03	1.1E+00
	Transducción de Sabor	4	1.8E-03	1.5E+00
Palmítico	Transducción Olfatoria	28	1.5E-18	1.4E-15
	Señalización mediada por GPCR	26	3.4E-12	2.4E-09
Aterosclerosis	Función Endocítica de NDK, Fosfinas y Dinamina	3	2.2E-03	2.0E+00

Estímulo/enfermedad o tejido	Término	Conteo de Genes	p-value	FDR
Autismo BA10	Hemostasis	9	3.3E-04	2.1E-01
	Señalización del Sistema Inmune	9	1.2E-03	7.9E-01
	Ruta de señalización de Quimiocinas	7	2.7E-03	2.7E+00
	Interacción de receptores Citoquina-Citoquina	8	3.3E-03	3.3E+00
Autismo BA24	Transducción Olfatoria	18	3.4E-11	2.8E-08
Cáncer de mama	Transducción Olfatoria	11	3.6E-05	3.3E-02
	Señalización mediada por GPCR	14	2.7E-04	2.0E-01
Cáncer Colorrectal	Señalización mediada por GPCR	16	1.0E-06	6.6E-04
	Transducción Olfatoria	12	1.1E-04	1.1E-01
Cáncer Hepático	Transducción Olfatoria	14	1.2E-06	1.2E-03
	Señalización mediada por GPCR	14	2.7E-04	1.6E-01
	Ruta PI3 quinasa	5	9.6E-04	6.9E-01
	Ruta de Señalización beta-TGF	5	2.8E-03	2.0E+00
	Mantenimiento de Telomeros	4	8.4E-03	5.0E+00
Leucemia	Interacción Neuroactiva ligando-receptor	12	3.1E-07	2.8E-04
	Ruta de señalización de Cadherinas	7	9.0E-04	6.8E-01
	Señalización mediada por GPCR	12	4.3E-03	2.8E+00
	Esclerosis Amiotrofica Lateral	4	4.7E-03	4.1E+00
Sangre	Señalización del Sistema Inmune	7	4.7E-03	2.8E+00
Mama	Oxidaciones Biológicas	5	6.9E-03	5.6E+00

Estímulo/enfermedad o tejido	Término	Conteo de Genes	p-value	FDR
	Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	9	2.3E-04	1.5E-01
Hígado	Hemostasis	9	4.4E-03	2.9E+00
	Metabolismo de Drogas	5	3.0E-03	3.0E+00
	Ruta de señalización de PPAR	5	4.5E-03	4.4E+00
Pulmones	Biosíntesis de Pantotenato y CoA\	3	4.1E-03	4.1E+00
	Interacción de receptores Citoquina-Citoquina	7	6.0E-03	6.1E+00
Próstata	Metabolismo de Drogas	4	4.1E-03	3.8E+00

Discusión

Uno de los hallazgos medulares de este trabajo es que hemos descubierto patrones de mADN distintos y opuestos inducidos por el AA y AO, dos AGs insaturados a los cuales generalmente se atribuyen propiedades opuestas, es decir pro- y antiinflamatorias, respectivamente. Cabe resaltar la manera consistente en la que se han obtenido estos resultados a lo largo del tiempo (2004-2015) y en diferentes laboratorios (México y España). Nuestros datos globales de mADN en elementos ALU y en sitios CpG específicos muestran efectos divergentes y dependientes de la dosis de estos dos AGs en cultivos celulares de monocitos humanos THP-1. El análisis comparativo de nuestros resultados contra perfiles de mADN de humano (de acceso público), confirman la relevancia biológica de los efectos de estos AG, sin importar los diferentes criterios de inclusión para los CpG identificados en cada estudio realizado. Además, los ácidos grasos pro-inflamatorios (AA y AP) inducen un perfil de mADN remarcablemente similar, en comparación con el perfil inducido por el AO. Adicionalmente, los perfiles de expresión y mADN mostraron un enriquecimiento con funciones de señalización mediadas por las GPCR, lo cual sugiere un efecto antagónico en rutas celulares comunes. Esas similitudes son respaldadas fuertemente cuando se comparan los perfiles de metilación inducidos con AGs contra aquellos obtenidos de tejido enfermo o sano. Por ejemplo, los perfiles de AA y AP se agrupan con los perfiles correspondientes a enfermedades metabólicas (ateroesclerosis, obesidad, diabetes tipo 2), envejecimiento y autismo; mientras que el perfil de AO se agrupa débilmente con los elementos que conforman este grupo. Este análisis comparativo refleja las distintas propiedades patológicas conocidas asociadas al AA, AP y AO. Muchos de los genes identificados son relevantes desde un punto de vista nutricional y evolutivo. Por ejemplo, en mandriles, la suplementación con AA y DHA por un periodo de 12 semanas mostró una asociación con la desregulación de *PTPRN2* en la corteza cerebral (Kothapalli *et al.*, 2007); además, se ha observado que la hipometilación de este gen ha sido asociada con la diabetes tipo 2 y con una baja en la tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de ovario (Bauerschlag *et al.*, 2011; Olsson *et al.*, 2014); por otro lado, la hipermetilación de CpGs agrupadas a lo largo del gen se encuentra asociada con la artritis reumatoide (de la Rica *et al.*, 2013). De igual manera, se ha observado hipermetilación en el gen *PRDM16* en casos de leucemia, donde estudios en ratón sugieren este estado de metilación es un indicador temprano de leucemia mieloide aguda (Figueroa *et al.*, 2009; Sonnet *et al.*, 2014). Estas asociaciones mostradas a manera de ejemplo, por ser convergentes e independientes, no son resultado de la casualidad. Así pues, los genes identificados

y descritos no son los más relevantes, pero si son un claro ejemplo del efecto de los AG sobre la mADN.

Otra contribución importante del trabajo fue proponer un método de normalización de los datos de 450k, el cual nos permite corregir el sesgo hacia un enriquecimiento y/o detección de genes que se encuentren sobrerrepresentados. La normalización de los datos permitió identificar genes con una significancia biológica potencial, al revelarse el enriquecimiento funcional de los genes NCpGs en rutas de señalización mediadas por GPCR. Por ejemplo, el gen *SAMSNI*, identificado en el perfil de mADN inducida por AA, está caracterizado como un gen supresor de tumor en mieloma múltiple –un mal hematológico caracterizado por el crecimiento de clonas de células malignas de plasma en medula ósea-, donde el estado de metilación de la región promotora juega un papel importante en la regulación de la expresión de este (Noll *et al.*, 2014). Otro ejemplo, pero ahora en perfil de mADN de AO, es el gen que *PTX3* que codifica para la proteína Pentraxin 3, el cual es un componente esencial en el sistema inmune innato, controlando mecanismos de inflamación (Wang *et al.*, 2016).

Notablemente, los efectos observados de estos AG sobre la modificación de los perfiles de mADN son cuantitativamente modestos. Perfiles similares fueron observados en varios estudios basados en modelos de alteraciones metabólicas tal como una dieta alta en grasa y ejercicio (Jacobsen *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2014; Lindholm *et al.*, 2014). Esto sugiere un patrón común en la regulación epigenética del metabolismo y marcadamente diferente del cáncer, en el cual frecuentemente se observa un gran número de *loci* con metilación diferencial de más de 50%. Sin embargo, gracias a los datos proporcionados por este estudio, se pueden generar varias hipótesis que nos puedan ayudar a comprender mejor la regulación del epigenoma mediada por AG y, posiblemente en un corto plazo de tiempo, desarrollar estrategias basadas en la modificación de la dieta para mejorar la salud humana.

La comparación realizada en este trabajo trae a colación un gran número de hallazgos sobre la importancia de la fisiopatología de la respuesta epigenética en respuesta a un estímulo de AG puros. En el caso de la arteriosclerosis humana, hemos mostrado la relación existente con dos trabajos previamente publicados dentro de nuestro grupo de trabajo. Primero, aquellos CpG cuya metilación está asociada con el grado histológico de la lesión los cuales se encuentran enriquecidos

dentro de las AACpGs (Valencia-Morales *et al.*, 2015). Segundo, 16 de los genes más representativos dentro de los perfiles de mADN analizados, se encuentran hipermetilados en etapas tempranas en la aorta arterioesclerótica y muestran un cambio en el estado de metilación idénticos a aquellos mostrados por AA y AP (Zaina *et al.*, 2014). Además, tanto en los perfiles obtenidos de la lesión arterioesclerótica como en las células estimuladas con AA, la respuesta de hipermetilación es prominente a lo largo de la región correspondiente al cuerpo del gen de los antes mencionados. Así pues, el análisis comparativo sugiere que aquella porción de ADN hipermetilada que caracteriza a arterosclerosis en sus etapas tempranas y hasta la etapa estable de la lesión vascular (Zaina *et al.*, 2014; Valencia-Morales *et al.*, 2015), pueden ser resultado del efecto de los AG pro-inflamatorios o sus metabolitos en circulación. Por lo tanto, estas observaciones pueden servir como base para generar programas nutricionales que puedan contrarrestar estos efectos mediante el uso de agentes hipometilantes del ADN, para así disminuir la progresión de la lesión o salvaguardar el epigenoma vascular.

Por otro lado, el envejecimiento y la obesidad son unos de los factores principales que favorecen varias enfermedades metabólicas, como la aterosclerosis o la diabetes. Sin embargo, el perfil de mADN correspondiente al envejecimiento se encuentra más relacionado con el perfil de la diabetes que con el de aterosclerosis. Este último resultado, indica que la hipometilación global no explica el riesgo de ECV atribuible al envejecimiento. Otro factor involucrado en el desarrollo de la aterosclerosis es la obesidad, cuyo perfil se encuentra estrechamente relacionado con este último, de acuerdo a nuestro estudio. Esta condición se caracteriza por cambios en la mADN hacia la hipermetilación, siendo el mismo comportamiento observado en el perfil correspondiente a la progresión de la aterosclerosis. Estos datos sugieren que perfiles de mADN inducidos por el AA en el tejido vascular y en los adipocitos explican la relación epidemiológica entre aterosclerosis y obesidad.

Otro descubrimiento dentro de nuestro análisis comparativo fue la divergencia que se presenta entre los perfiles de mADN de la diabetes tipo 2 y aquellos obtenidos de la estimulación con AA, y sorpresivamente, con AP. Por lo tanto, nuestros datos revelan un conjunto de CpGs diferencialmente metilados que no explican la participación de los AG libres pro-inflamatorios en la diabetes. En cuanto al estudio relacionado al autismo, existe un par de estudios que relacionan esa condición con el AA, donde en uno se documenta el riesgo de autismo por la deficiencia de

AA debida al uso de fórmulas lácteas en infantes y recientemente un estudio comparativo en el contenido de AA en glóbulos rojos de pacientes con autismo contra individuos control (Schultz *et al.*, 2006; Brigandi *et al.*, 2015). Adicionalmente, hemos mostrado que los perfiles de mADN inducidos por la estimulación de AGs son relativamente distantes de aquellos tejido-específico, y que estos se encuentran más relacionados con perfiles de mADN de enfermedades. De otro lado, la participación de los AGs en la generación de perfiles tejido-específicos sería difícil de conciliar con la presencia ubicua de los AGs en la circulación. Más bien, nuestros datos indican que los tejidos enfermos se distinguen de los normales por su sensibilidad a AGs específicos. También, nuestros descubrimientos confirman y expanden las observaciones previas de que el perfil de mADN de la sangre es completamente distinto al de cualquier otro tejido, ya sea sano o enfermo (Lowe *et al.*, 2015). Este dato es importante desde el punto de vista metodológico, puesto que la mayoría de los estudios epigenómicos de asociación entre mADN y enfermedades generalmente utilizan muestras de sangre como un sustituto del tejido directamente involucrado en la enfermedad. Esto representa un reto para desarrollo de futuros estudios asociativos. Adicionalmente a todas estas consideraciones, cabe destacar que la especificidad de las coincidencias con varios estudios realizados con la plataforma 450k, sirven como un método de validación independiente de nuestros resultados. A la fecha, muy pocos estudios comparativos de perfiles de mADN obtenidos bajo la plataforma 450k se han llevado a cabo, ya que solo existe registro de 14 estudios –incluyendo el nuestro– en la base de datos del NCBI (dato revisado en Septiembre, 2016 utilizando los términos *450k, DNA methylation, comparative analysis*).

Trabajo incluido en nuestro artículo (Silva-Martinez *et al.*, 2016) ha mostrado que la hipermetilación mediada por el estímulo de AA es sensible a la inhibición de la importación de AGs (cadena larga) a la mitocondria y que se encuentra río abajo de los reguladores del metabolismo de AGs y β -oxidación, PPAR- α y SIRT1 (Purushotham *et al.*, 2009). La regulación específica de PPAR- α sobre la mADN mediada por el AA, refleja la observación de que PUFAS ejercen un mayor efecto sobre la activación de PPAR- α , pero no sobre PPAR- γ . La participación de PPAR- α queda aún más clara debido a los resultados obtenidos por el análisis de enriquecimiento funcional de los AGCpGs. Conjuntamente, esto puede ser el reflejo del metabolismo activo del AA, mediante la regulación de la actividad de la cPLA₂, la cual medía la liberación del AA para que funcione como un mensajero secundario en la activación de respuesta a inflamación celular, entre otras respuestas celulares (Brash, 2001). Bajo este mismo análisis, se

mostró un fuerte enriquecimiento en vías de señalización GPCR y olfatoria, tanto para los datos obtenidos mediante el análisis diferencial de mADN como de expresión. Si bien, en ambos estudios se muestra un enriquecimiento en estas rutas, a nivel de genes estos son diferentes entre metilación y expresión, al igual que específicos para cada AG (AA o AO). En parte, el resultado de este análisis de enriquecimiento era esperado, ya que el potencial biológico de los AGs para activar y/o unirse a receptores relacionados a GPCR está ampliamente documentado (Talukdar *et al.* 2011; Rajaraman *et al.* 2015; Moran *et al.* 2016). Existen GPCR que son activadas por AGs Ω -3, que median el control de la respuesta celular inflamatoria, la cual puede estar ligado directamente con la molécula de AA o sus metabolitos (Talukdar, Olefsky y Osborn, 2011). La asociación de estas rutas, enfermedades metabólicas y cáncer está ampliamente documentado (Pashkov *et al.*, 2011; Talukdar, Olefsky y Osborn, 2011; Fridlyand y Philipson, 2016; Moran, Flatt y McKillop, 2016). En la actualidad, cerca del 70% de los fármacos desarrollados para combatir estas enfermedades van dirigidos hacia estos receptores de GPCR. Estudios en neuronas muestran que algunos receptores involucrados en la señalización olfatoria son activados por el AO, respondiendo a diferentes concentraciones de manera dependiente de la dosis, además de que la respuesta decrece en función de la edad (Oberland *et al.*, 2015). La observación de que los blancos de mADN y expresión génica sean diferentes, pero que pertenezcan a una misma familia de proteínas, da pauta a cuestionar la posible existencia de algunos mecanismos sinérgicos e independientes –ya sea para el estímulo de AA o AO- para generar cierta respuesta celular. Además, posiblemente esta señalización se encuentre río arriba en la respuesta a los AG, ya que miembros de la familia de señalización de GPCR activos modulan de manera directa la disponibilidad de PGC1 α , el cual regula a PPARs (Wang *et al.*, 2015), los cuales fueron identificados en este trabajo como miembros importantes en la respuesta del AA.

En conjunto, nuestros datos publicados (Silva-Martínez *et al.* 2016) son potencialmente aplicables para el diseño de terapias preventivas a través de una modificación en la dieta, ya que los componentes de la dieta estudiados aquí (AA y AO) participan en la remodelación del epigenoma similar al reportado con enfermedades metabólicas, esto mediante β -oxidación, PPAR α y SIRT1.

Conclusiones

- Ácidos grasos (AGs) que están presentes en la dieta de humanos (AA y AO) inducen cambios opuestos y dependientes de la dosis en los perfiles de metilación del ADN (mADN) de células THP-1.
- El AA genera una respuesta de hipermetilación dependiente de la dosis mientras que el AO ocasiona una hipometilación del ADN.
- Los cambios en la mADN ocasionados por el estímulo de los AGs se localizan dentro de secuencias intragénicas e intergénicas, ambos en un contexto “Mar abierto” (de acuerdo a la topografía en función a la presencia de ICG).
- Parte sustancial de los cambios se detectaron en los elementos ALU, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo del genoma humano representando cerca del 12% de la densidad genómica total. Estos elementos muestran una tendencia similar a los datos obtenidos en el microarreglo 450k.
- Resultados obtenidos mediante el acoplamiento de los datos de los microarreglos de mADN y expresión génica, se confirmó una tendencia positiva entre la mADN en el cuerpo del gen y la expresión génica. Dicha asociación se observó también al realizar los análisis semicuantitativos de la expresión por RT-PCR.
- Se propuso un método de normalización de los datos del microarreglo 450k, el cual nos permite corregir el sesgo hacia un enriquecimiento y/o detección de genes que se encuentren sobrerrepresentados. La normalización de los datos permitió identificar genes con una significancia biológica potencial.
- El análisis comparativo de nuestros resultados contra perfiles de mADN de humano confirman la relevancia biológica de los efectos de estos AG. Además, se reveló la existencia de una relación entre los perfiles relacionados con enfermedades metabólicas y psicológicas; no siendo así para los perfiles de tejido derivado de pacientes con cáncer o tejido sano.
- El análisis de enriquecimiento funcional de genes metilados diferencialmente en los diferentes perfiles, reveló un enriquecimiento significativo en la ruta de señalización olfatoria y aquella mediada por GPCR.

- Nuestros descubrimientos confirman y expanden las observaciones previas de que el perfil de mADN de la sangre es completamente distinto al de cualquier otro tejido, ya fuese sano o enfermo.
- La observación de que los blancos de mADN y expresión génica sean diferentes, pero que pertenezcan a una misma familia de proteínas, da pauta a pensar de que existen posibles mecanismos sinérgicos e independientes –ya sea para el estímulo de AA o AO- para generar cierta respuesta celular.
- Los perfiles de expresión y mADN –inducidos por AA o AO- mostraron un enriquecimiento con funciones de señalización mediadas por las GPCR, lo cual sugiere un efecto antagónico en rutas celulares comunes.

Perspectivas

- Analizar el papel de los diferentes tipos de ARNs dentro de la respuesta de metilación diferencial en respuesta al estímulo del AA o AO.
- Identificar el nivel de regulación en el cual se encuentra la ruta de señalización mediada por GPCR en respuesta al estímulo de los AGs.
- El gen PRDM1 se encuentra clasificado como un regulador maestro transcripcional, por lo que sería interesante evaluar el papel de este mediante el uso de siRNA en células THP-1 estimuladas con diferentes concentraciones de AA o AO

Bibliografía

Adkins, Y. y Kelley, D. S. (2010) 'Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids.', *The Journal of nutritional biochemistry*, 21(9), pp. 781–92. doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.12.004.

Amaral, C. L., Crisma, A. R., Masi, L. N., Martins, A. R., Hirabara, S. M. y Curi, R. (2014) 'DNA methylation changes induced by a high-fat diet and fish oil supplementation in the skeletal muscle of mice', *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 7, pp. 314–326. doi: 10.1159/000381777.

Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J. A. y Reddy, S. T. (2003) 'Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), pp. 1751–1756. Available at: ISI:000181073000057.

Bauerschlag, D. O., Ammerpohl, O., Bräutigam, K., Schem, C., Lin, Q., Weigel, M. T., Hilpert, F., Arnold, N., Maass, N., Meinhold-Heerlein, I. y Wagner, W. (2011) 'Progression-free survival in ovarian cancer is reflected in epigenetic DNA methylation profiles.', *Oncology*, 80(1–2), pp. 12–20. doi: 10.1159/000327746.

Benton, M. C., Johnstone, A., Eccles, D., Harmon, B., Hayes, M. T., Lea, R. A., Griffiths, L., Hoffman, E. P., Stubbs, R. S. y Macartney-Coxson, D. (2015) 'An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss.', *Genome biology*, 16, p. 8. doi: 10.1186/s13059-014-0569-x.

Berger, J. y Moller, D. E. (2002) 'The mechanisms of action of PPARs.', *Annual review of medicine*, 53, pp. 409–35. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104018.

Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R. y Shilatifard, A. (2009) 'An operational definition of epigenetics', *Genes and Development*, 23(7), pp. 781–783. doi: 10.1101/gad.1787609.

Birmingham, E. N., Bassett, S. A., Young, W., Roy, N. C., McNabb, W. C., Cooney, J. M., Brewster, D. T., Laing, W. A. y Barnett, M. P. G. (2013) 'Post-weaning selenium and folate supplementation affects gene and protein expression and global DNA methylation in mice fed high-fat diets.', *BMC medical genomics*, 6(1), p. 7. doi: 10.1186/1755-8794-6-7.

Bhutani, N., Burns, D. M. y Blau, H. M. (2011) 'DNA demethylation dynamics', *Cell*. Elsevier

Inc., 146(6), pp. 866–872. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.042.

Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J. y Macleod, D. (1985) ‘A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA’, *Cell*, 40(1), pp. 91–99. doi: 10.1016/0092-8674(85)90312-5.

Blackledge, N. P. y Klose, R. J. (2011) ‘CpG island chromatin: A platform for gene regulation’, *Epigenetics*, 6(2), pp. 147–152. doi: 10.4161/epi.6.2.13640.

Blattler, A. y Farnham, P. J. (2013) ‘Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states’, *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), pp. 34287–34294. doi: 10.1074/jbc.R113.512517.

Bloom, D. E., Cafiero, E., Jané-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Reddy Bloom, L., Fathima, S., B. Feigl, A., Gaziano, T., Hamandi, A., Mowafi, M., O’Farrell, D., Ozaltin, E., Pandya, A., Prettner, K., Rosenberg, L., Seligman, B., Stein, A. Z., Weinstein, C. y Weiss, J. (2011) ‘The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases’, *World Economic Forum*, (September), pp. 1–46. Available at: <http://ideas.repec.org/p/gdm/wpaper/8712.html>.

Bogdanović, O. y Veenstra, G. J. C. (2009) ‘DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: Developmental requirements and function’, *Chromosoma*, 118(5), pp. 549–565. doi: 10.1007/s00412-009-0221-9.

Bonita, R., Beaglehole, R. y Kjellstrom, T. (2006) ‘Basic Epidemiology: 2nd Edition’. doi: 16,28.

Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S. y Jacobsen, S. E. (2007) ‘UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells.’, *Science (New York, N.Y.)*, 317(5845), pp. 1760–4. doi: 10.1126/science.1147939.

Brash, A. R. (2001) ‘Arachidonic acid as a bioactive molecule’, *Journal of Clinical Investigation*, 107(11), pp. 1339–1345. doi: 10.1172/JCI13210.

Brigandi, S. A., Shao, H., Qian, S. Y., Shen, Y., Wu, B. L. y Kang, J. X. (2015) ‘Autistic children exhibit decreased levels of essential fatty acids in red blood cells’, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), pp. 10061–10076. doi: 10.3390/ijms160510061.

Calder, P. C. (2009) ‘Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an

- old tale’, *Biochimie*. Elsevier Masson SAS, 91(6), pp. 791–795. doi: 10.1016/j.biochi.2009.01.008.
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J. R., Wiest, M. M., Watkins, S. M. y Hotamisligil, G. S. (2008) ‘Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism’, *Cell*, 134(6), pp. 933–944. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.048.
- Castillo-Díaz, S. A., Garay-Sevilla, M. E., Hernández-González, M. A., Solís-Martínez, M. O. y Zaina, S. (2010) ‘Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries’, *International Journal of Molecular Medicine*, 26(5), pp. 691–700. doi: 10.3892/ijmm-00000515.
- Ceccarelli, V., Racanicchi, S., Martelli, M. P., Nocentini, G., Fettucciari, K., Riccardi, C., Marconi, P., Nardo, P. Di, Grignani, F., Binaglia, L. y Vecchini, A. (2011) ‘Eicosapentaenoic acid demethylates a single cpg that mediates expression of tumor suppressor CCAAT/enhancer-binding protein in U937 leukemia cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), pp. 27092–27102. doi: 10.1074/jbc.M111.253609.
- Choi, J. K., Bae, J.-B., Lyu, J., Kim, T.-Y. y Kim, Y.-J. (2009) ‘Nucleosome deposition and DNA methylation at coding region boundaries.’, *Genome biology*, 10(9), p. R89. doi: 10.1186/gb-2009-10-9-r89.
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C. y Farese, R. V. (2013) ‘Cellular fatty acid metabolism and cancer’, *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 18(2), pp. 153–161. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.017.
- Danaei, G., Ding, E. L., Mozaffarian, D., Taylor, B., Rehm, J., Murray, C. J. L. y Ezzati, M. (2009) ‘The preventable causes of death in the United States: Comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors’, *PLoS Medicine*, 6(4). doi: 10.1371/journal.pmed.1000058.
- Dayeh, T., Volkov, P., Salö, S., Hall, E., Nilsson, E., Olsson, A. H., Kirkpatrick, C. L., Wollheim, C. B., Eliasson, L., Rönn, T., Bacos, K. y Ling, C. (2014) ‘Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Human Pancreatic Islets from Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Donors Identifies Candidate Genes That Influence Insulin Secretion’, *PLoS Genetics*, 10(3). doi: 10.1371/journal.pgen.1004160.
- Deaton, A. M. y Bird, A. (2011) ‘CpG islands and the regulation of transcription’, *Genes and*

Development, 25(10), pp. 1010–1022. doi: 10.1101/gad.2037511.

Delaney, C., Garg, S. K., Fernandes, C., Hoeltzel, M., Allen, R. H., Stabler, S. y Yung, R. (2013) ‘Maternal Diet Supplemented with Methyl-Donors Protects against Atherosclerosis in F1 ApoE^{-/-} Mice’, *PLoS ONE*, 8(2), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0056253.

Doi, A., Park, I.-H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M. J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., Miller, J., Schlaeger, T., Daley, G. Q. y Feinberg, A. P. (2009) ‘Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts.’, *Nature genetics*. Nature Publishing Group, 41(12), pp. 1350–3. doi: 10.1038/ng.471.

Dolinoy, D. C., Weidman, J. R., Waterland, R. A. y Jirtle, R. L. (2006) ‘Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome’, *Environmental Health Perspectives*, 114(4), pp. 567–572. doi: 10.1289/ehp.8700.

Du, P., Zhang, X., Huang, C.-C., Jafari, N., Kibbe, W. A., Hou, L. y Lin, S. M. (2010) ‘Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis.’, *BMC bioinformatics*, 11(1), p. 587. doi: 10.1186/1471-2105-11-587.

Duplus, E. y Forest, C. (2002) ‘Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription?’, *Biochemical Pharmacology*, 64(5–6), pp. 893–901. doi: 10.1016/S0006-2952(02)01157-7.

Edgar, R., Domrachev, M. y Lash, A. E. (2002) ‘Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository.’, *Nucleic acids research*, 30(1), pp. 207–10. doi: 10.1093/nar/30.1.207.

Ehrlich, M. (2002) ‘DNA methylation in cancer: too much, but also too little.’, *Oncogene*, 21(35), pp. 5400–13. doi: 10.1038/sj.onc.1205651.

Feinberg, A. P. y Tycko, B. (2004) ‘The history of cancer epigenetics.’, *Nature reviews. Cancer*, 4(2), pp. 143–153. doi: 10.1038/nrc1279.

Figuroa, M. E., Skrabanek, L., Li, Y., Jiemjit, A., Fandy, T. E., Paietta, E., Fernandez, H., Tallman, M. S., Grealley, J. M., Carraway, H., Licht, J. D., Gore, S. D. y Melnick, A. (2009) ‘MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation.’, *Blood*,

114(16), pp. 3448–3458. doi: 10.1182/blood-2009-01-200519.

Finstad, H. S., Kolset, S. O., Holme, J. A., Wiger, R., Farrants, A. K., Blomhoff, R. y Drevon, C. A. (1994) ‘Effect of n-3 and n-6 fatty acids on proliferation and differentiation of promyelocytic leukemic HL-60 cells’, *Blood*, 84(11), pp. 3799–3809.

Flores-Sierra, J., Arredondo-Guerrero, M., Cervantes-Paz, B., Rodríguez-Ríos, D., Alvarado-Caudillo, Y., Nielsen, F. C., Wrobel, K., Wrobel, K., Zaina, S. y Lund, G. (2016) ‘The trans fatty acid elaidate affects the global DNA methylation profile of cultured cells and in vivo.’, *Lipids in health and disease*. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), p. 75. doi: 10.1186/s12944-016-0243-2.

Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. y Evans, R. M. (1995) ‘15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ ’, *Cell*, 83(5), pp. 803–812. doi: 10.1016/0092-8674(95)90193-0.

Fridlyand, L. E. y Philipson, L. H. (2016) ‘Pancreatic Beta Cell G-Protein Coupled Receptors and Second Messenger Interactions: A Systems Biology Computational Analysis.’, *PloS one*, 11(5), p. e0152869. doi: 10.1371/journal.pone.0152869.

Gao, D., Griffiths, H. R. y Bailey, C. J. (2009) ‘Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6 myotubes.’, *The British journal of nutrition*, 102(11), pp. 1557–1563. doi: 10.1017/S0007114509990948.

Gelfman, S., Cohen, N., Yearim, A. y Ast, G. (2013) ‘DNA-methylation effect on cotranscriptional splicing is dependent on GC architecture of the exon – intron structure’, pp. 789–799. doi: 10.1101/gr.143503.112.23.

Ginno, P. A., Lott, P. L., Christensen, H. C., Korf, I. y Chédin, F. (2012) ‘R-Loop Formation Is a Distinctive Characteristic of Unmethylated Human CpG Island Promoters’, *Molecular Cell*, 45(6), pp. 814–825. doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.017.

Goll, M. G. y Bestor, T. H. (2005) ‘Eukaryotic Cytosine Methyltransferases’, *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), pp. 481–514. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721.

Grygiel-Górniak, B. (2014) ‘Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review.’, *Nutrition journal*, 13, p. 17. doi: 10.1186/1475-2891-13-17.

Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P. y Jacobsson, A. (2010) 'The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice', *Progress in Lipid Research*. Elsevier Ltd, 49(2), pp. 186–199. doi: 10.1016/j.plipres.2009.12.002.

Hackett, J. A. y Surani, M. A. (2013) 'DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 368(1609), p. 20110328. doi: 10.1098/rstb.2011.0328.

Hall, E., Volkov, P., Dayeh, T., Bacos, K., Rönn, T., Nitert, M. D. y Ling, C. (2014) 'Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets.', *BMC medicine*, 12(1), p. 103. doi: 10.1186/1741-7015-12-103.

Heyman-Lindén, L., Seki, Y., Storm, P., Jones, H. A., Charron, M. J., Berger, K. y Holm, C. (2015) 'Berry intake changes hepatic gene expression and DNA methylation patterns associated with high-fat diet.', *The Journal of nutritional biochemistry*. The Authors, 27, pp. 79–95. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.022.

Heyn, H., Carmona Javier, F., Gomez, A., Ferreira, H. J., Bell, J. T., Sayols, S., Ward, K., Stefansson, O. A., Moran, S., Sandoval, J., Eyfjord, J. E., Spector, T. D. y Esteller, M. (2013) 'DNA methylation profiling in breast cancer discordant identical twins identifies DOK7 as novel epigenetic biomarker', *Carcinogenesis*, 34(1), pp. 102–108. doi: 10.1093/carcin/bgs321.

Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A. y Diez, J. (2012) 'Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), pp. 10522–10527. doi: 10.1073/pnas.1120658109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1120658109.

Higashiyama, A., Kubota, Y., Marumo, M., Konishi, M., Yamashita, Y., Nishimura, K., Fukuda, Y., Okamura, T. y Wakabayashi, I. (2015) 'Association between serum long-chain n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid profiles and glomerular filtration rate assessed by serum creatinine and cystatin C levels in Japanese community-dwellers.', *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association*, 25(4), pp. 303–311. doi: 10.2188/jea.JE20140093.

Hodges, E., Smith, A. D., Kendall, J., Xuan, Z., Ravi, K., Rooks, M., Zhang, M. Q., Ye, K., Bhattacharjee, A., Brizuela, L., McCombie, W. R., Wigler, M., Hannon, G. J. y Hicks, J. B. (2009)

‘High definition profiling of mammalian DNA methylation by array capture and single molecule bisulfite sequencing’, pp. 1593–1605. doi: 10.1101/gr.095190.109.

Hooper, L., Martin, N., Abdelhamid, A. y G, D. S. (2015) ‘Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease (Review)’, (6). doi: 10.1002/14651858.CD011737.www.cochranelibrary.com.

Huck-Hui, N. y Bird, A. (1999) ‘DNA methylation and chromatin modification’, *Current Opinion in Genetics and Development*, 9(2), pp. 158–163. doi: 10.1016/S0959-437X(99)80024-0.

Huh, I., Zeng, J., Park, T. y Yi, S. V (2013) ‘DNA methylation and transcriptional noise.’, *Epigenetics & chromatin*, 6(1), p. 9. doi: 10.1186/1756-8935-6-9.

Irizarry, R., Ladd-acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Webster, M., Ji, H., Potash, J. y Sabunciyan, S. (2009) ‘Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores Supplementary Figures This document contains the following Supplementary Figures : Supplementary Figure 1’, *Nature genetics*.

Jacobsen, S. C., Brons, C., Bork-Jensen, J., Ribel-Madsen, R., Yang, B., Lara, E., Hall, E., Calvanese, V., Nilsson, E., Jorgensen, S. W., Mandrup, S., Ling, C., Fernandez, A. F., Fraga, M. F., Poulsen, P. y Vaag, A. (2012) ‘Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men’, *Diabetologia*, 55(12), pp. 3341–3349. doi: 10.1007/s00125-012-2717-8.

Jaenisch, R. y Bird, A. (2003) ‘Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.’, *Nature genetics*, 33 Suppl(march), pp. 245–254. doi: 10.1038/ng1089.

Jiang, Y., Zhang, J., Xiong, J., Cao, J., Li, G. y Wang, S. (2007) ‘Ligands of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Inhibit Homocysteine induced DNA Methylation of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene’, *Acta Biochim Biophys Sin*, 39(5), pp. 366–376. doi: 10.1111/j.1745-7270.2007.00291.x.

Jones, P. a and Liang, G. (2009) ‘Rethinking how DNA methylation patterns are maintained.’, *Nature reviews. Genetics*. Nature Publishing Group, 10(11), pp. 805–11. doi: 10.1038/nrg.2651.

Jung, M. y Pfeifer, G. P. (2015) 'Aging and DNA methylation.', *BMC biology*, 13(1), p. 7. doi: 10.1186/s12915-015-0118-4.

Kaati, G., Bygren, L. O. y Edvinsson, S. (2002) 'Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period', *European Journal of Human Genetics*, 10(11), pp. 682–688. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200859.

Keating, S. T. y El-Osta, A. (2015) 'Epigenetics and metabolism', *Circulation Research*, 116(4), pp. 715–736. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303936.

Kerkel, K., Spadola, A., Yuan, E., Kosek, J., Jiang, L., Hod, E., Li, K., Murty, V. V., Schupf, N., Vilain, E., Morris, M., Haghghi, F. y Tycko, B. (2008) 'Genomic surveys by methylation-sensitive SNP analysis identify sequence-dependent allele-specific DNA methylation', *Nature Genetics*, 40(7), pp. 904–908. doi: 10.1038/ng.174.

Khankari, N. K., Murff, H. J., Zeng, C., Wen, W., Eeles, R. A., Easton, D. F., Kote-Jarai, Z., Al Olama, A. A., Benlloch, S., Muir, K., Giles, G. G., Wiklund, F., Gronberg, H., Haiman, C. A., Schleutker, J., Nordestgaard, B. G., Travis, R. C., Donovan, J. L., Pashayan, N., Khaw, K.-T., Stanford, J. L., Blot, W. J., Thibodeau, S. N., Maier, C., Kibel, A. S., Cybulski, C., Cannon-Albright, L., Brenner, H., Park, J., Kaneva, R., Batra, J., Teixeira, M. R., Pandha, H. y Zheng, W. (2016) 'Polyunsaturated fatty acids and prostate cancer risk: a Mendelian randomisation analysis from the PRACTICAL consortium', *British Journal of Cancer*, (April), pp. 1–8. doi: 10.1038/bjc.2016.228.

Kiec-Wilk, B., Polus, A., Mikolajczyk, M. y Mathers, J. C. (2007) 'Beta-carotene and arachidonic acid induced DNA methylation and the regulation of pro-chemotactic activity of endothelial cells and its progenitors', *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58(4), pp. 757–766.

Kiec-Wilk, B., Razny, U., Mathers, J. C. y Dembinska-Kiec, A. (2009) 'DNA methylation, induced by beta-carotene and arachidonic acid, plays a regulatory role in the pro-angiogenic VEGF-receptor (KDR) gene expression in endothelial cells', *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(4), pp. 49–53.

Kothapalli, K. S. D., Anthony, J. C., Pan, B. S., Hsieh, A. T., Nathanielsz, P. W. y Brenna, J. T. (2007) 'Differential cerebral cortex transcriptomes of baboon neonates consuming moderate and

high docosahexaenoic acid formulas', *PLoS ONE*, 2(4). doi: 10.1371/journal.pone.0000370.

de la Rica, L., Urquiza, J. M., Gómez-Cabrero, D., Islam, A. B. M. M. K., López-Bigas, N., Tegnér, J., Toes, R. E. M. y Ballestar, E. (2013) 'Identification of novel markers in rheumatoid arthritis through integrated analysis of DNA methylation and microRNA expression.', *Journal of Autoimmunity*, 41, pp. 6–16. doi: 10.1016/j.jaut.2012.12.005.

de la Rocha, C., Pérez-Mojica, J. E., León, S. Z.-D., Cervantes-Paz, B., Tristán-Flores, F. E., Rodríguez-Ríos, D., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., Alvarado-Caudillo, Y., Carmona, F. J., Esteller, M., Hernández-Rivas, R., Wrobel, K., Wrobel, K., Zaina, S. y Lund, G. (2016) 'Associations between whole peripheral blood fatty acids and DNA methylation in humans', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6, p. 25867. doi: 10.1038/srep25867.

Lehrke, M. y Lazar, M. A. (2005) 'The many faces of PPARgamma', *Cell*, 123(6), pp. 993–999. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.026.

Li, E., Beard, C. y Jaenisch, R. (1993) 'Role for DNA methylation in genomic imprinting.', *Nature*, 366(6453), pp. 362–5. doi: 10.1038/366362a0.

Lindholm, M. E., Marabita, F., Gomez-Cabrero, D., Rundqvist, H., Ekström, T. J., Tegnér, J. y Sundberg, C. J. (2014) 'An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training', *Epigenetics*, 9(12), pp. 1557–1569. doi: 10.4161/15592294.2014.982445.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B. y Ecker, J. R. (2009) 'Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences.', *Nature*. Nature Publishing Group, 462(7271), pp. 315–22. doi: 10.1038/nature08514.

Lowe, R., Slodkowitz, G., Goldman, N. y Rakyan, V. K. (2015) 'The human blood DNA methylome displays a highly distinctive profile compared with other somatic tissues', *Epigenetics*, 10(4), pp. 274–281. doi: 10.1080/15592294.2014.1003744.

Lund, G., Andersson, L., Lauria, M., Lindholm, M., Fraga, M. F., Villar-Garea, A., Ballestar, E., Esteller, M. y Zaina, S. (2004) 'DNA methylation polymorphisms precede any histological sign

of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E', *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), pp. 29147–29154. doi: 10.1074/jbc.M403618200.

Marco, A., Kislouk, T., Tabachnik, T., Meiri, N. y Weller, A. (2014) 'Overweight and CpG methylation of the Pomc promoter in offspring of high-fat-diet-fed dams are not "reprogrammed" by regular chow diet in rats', *FASEB Journal*, 28(9), pp. 4148–4157. doi: 10.1096/fj.14-255620.

Marshall, C., Hitman, G. A., Cassell, P. G. y Turner, M. D. (2007) 'Effect of glucolipotoxicity and rosiglitazone upon insulin secretion', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(3), pp. 756–762. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.047.

Martino, D. y Saffery, R. (2015) 'Characteristics of DNA methylation and gene expression in regulatory features on the Infinium 450k Beadchip', pp. 1–7. doi: 10.1101/032862.

De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B. y Nelson, W. G. (2007) 'Inflammation in prostate carcinogenesis.', *Nature reviews. Cancer*, 7(4), pp. 256–69. doi: 10.1038/nrc2090.

McGill, H. C., McMahan, C. A. y Gidding, S. S. (2008) 'Preventing heart disease in the 21st century: Implications of the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) study', *Circulation*, 117(9), pp. 1216–1227. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.717033.

Mckay, J. A. y Mathers, J. C. (2011) 'Diet induced epigenetic changes and their implications for health', *Acta Physiologica*, pp. 103–118. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02278.x.

Medina-Gomez, G., Gray, S. L., Yetukuri, L., Shimomura, K., Virtue, S., Campbell, M., Curtis, R. K., Jimenez-Linan, M., Blount, M., Yeo, G. S. H., Lopez, M., Seppänen-Laakso, T., Ashcroft, F. M., Orešič, M. y Vidal-Puig, A. (2007) 'PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism', *PLoS Genetics*, 3(4), pp. 0634–0647. doi: 10.1371/journal.pgen.0030064.

Meissner, A. (2011) 'Guiding DNA methylation', *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 9(5), pp. 388–390. doi: 10.1016/j.stem.2011.10.014.

Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T. C., Richter, J., Stadler, M. B., Bibel, M. y Schübeler, D. (2008) 'Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors', *Molecular Cell*, 30(6), pp. 755–766. doi:

10.1016/j.molcel.2008.05.007.

Moran, B. M., Flatt, P. R. y McKillop, A. M. (2016) ‘G protein-coupled receptors: signalling and regulation by lipid agonists for improved glucose homeostasis’, *Acta Diabetologica*. Springer Milan, 53(2), pp. 177–188. doi: 10.1007/s00592-015-0826-9.

Naghavi, M., Wang, H., Lozano, R., Davis, A., Liang, X., Zhou, M., Vollset, S. E., Ozgoren, A. A., Abdalla, S., Abd-Allah, F., Aziz, M. I. A., Abera, S. F., Aboyans, V., Abraham, B., Abraham, J. P., Abuabara, K. E., Abubakar, I., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Achoki, T., Adelekan, A., Ademi, Z., Adofo, K., Adou, A. K., Adsuar, J. C., Ärnlöv, J., Agardh, E. E., Akena, D., Al Khabouri, M. J., Alasfoor, D., Albittar, M., Alegretti, M. A., Aleman, A. V., Alemu, Z. A., Alfonso-Cristancho, R., Alhabib, S., Ali, M. K., Ali, R., Alla, F., Al Lami, F., Allebeck, P., AlMazroa, M. A., Al-Shahi Salman, R., Alsharif, U., Alvarez, E., Alviz-Guzman, N., Amankwaa, A. A., Amare, A. T., Ameli, O., Amini, H., Ammar, W., Anderson, H. R., Anderson, B. O., Antonio, C. A. T., Anwari, P., Apfel, H., Cunningham, S. A., Arsenijevic, V. S. A., Artaman, A., Asad, M. M., Asghar, R. J. *et al.* (2014) ‘Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013’, *The Lancet*. Elsevier Ltd, 385(9963), pp. 117–171. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2.

Nan, X., Meehan, R. R. y Bird, a (1993) ‘Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2.’, *Nucleic acids research*, 21(21), pp. 4886–4892. doi: 10.1093/nar/21.21.4886.

Nardone, S., Sams, D. S., Reuveni, E., Getselter, D., Oron, O., Karpuj, M. y Elliott, E. (2014) ‘DNA methylation analysis of the autistic brain reveals multiple dysregulated biological pathways.’, *Translational psychiatry*. Nature Publishing Group, 4(9), p. e433. doi: 10.1038/tp.2014.70.

Naumov, V. A., Generozov, E. V., Zaharjevskaya, N. B., Matushkina, D. S., Larin, A. K., Chernyshov, S. V., Alekseev, M. V., Shelygin, Y. A. y Govorun, V. M. (2013) ‘Genome-scale analysis of DNA methylation in colorectal cancer using Infinium HumanMethylation450 BeadChips’, *Epigenetics*, 8(9), pp. 921–934. doi: 10.4161/epi.25577.

Neschen, S., Morino, K., Dong, J., Wang-Fischer, Y., Cline, G. W., Romanelli, A. J., Rossbacher,

- J. C., Moore, I. K., Regittnig, W., Munoz, D. S., Kim, J. H. y Shulman, G. I. (2007) 'n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner', *Diabetes*, 56(4), pp. 1034–1041. doi: db06-1206 [pii]\r10.2337/db06-1206.
- Noll, J. E., Hewett, D. R., Williams, S. A., Vandyke, K., Kok, C., To, L. B. y Zannettino, A. C. W. (2014) 'SAMS1 is a tumor suppressor gene in multiple myeloma', *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 16(7), pp. 572–585. doi: 10.1016/j.neo.2014.07.002.
- Nordlund, J., Bäcklin, C. L., Wahlberg, P., Busche, S., Berglund, E. C., Eloranta, M.-L., Flaegstad, T., Forestier, E., Frost, B.-M., Harila-Saari, A., Heyman, M., Jónsson, O. G., Larsson, R., Palle, J., Rönnblom, L., Schmiegelow, K., Sinnett, D., Söderhäll, S., Pastinen, T., Gustafsson, M. G., Lönnerholm, G. y Syvänen, A.-C. (2013) 'Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia.', *Genome biology*, 14(9), p. r105. doi: 10.1186/gb-2013-14-9-r105.
- Oberland, S., Ackels, T., Gaab, S., Pelz, T., Spehr, J., Spehr, M. y Neuhaus, E. M. (2015) 'CD36 is involved in oleic acid detection by the murine olfactory system', 9(September). doi: 10.3389/fncel.2015.00366.
- Olsson, A. H., Volkov, P., Bacos, K., Dayeh, T., Hall, E., Nilsson, E. A., Ladenvall, C., Rönn, T. y Ling, C. (2014) 'Genome-Wide Associations between Genetic and Epigenetic Variation Influence mRNA Expression and Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets.', *PLoS Genetics*, 10(11), p. e1004735. doi: 10.1371/journal.pgen.1004735.
- Papackova, Z. y Cahova, M. (2015) 'Fatty acid signaling: The new function of intracellular lipases', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), pp. 3831–3855. doi: 10.3390/ijms16023831.
- Pashkov, V., Huang, J., Parameswara, V. K., Kedzierski, W., Kurrasch, D. M., Tall, G. G., Esser, V., Gerard, R. D., Uyeda, K., Towle, H. C. y Wilkie, T. M. (2011) 'Regulator of G protein signaling (Rgs16) inhibits hepatic fatty acid oxidation in a carbohydrate response element-binding protein (ChREBP)-dependent manner', *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), pp. 15116–15125. doi: 10.1074/jbc.M110.216234.
- Peng, X., Wood, C. L., Blalock, E. M., Chen, K. C., Landfield, P. W. y Stromberg, A. J. (2003)

‘Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments.’, *BMC bioinformatics*, 4(1), p. 26. doi: 10.1186/1471-2105-4-26.

Portela, A. y Esteller, M. (2010) ‘Epigenetic modifications and human disease.’, *Nature biotechnology*. Nature Publishing Group, 28(10), pp. 1057–1068. doi: 10.1038/nbt.1685.

Purushotham, A., Schug, T. T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X. y Li, X. (2009) ‘Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation’, *Cell Metabolism*. Elsevier Ltd, 9(4), pp. 327–338. doi: 10.1016/j.cmet.2009.02.006.

Rajaraman, G., Simcocks, A., Hryciw, D. H., Hutchinson, D. S. y McAinch, A. J. (2015) ‘G protein coupled receptor 18: A potential role for endocannabinoid signaling in metabolic dysfunction’, *Molecular Nutrition & Food Research*, p. n/a-n/a. doi: 10.1002/mnfr.201500449.

Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., Newsholme, E. A. (1963) ‘The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus’, *The Lancet*, 281(7285), pp. 785–789. doi: 10.1016/S0140-6736(63)91500-9.

Rangel-Salazar, R., Wickström-Lindholm, M., Aguilar-Salinas, C. A., Alvarado-Caudillo, Y., Døssing, K. B., Esteller, M., Labourier, E., Lund, G., Nielsen, F. C., Rodríguez-Ríos, D., Solís-Martínez, M. O., Wrobel, K., Wrobel, K. y Zaina, S. (2011) ‘Human native lipoprotein-induced de novo DNA methylation is associated with repression of inflammatory genes in THP-1 macrophages’, *BMC Genomics*. BioMed Central Ltd, 12(1), p. 582. doi: 10.1186/1471-2164-12-582.

Rasmussen, K. D. y Helin, K. (2016) ‘Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer’, *Genes and Development*, 30(7), pp. 733–750. doi: 10.1101/gad.276568.115.

Reik, W., Dean, W. y Walter, J. (2001) ‘Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development’, *Science*, 293(August), pp. 1089–1094.

Sandoval, J., Heyn, H. A., Moran, S., Serra-Musach, J., Pujana, M. A., Bibikova, M. y Esteller, M. (2011) ‘Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome’, *Epigenetics*, 6(6), pp. 692–702. doi: 10.4161/epi.6.6.16196.

Sasaki, H. y Matsui, Y. (2008) ‘Epigenetic events in mammalian germ-cell development:

reprogramming and beyond', *Nat Rev Genet*, 9(2), pp. 129–140. doi: nrg2295 [pii]r10.1038/nrg2295.

Schubeler, D. (2012) 'Epigenetic Islands in a Genetic Ocean', *Science*, 338(6108), pp. 756–757. doi: 10.1126/science.1227243.

Schuermann, D., Weber, A. R. y Schär, P. (2016) 'Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties', *DNA Repair*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.05.013.

Schultz, S. T., Klonoff-Cohen, H. S., Wingard, D. L., Akshoomoff, N. A., Macera, C. A., Ji, M. y Bacher, C. (2006) 'Breastfeeding, infant formula supplementation, and Autistic Disorder: the results of a parent survey.', *International breastfeeding journal*, 1, p. 16. doi: 10.1186/1746-4358-1-16.

Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T. a, Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., Tajima, S., Mitsuya, K., Okano, M. y Koseki, H. (2007) 'The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA.', *Nature*, 450(7171), pp. 908–912. doi: 10.1038/nature06397.

Shen, J., Wang, S., Zhang, Y. J., Wu, H. C., Kibriya, M. G., Jasmine, F., Ahsan, H., Wu, D. P. H., Siegel, A. B., Remotti, H. y Santella, R. M. (2013) 'Exploring genome-wide DNA methylation profiles altered in hepatocellular carcinoma using Infinium HumanMethylation 450 BeadChips', *Epigenetics*, 8(1), pp. 34–43. doi: 10.4161/epi.23062.

Shivappa, N., Hébert, J. R., Zucchetto, A., Montella, M., Serraino, D., La Vecchia, C. y Rossi, M. (2015) 'Dietary inflammatory index and endometrial cancer risk in an Italian case–control study', *British Journal of Nutrition*, pp. 1–9. doi: 10.1017/S0007114515004171.

Silva-Martinez, G. A., Rodriguez-Rios, D., Alvarado-Caudillo, Y., Vaquero, A., Esteller, M., Carmona, F. J., Moran, S., Nielsen, F. C., Wickstrom-Lindholm, M., Wrobel, K. K., Wrobel, K. K., Barbosa-Sabanero, G., Zaina, S. y Lund, G. (2016) 'Arachidonic and oleic acid exert distinct effects on the DNA methylome.', *Epigenetics*, 2294(May), pp. 1–14. doi: 10.1080/15592294.2016.1161873.

Sirivanichsuntorn, P., Keelawat, S., Danuthai, K., Mutirangura, A., Subbalekha, K. y Kitkumthorn, N. (2013) 'LINE-1 and Alu hypomethylation in mucoepidermoid carcinoma.', *BMC clinical*

pathology. BMC Clinical Pathology, 13(1), p. 10. doi: 10.1186/1472-6890-13-10.

Smith, Z. D., Chan, M. M., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A. y Meissner, A. (2012) 'A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo.', *Nature*, 484(7394), pp. 339–44. doi: 10.1038/nature10960.

Sonnet, M., Claus, R., Becker, N., Zucknick, M., Petersen, J., Lipka, D. B., Oakes, C. C., Andrulis, M., Lier, A., Milsom, M. D., Witte, T., Gu, L., Kim-Wanner, S.-Z., Schirmacher, P., Wulfert, M., Gattermann, N., Lübbert, M., Rosenbauer, F., Rehli, M., Bullinger, L., Weichenhan, D. y Plass, C. (2014) 'Early aberrant DNA methylation events in a mouse model of acute myeloid leukemia.', *Genome Medicine*, 6(4), p. 34. doi: 10.1186/gm551.

Soubry, A. (2015) 'Epigenetic inheritance and evolution : A paternal perspective on dietary influences', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 118(1–2), pp. 79–85. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.008.

de Souza, R. J., Mente, A., Maroleanu, A., Cozma, A. I., Ha, V., Kishibe, T., Uleryk, E., Budyłowski, P., Schünemann, H., Beyene, J. y Anand, S. S. (2015) 'Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 351(6), p. h3978. doi: 10.1136/bmj.h3978.

Steegenga, W. T., Boekschoten, M. V., Lute, C., Hooiveld, G. J., De Groot, P. J., Morris, T. J., Teschendorff, A. E., Butcher, L. M., Beck, S. y Müller, M. (2014) 'Genome-wide age-related changes in DNA methylation and gene expression in human PBMCs', *Age*, 36(3), pp. 1523–1540. doi: 10.1007/s11357-014-9648-x.

Stephen, R. L., Gustafsson, M. C. U., Jarvis, M., Tatoud, R., Marshall, B. R., Knight, D., Ehrenborg, E., Harris, A. L., Wolf, C. R. y Palmer, C. N. a (2004) 'Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines.', *Cancer research*, 64(9), pp. 3162–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126355> \n<http://cancerres.aacrjournals.org/content/64/9/3162.full.pdf>.

Sugii, S. y Evans, R. M. (2011) 'Epigenetic codes of PPAR γ in metabolic disease', *FEBS Letters*,

585(13), pp. 2121–2128. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.007.

Surani, M. A., Hayashi, K. y Hajkova, P. (2007) ‘Genetic and Epigenetic Regulators of Pluripotency’, *Cell*, pp. 747–762. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.010.

Suzuki, M. M. y Bird, A. (2008) ‘DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics.’, *Nature reviews. Genetics*, 9(6), pp. 465–76. doi: 10.1038/nrg2341.

Talukdar, S., Olefsky, J. M. y Osborn, O. (2011) ‘Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases’, *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 32(9), pp. 543–550. doi: 10.1016/j.tips.2011.04.004.

Thijssen, M. A. y Mensink, R. P. (2005) ‘Fatty acids and atherosclerotic risk’, *Handbook of Experimental Pharmacology*, 170, pp. 165–194. doi: 10.1007/3-540-27661-0-5.

Thurman, R. E., Rynes, E., Humbert, R., Vierstra, J., Maurano, M. T., Haugen, E., Sheffield, N. C., Stergachis, A. B., Wang, H., Vernot, B., Garg, K., John, S., Sandstrom, R., Bates, D., Boatman, L., Canfield, T. K., Diegel, M., Dunn, D., Ebersol, A. K., Frum, T., Giste, E., Johnson, A. K., Johnson, E. M., Kutuyavin, T., Lajoie, B., Lee, B.-K., Lee, K., London, D., Lotakis, D., Neph, S., Neri, F., Nguyen, E. D., Qu, H., Reynolds, A. P., Roach, V., Safi, A., Sanchez, M. E., Sanyal, A., Shafer, A., Simon, J. M., Song, L., Vong, S., Weaver, M., Yan, Y., Zhang, Z. Z., Zhang, Z. Z., Lenhard, B., Tewari, M., Dorschner, M. O., Hansen, R. S., Navas, P. A., Stamatoyannopoulos, G., Iyer, V. R., Lieb, J. D., Sunyaev, S. R., Akey, J. M., Sabo, P. J., Kaul, R., Furey, T. S., Dekker, J., Crawford, G. E. y Stamatoyannopoulos, J. A. (2012) ‘The accessible chromatin landscape of the human genome.’, *Nature*. Nature Publishing Group, 489(7414), pp. 75–82. doi: 10.1038/nature11232.

Uriarte, G., Paternain, L., Milagro, F. I., Martínez, J. A. y Campion, J. (2013) ‘Shifting to a control diet after a high-fat, high-sucrose diet intake induces epigenetic changes in retroperitoneal adipocytes of Wistar rats’, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(3), pp. 601–611. doi: 10.1007/s13105-012-0231-6.

Valencia-Morales, M. D. P., Zaina, S., Heyn, H., Carmona, F. J., Varol, N., Sayols, S., Condom, E., Ramírez-Ruz, J., Gomez, A., Moran, S., Lund, G., Rodríguez-Ríos, D., López-González, G., Ramírez-Nava, M., de la Rocha, C., Sanchez-Flores, A. y Esteller, M. (2015) ‘The DNA

methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression.’, *BMC medical genomics*, 8(1), p. 7. doi: 10.1186/s12920-015-0085-1.

Waddington, C. H. (1942) ‘The epigenotype’, *Endeavour*, 1, pp. 18–20. doi: 10.1093/ije/dyr184.

Wang, L., Cano, M., Datta, S., Wei, H., Ebrahimi, K. B., Gorashi, Y., Garlanda, C. y Handa, J. T. (2016) ‘PTX3 recruits complement factor H to protect against oxidative stress-induced complement and inflammasome overactivation.’, *The Journal of pathology*. doi: 10.1002/path.4811.

Wang, S., Awad, K. S., Elinoff, J. M., Dougherty, E. J., Ferreyra, G. A., Wang, J. Y., Cai, R., Sun, J., Ptasinska, A. y Danner, R. L. (2015) ‘G protein-coupled receptor 40 (GPR40) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): An integrated two-receptor signaling pathway’, *Journal of Biological Chemistry*, 290(32), pp. 19544–19557. doi: 10.1074/jbc.M115.638924.

Wang, Y. X., Lee, C. H., Tjep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H. y Evans, R. M. (2003) ‘Peroxisome Proliferator Activated Receptor [delta] Activates Fat Metabolism to Prevent Obesity’, *Cell*, 113, pp. 159–170. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00269-1.

Wang, Z., Meissner, A. y Jaenisch, R. (2004) ‘Nuclear Cloning and Epigenetic Reprogramming’, *Handbook of Stem Cells*, 1(2001), pp. 119–127. doi: 10.1016/B978-012436643-5/50019-5.

Waterland, R. A. y Jirtle, R. L. (2003) ‘Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation.’, *Molecular and cellular biology*, 23(15), pp. 5293–300. doi: 10.1128/MCB.23.15.5293.

Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D. y Henke, B. R. (2000) ‘The PPARs: From orphan receptors to drug discovery’, *Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 527–550. doi: 10.1021/jm990554g.

Wockner, L. F., Noble, E. P., Lawford, B. R., Young, R. M., Morris, C. P., Whitehall, V. L. J. y Voisey, J. (2014) ‘Genome-wide DNA methylation analysis of human brain tissue from schizophrenia patients.’, *Translational psychiatry*, 4(October 2013), p. e339. doi: 10.1038/tp.2013.111.

World Health Organization (2015) *World Health Statistics 2015*.

Yao, B., Christian, K. M., He, C., Jin, P., Ming, G. y Song, H. (2016) ‘Epigenetic mechanisms in neurogenesis’, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrn.2016.70.

Yu, D.-H., Gadkari, M., Zhou, Q., Yu, S., Gao, N., Guan, Y., Schady, D., Roshan, T. N., Chen, M.-H., Laritsky, E., Ge, Z., Wang, H., Chen, R., Westwater, C., Bry, L., Waterland, R. A., Moriarty, C., Hwang, C., Swennes, A. G., Moore, S. R. y Shen, L. (2015) ‘Postnatal epigenetic regulation of intestinal stem cells requires DNA methylation and is guided by the microbiome.’, *Genome biology*, 16(1), p. 211. doi: 10.1186/s13059-015-0763-5.

Yu, Y., Zheng, S., Zhang, S., Jin, W., Liu, H., Jin, M., Chen, Z., Ding, Z., Wang, L. y Chen, K. (2014) ‘Polymorphisms of inflammation-related genes and colorectal cancer risk: A population-based case-control study in China’, *International Journal of Immunogenetics*, 41(4), pp. 289–297. doi: 10.1111/iji.12119.

Zaina, S. (2014) ‘Unraveling the DNA methylome of atherosclerosis.’, *Current opinion in lipidology*, 25(2), pp. 148–53. doi: 10.1097/MOL.0000000000000059.

Zaina, S., Gonçalves, I., Carmona, F. J., Gomez, A., Heyn, H., Mollet, I. G., Moran, S., Varol, N. y Esteller, M. (2015) ‘DNA Methylation Dynamics in Human Carotid Plaques After Cerebrovascular Events’. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305630.

Zaina, S., Heyn, H., Carmona, F. J., Varol, N., Sayols, S., Condom, E., Ramírez-Ruz, J., Gomez, A., Goncalves, I., Moran, S. y Esteller, M. (2014) ‘DNA methylation map of human atherosclerosis’, *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 7(5), pp. 692–700. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000441.

Zhang, Y.-M. y Rock, C. O. (2009) ‘Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis.’, *Journal of lipid research*, 50 Suppl, pp. S115–S119. doi:10.1194/jlr.R800046-JLR200.

Anexos

Material Suplementario

Debido a la extensión del material suplementario, éste será puesto a su disposición de manera permanente entrando al siguiente enlace de internet:

<https://www.dropbox.com/s/uvvgqise8rrrtdu/Datos%20SupTesis-GuillermoSilva.xlsx?dl=0>

Guillermo A. Silva-Martínez

PERFIL:

- Altamente motivado con experiencia comprobada en el campo de investigación de la biología molecular y epigenética. Fuertes habilidades interpersonales.
- Técnicas experimentales: Epigenética; Manejo de cultivos celulares de mamíferos, plantas, hongos y bacterias; análisis de genética funcional (transfección de células animales con siRNA); biología molecular; técnicas de inmuno-detección (proteína, DNA y RNA) y análisis bioinformáticos
- Análisis, curado e integración de datos genómicos de gran escala (p. ej. Análisis de expresión a nivel exón/gen o metilación del ADN).
- Habilidades computacionales: Manejo de los SO Unix/Linux/Windows; programas R, PERL, Fortran, SPSS.

EDUCACIÓN: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Irapuato, GTO. México.

Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología, Febrero 2017

Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, GTO. México

M.C en Ingeniera Bioquímica, 2012

Ingeniero Bioquímico, 2009

APOYOS, BECAS Y ENTRENAMIENTO

Beca Nacional para el estudio de posgrados por cuatro años (2012-2016) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para la obtención del grado de Doctor en Ciencias; CINVESTAV Unidad Irapuato, GTO. México.

Beca Nacional para el estudio de posgrados por dos años (2009-2011) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para la obtención del grado de Maestro en Ciencias; Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, GTO. México.

INTERESES DE INVESTIGACIÓN:

Epigenética de enfermedades humanas; Remodelación del epigenoma en respuesta a estímulos externos (Interacción nutriente/epigenoma); Regulación epigenética de la expresión génica. Uso de la tecnología CRISPR/Cas9 para dirigir la metilación o desmetilación de genes específicos.

EXPERIENCIA EN DOCENCIA E INVESTIGACION:

Universidad Latina de México; Escuela de Medicina, Celaya, GTO. México

Docente, 2016 – Presente

Docente encargado de impartir la materia de *Biología Molecular* y coordinador de seminarios de investigación pertenecientes a la escuela de medicina.

CINVESTAV Unidad Irapuato, Irapuato, GTO. México

Candidato a Doctor en Ciencias, 2012- Presente

- *Ácidos grasos poliinsaturados ejercen cambios en el metiloma del ADN*

Hemos analizado perfiles de metilación del ADN y de expresión génica de células monocíticas estimuladas con los ácidos grasos araquidónico y oleico (AA y AO, respectivamente), los cuales se les atribuyen propiedades opuestas en la respuesta inflamatoria celular, a tres concentraciones fisiológicamente significativas (1, 10 y 100 μ M) por 24 horas. Hemos descubierto que los perfiles de metilación del ADN inducidos por el AA y AO son distintos. Nuestra observación de que el AA y el AO participan en el remodelado del metiloma del ADN en enfermedades metabólicas a través de la beta-oxidación, y la señalización mediada por PPAR-alfa y sirtuina1, posee implicaciones potenciales para el desarrollo de terapias orientadas en la modificación de la dieta como mecanismo de prevención para el desarrollo de este tipo de enfermedades.

- *Los ácidos grasos y su papel en el remodelado del epigenoma en algunas enfermedades humanas*

Perfiles de metilación del ADN en monocitos THP-1 inducidos con AA o AO fueron comparados con diecinueve perfiles generados bajo la misma plataforma de estudio (Infimium HumanMethylation 450K). Estos datos cubren una amplia gama de enfermedades y condiciones, por ejemplo enfermedades metabólicas, desordenes psiquiátricos, cáncer y envejecimiento. Además, el análisis comparativo incluye perfiles de metilación del ADN correspondientes a ocho tejidos sanos a manera de control. Así pues, hemos observado que el perfil inducido por AA es similar a aquellos descritos para el ácido palmítico, aterosclerosis, diabetes, obesidad y autismo, pero muy diferente a aquel perfil obtenido por el estímulo de AO.

- *Efecto de los transcritos de la RNA POL II y POL III en la metilación del ADN en respuesta a estímulo con ácidos grasos en células THP-1*

Análisis de expresión diferencial de transcritos obtenidos de células THP-1 estimuladas con ácidos grasos (AA y AO) revelaron que una respuesta dosis dependiente en la metilación del ADN en elementos repetidos ALU, se encuentra mediada por ARNnc, con funciones no anotadas. Después de un tratamiento con inhibidores de la POL II y POL III, células THP-1 fueron estimuladas con AA o AO, posteriormente niveles de metilación de ALU fueron medidos mediante un ensayo COBRA después de 1, 3, 6 y 24 horas después del estímulo. Hasta ahora, nuestros resultados sugieren que la metilación dosis dependiente en respuesta al estímulo de AA depende de una regulación de transcritos de POL II y POL III, por el otro lado parece ser que la metilación en respuesta al AO recae en transcritos de la POL III.

Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, GTO. Mexico

- *Diseño de un sistema para la inmunoprecipitación de complejos proteicos en Arabidopsis thaliana*

AGAMOUS es un gen u y factor de transcripción involucrado en la formación de la flor en *A. thaliana*. Con el fin de conocer las posibles interacciones desconocidas de AGAMOUS con otras proteínas/factores de transcripción, se diseñó un vector que con una fusión transcripcional del gen completo (aprox. 12kb) con una secuencias FLAG-Tag dentro de la región 3'UTR para posteriormente ser precipitada con biotina. Líneas *agamous* homocigotas fueron generadas para posteriormente ser transformadas con el vector mediante el uso de *Agrobacterium thumefaciens*, con el fin de probar la funcionalidad del vector a través de la restauración al fenotipo silvestre.

- *Silenciamiento de genes giberelinas oxidasa en A. thaliana usando RNAi*

Se diseñó un vector bajo el promotor 35S que contenía una secuencia consenso para el silenciamiento por RNAi de la familia de genes correspondientes a las giberelinas oxidasas. Se clonaron dos fragmentos de la misma secuencia separados por una pequeña secuencia, no funcional, que serviría para que se formara una horquilla de RNA para activar el mecanismo de silenciamiento mediado por DICER.

CURSON IMPORTANTES:

- Manejo de sustancias peligrosas, seguridad y GHS en el laboratorio; CINVESTAV Unidad Irapuato, Septiembre 2012.
- Bioinformática y Bioestadística; CINVESTAV Unidad Irapuato; curso de 40 horas; Abril 2012

ESTILO DE TRABAJO:

- Capaz de adquirir nuevos conocimientos y rápida adaptación a un nuevo ambiente de trabajo
- Estilo de trabajo independiente y una excelente capacidad de trabajo en equipo
- Bien organizado y apasionado
- Capaz de trabajar bajo presión

Lista de publicaciones y participaciones en congresos con el trabajo de tesis.

- **Silva-Martínez, G.A.**, Zaina, S and Lund, G. (*Sometido*; 2016) Array probe density and differentially methylated CpG calling bias in human disease and physiological DNA methylation profiling.
- **Silva-Martínez, G. A.**, Dalia Rodríguez-Ríos, Yolanda Alvarado-Caudillo, Alejandro Vaquero, Manel Esteller, F.Javier Carmona, Sebastian Moran, Finn C.Nielsen, Marie Wickström Lindholm, Katarzyna Wrobel, Kazimierz Wrobel, Gloria Barbosa Sabanero, Silvio Zaina & Gertrud Lund (2016): Arachidonic and oleic acid exert distinct effects on the DNA methylome, *Epigenetics*, DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/15592294.2016.1161873>
- **Silva-Martínez G.A** *et al.* (Aceptado para presentación de poster en la XVI Reunión Internacional de Ciencias Médicas, Universidad de Guanajuato Campus León, abril 2016). The role of arachidonic and oleic acid on epigenetics of some human diseases.
- **Silva-Martínez, G. A.**, Rodriguez-Rios, D., Alvarado-Caudillo, Y., Barbosa-Sabanero, G., Vaquero, A., Esteller, M., Carmona, F. J., Moran, S., Nielsen, F. C., Wickström-Lindholm, M., Wrobel, K., Wrobel, K., Zaina, S., & Lund, G. (2016). Arachidonic and Oleic Acid Exerts Distinct Effects on DNA Methylome. (Aceptado para presentación de poster en Experimental Biology, San Diego, CA. April 2016). *The FASEB Journal*, 30(1 Supplement), lb205.
- **Silva-Martínez G.A** *et al.* (Aceptado para presentación de poster en la XV Reunión Internacional de Ciencias Médicas, Universidad de Guanajuato Campus León, abril 2015). Transcripts of RNAPOLIII and RNAPOLII mediate the response in DNA methylation of Alu elements in THP-1 cells stimulated with arachidonic or oleic acid.
- **Silva-Martínez G.A** *et al.* (Aceptado para presentación de poster en la XIV Reunión Internacional de Ciencias Médicas, Universidad de Guanajuato Campus León, abril 2014). Arachidonic and oleic acid induce changes in the methylation of specific genomic regions of THP-1 monocytes –A Preliminary Report.
- **Silva-Martínez G.A** *et al.* (Aceptado para presentación oral en la XIII Reunión de Ciencias Médicas, Universidad de Guanajuato Campus León, abril 2013). DNA methylation profiles of THP-1 cells stimulated with fatty acids and their transcriptional impact.