



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

**UNIDAD IRAPUATO  
DEPARTAMENTO DE INGENERÍA GENÉTICA**

**Análisis de la variación en los perfiles de metilación en la aterosclerosis  
humana y su asociación con la función mitocondrial**

**Tesis presentada por:**

Nicolás Fragoso Bargas

**Para obtener el grado de**

**Maestro en ciencias**

**En la especialidad de  
Biotecnología de Plantas**

**Directora de tesis:**

Dra. Gertrud Lund

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Manuel Fragoso y Dolores Díaz, por apoyarme y darme la suficiente independencia de tomar mis propias decisiones. Gracias a ustedes por el apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos, Verónica Fragoso y Manuel Fragoso, por estar ahí y ayudarme cuando lo he necesitado, desde que tengo memoria.

A Maricarmen, por ayudar indirectamente a mi papa en el peor momento de su vida, si bien, no me he dado la tarea de conocerte a fondo. Estoy seguro que eres una buena mujer, espero se hagan compañía durante mucho tiempo más.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realización de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Gertrud Lund por admitirme en su laboratorio y formarme como un estudiante independiente. Considero que fue una persona amable, con una gran preocupación y convicción por formar profesionales con ética profesional, lo cual considero admirable.

Agradezco mucho a la auxiliar de laboratorio Dalia Rodríguez por enseñarme las técnicas básicas de laboratorio y por las salidas organizadas por ella para quitarnos el estrés. Fue tanto una buena guía como amiga.

A mi comité: Silvio Zaina, por darme ideas en como enriquecer este trabajo, y la excelente retroalimentación en los seminarios, no hay nada mejor que trabajar con la fuente de los datos definitivamente. Selene Fernández, por ser una excelente guía desde el principio de la maestría, gracias a su rotación pude obtener las herramientas para analizar los datos presentados, asimismo, agradezco que muchas de sus preguntas eran puntuales y bien pensadas, con el mero afán de enriquecer el trabajo y fomentar el diálogo.

A los integrantes del laboratorio: Azucena Pescador por estandarizar los métodos del número de copias del ADN mitocondrial, debido a que sin ella básicamente toda la parte experimental de este trabajo no hubiera sido posible, asimismo, agradezco su compañía, y a que casi siempre compartía mi sentido del humor ácido. Atenea Vázquez, que si bien nos conocimos a penas recientemente, ha demostrado ser una persona amable y compartida, la cual nos ha ayudado con café y dulces en momentos de estrés. Alejandro Manzanares, por ser un buen compañero y amigo del laboratorio, compartiendo un sentido del humor, que para otras personas pudiera ser ofensivo. José Filimón, si bien, nos conocimos poco tiempo, el me instruyo en los primeros pasos de entrar a un laboratorio, además de resolverme algunas dudas teóricas. Helga Corona, su estancia fue corta, sin embargo, fue una buena compañera tanto en el laboratorio como en la amistad. En resumen, gracias a todos chicos por su presencia.

A mis roomies Cecilia Nava y Aurora Ordoñez, por las salidas chidas, por las pláticas, por aguantar cuando me desahogaba, por estar ahí en momentos cruciales, etcétera. Las aprecio mucho chicas.

A el grupo los “gorditos”, por aceptarme como miembro, hacerme reír y por hacerme compañía tanto en el cinves como en las salidas, me ayudaron a llenar en gran medida el vacío social en mi estancia en Irapuato.

A Diana y Lalo por orientarme con los tramites desde antes de entrar al instituto, sin su ayuda hubiera estado perdido, su amabilidad y paciencia son virtudes valiosas. ¡Muchas gracias!

# ÍNDICE

RESUMEN .....	8
1. ANTECEDENTES .....	10
1.1 La metilación del ADN y su asociación con la función mitocondrial.....	10
1.1.1 Metilación del ADN y su distribución en el genoma.....	10
1.1.2 La función mitocondrial y su relación con la mADN.....	11
1.2.1 Aterosclerosis .....	13
1.2.2 La mADN en la aterosclerosis .....	14
1.2.3 Función y disfunción mitocondrial en la aterosclerosis y/o sus factores de riesgo.....	15
1.3 Análisis de la variación diferencial, ¿una alternativa para el análisis de microarreglos de metilación de aterosclerosis y sus factores de riesgo? .....	17
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	19
2.1 Hipótesis .....	19
2.2 Objetivo General .....	19
2.3 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
3.1 Análisis de datos provenientes de microarreglos de mADN.....	20
3.2 Determinación semicuantitativa del número de copias de ADN mitocondrial .....	22
3.3 Correlaciones entre el número de copias de ADNmt y los CpGs-DVM.....	23
4. RESULTADOS .....	24
4.1 Identificación de los CpGs Diferencialmente Variables (CpGs-DVM).....	24
4.2 Análisis funcional.....	28
4.3 Análisis funcional de CpGs-DVM y CpGs-DM .....	31
4.4 Análisis comparativo entre CpGs-DVM en la aterosclerosis y sus factores de riesgo.....	32
4.5 Asociación entre número de copias de ADN mitocondrial y CpGs-DVM .....	36
5. DISCUSIÓN .....	38
5.1 La mADN de CpGs-DVM en la aterosclerosis y condiciones que predispone a esta.....	38
5.2 Análisis de enriquecimiento .....	39
5.3 Comparación entre el método de metilación diferencial y variación diferencial .....	41
5.4 Número de copias de ADNmt y su asociación con CpGs-DVM .....	42
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	44
6.1 Conclusiones.....	44
6.2 Perspectivas .....	45
7. REFERENCIAS.....	46
8. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	53
8.1 Acerca de las tablas suplementarias .....	53
8.2 Figuras Suplementarias .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: La distribución de la mADN en células normales. Las piruletas llenas y vacías indican CpGs metilados y no metilados, respectivamente .....	11
Figura 2. Factores involucrados en la mADN inducido por el AA en células THP-1. PPAR $\alpha$ , un factor de transcripción y su coactivador PGC1 $\alpha$ . .....	13
Figura 3 Cambios en la mADN en la aterosclerosis y su posible asociación con la función mitocondrial. ....	15
Figura 4: Variación epigenética: Durante la diferenciación, un compartimiento de ADN (molécula central) asociado con la lámina nuclear. ....	18
Figura 5. La anotación de los sitios CpG en el microarreglo 450K respecto: A) la región génica o B) ICGs (Silva, 2017). ....	20
Figura 6: Comportamiento del $\Delta\beta$ y $\Delta V$ el en la cohorte A (cohorte de las aortas) y C (cohorte de las carótidas): Cada punto rojo y azul representa el valor de $\Delta\beta$ y $\Delta V$ , respectivamente, de CpGs-DVM. Eje y: $\Delta\beta$ o $\Delta V$ , Eje x: CpGs-DVM. ....	25
Figura 7: Dendrograma de valores de $\beta$ de CpGs-DVM de las cohortes de las aortas y carótidas. Para fines ilustrativos se usaron 1490/6,469 CpGs-DVM que tuvieron un $\Delta\beta$ igual a +/- 0.10. ....	27
Figura 8: Análisis en vías KEGG de gCpGs-DVM en las cohortes de las aortas y carótidas de acuerdo al estado de la mADN y la localización génica de los gCpGs-DVM; a) Cohorte de las aortas. ....	30
Figura 9: Comparación de las primeras 15 de vías KEGG más significativas obtenidas en los CpGs DM y los CpGs DVM. ....	32
Figura 10: Mapa de calor donde se muestra los perfiles de mADN de los gCpGs-DVM de cada cohorte. ....	34
Figura 11: Comparación de los enriquecimientos funcionales KEGG entre los gCpGs-DVM común entre la cohorte de las aortas y los demás cohortes. ....	35
Figura 12: El número de copias del ADNmt en AE y SP .....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de gCpGs-DVM respecto a la región génica. ....	24
Tabla 2: CpGs-DVM de cada cohorte. ....	33
Tabla 3: Anotación funcional de gCpGs-DVM que correlacionan con número de copias del ADNmt en A-SP y A-PE .....	37

## ABREVIATURAS

**450k:** Microarreglo Infinium HumanMethylation450 de Illumina.

**ADNmt:** ADN mitocondrial.

**AGs:** Ácidos grasos.

**A-PE:** aorta con placa estable.

**A-SP:** Aorta sin placa.

**AMPK:** AMP- activated protein kinase.

**cAMP:** Adenosín monofosfato cíclico.

**C-PE:** Carótida con placa estable.

**C-PI:** Carotida con placa inestable.

**CpG:** Contexto de la mADN en mamíferos, La "p" en CpG representa que están enlazados por un fosfato.

**CpGs-DM:** CpGs diferencialmente metilados.

**CpGs-DVM:** CpGs diferencialmente variables respecto a la mADN.

**gCpGs:** CpGs con genes.

**CPT1:** carnitina palmitoiltransferasa I.  
**DNMTs:** ADN metiltransferasa.

**CYTB:** Citocromo B.

**$\Delta\beta$ :** Delta Beta, resta del promedio de los casos y los controles.

**DT2:** Diabetes tipo 2.

**$\Delta V$ :** Delt-Var, resta de la varianza de los casos y los controles.

**ERK:** signal-regulated protein kinase.

**ICG:** Isla CpG.

**JNK:** c-Jun N terminal kinase.

**KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad.

**ADNmt:** ADN mitocondrial.

**mADN:** metilación del ADN.

**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinases.

**MODY:** Maturity onset diabetes of the Young.

**mTOR:** Complejo sensible a rapamicina.

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido.

**ND6:** NADH deshidrogenasa 6.

**PGC1 $\alpha$ :** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha.

**POLG:** ADN polimerasa gamma.

**PPAR $\alpha$ :** peroxisome proliferator-activated receptors

**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno.

**ROS:** especies reactivas de oxígeno.

**SOD2:** superóxido dismutasa.

**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 inglés).

**tRNE:** mitochondrially encoded tRNA glutamic acid.

**UTR:** Untranslated Región.

## RESUMEN

La progresión de la arterosclerosis está asociada con cambios dinámicos en la metilación del ADN (mADN). En lo particular la mADN de CpGs específicos se correlaciona de manera positiva con la severidad de esta enfermedad. Funcionalmente, se sabe que el 25% de estos cambios están asociados con la activación de la beta-oxidación de ácidos grasos en la mitocondria por el factor de transcripción “peroxisome proliferator-activated receptors” (PPAR $\alpha$ ).

Para explorar más a fondo el papel de la mADN en la aterosclerosis se utilizó un enfoque estadístico novedoso que consiste en identificar CpGs diferencialmente variables en la mADN (CpGs-DVM). Este se ha implementado exitosamente en diversas cohortes, encontrado genes de alto riesgo para diversos tipos de cánceres, y nuevos genes asociados con enfermedades cardiovasculares como la diabetes tipo 1 y la obesidad. Se analizaron datos de microarreglos de mADN (450K de Illumina) de dos cohortes de aterosclerosis (individuos con aortas o carótidas con diferentes grados de severidad) y 4 cohortes de individuos discordantes para la resistencia a la insulina, obesidad y el tabaquismo. Dado la importancia de la mitocondria en los cambios en la mADN asociado con arterosclerosis, se analizó si existe diferencias en el número de copias de ADNmt entre aortas ateroscleróticas o no- ateroscleróticas, y si el número de copias de ADNmt se correlacionaba con CpGs-DVM específicos.

Se identificaron 6,469 y 522 CpGs-DVM en la cohorte de las aortas y carótidas respectivamente, y la mayoría de ellos estaban en regiones génicas. Los CpGs-DVM mostraron mayor variación en las aortas con placas y en las carótidas inestables respecto a sus controles más sanos (95 y 56% respectivamente), presentando enriquecimiento en vías distintas. En la cohorte de las aortas las vías más significativas fueron la señalización por MAPK y la infección del virus del Papiloma; ambas enriquecidas en CpGs-DVM hipometilados y localizados dentro y cuerpo del gen. De manera interesante, la vía de MAPK fue una de las vías de señalización con mayor enriquecimiento estadístico en los CpGs-DVM en comparación con los CpGs-DM. Alrededor del 28% de los genes asociados con CpGs-DVM en las aortas coincidían con las cohortes de las carótidas, resistencia a la insulina, obesidad y tabaquismo, y entre las vías enriquecidas estaba la señalización por MAPK y la infección del virus del papiloma. Respecto al número de copias de ANDmt, este resulto ser mayor en las arterias sanas respecto a las enfermas, sobre todo en las arterias con grado histológico VII ( $p=0.0096$  y  $p=0.0072$  respectivamente). Además, se identificaron 551 CpGs-DVM en la cohorte de las aortas que correlacionaban en su mayoría de manera negativa con el número de copias del ADNmt. La anotación funcional de estos reveló entre otras la vía de señalización por MAPK.

En conclusión, los datos muestran que varios CpGs-DVM en la aterosclerosis están asociados con la vía de señalización de MAPK, la cual también está asociada con el número de copias del ADNmt. El hecho que los CpGs-DVM asociados con esta vía tuvieran mayor enriquecimiento estadístico en el grupo de hipometilados y en el cuerpo de gen, sugiere menor expresión de esta vía en el tejido aterosclerótico.

## ABSTRACT

The progression of the atherosclerotic lesion is associated with dynamic changes in DNA methylation (DNAm). In particular, the DNAm state of specific CpGs sites is positively correlated with atherosclerosis severity. Functionally ~25% of those changes are associated with peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR $\alpha$ ) regulated mitochondrial the fatty acid oxidation.

To explore in more depth the role of DNAm in atherosclerosis, we applied a novel statistical approach that consists in identifying differential variable and methylated CpGs (CpGs-DVM). This method has been successfully implemented in various cohorts, found high risk genes for various types of cancers, and new genes associated with cardiovascular diseases such as type 1 diabetes and obesity. We analyzed DNAm microarray data (Illumina 450k) of two cohorts of atherosclerosis (individuals with aortas and carotids with different grades of severity) and 4 cohorts of individuals discordant for insulin resistance, obesity and smoking. Given the role of mitochondria in atherosclerosis-associated alterations in DNAm, we analyzed mitochondrial DNA copy number (mtDNAcp) in atherosclerotic or non-atherosclerotic aortas and probed for correlations between mtDNAcp was correlated with the CpGs-DVM.

A total of 6,469 and 522 CpGs-DVM were identified in the cohorts of aortas and carotids, respectively and the majority of those were associated with genic regions. CpGs-DVM showed greater variation in aortas with plaques and in carotids with the unstable plaques relative to their more healthy controls (95 and 56%, respectively) that were enriched in distinct pathways. In aortas' cohort the most significant pathways were MAPK signaling pathway and Papilloma virus infection; both enriched in hypomethylated CpGs-DVM located in gene bodies. Interestingly, the MAPK pathway was one of the signaling pathways that was more significantly enriched in CpGs-DVM compared to CpGs-DM. About 28% of the genes associated with CpGs-DVM in aortas overlapped with those identified in carotids, Insulin resistance, obesity and smoking cohorts and were enriched in MAPK signaling and Papilloma virus infection pathways. Regarding mtDNA copy number, that was increased in healthy relative to diseased arteries, especially in histologically grade VII arteries. Furthermore, 551 CpGs-DVM were identified in Aortas' cohort and enrichment analysis revealed among others, the MAPK signaling pathway.

In conclusion, many of CpGs-DVM in atherosclerosis are associated with the MAPK signaling pathway that also showed an association with mtDNAcp. The fact that the CpGs-DVM associated with this pathway are statistically more enriched in the hypomethylated group and in the gene bodies, suggest less expression of this pathway in atherosclerotic tissue.

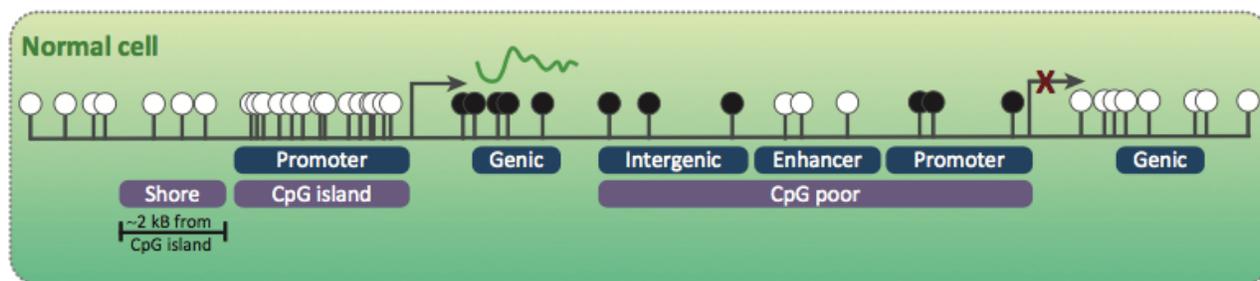
## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 La metilación del ADN y su asociación con la función mitocondrial.**

#### **1.1.1 Metilación del ADN y su distribución en el genoma**

Una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas es la metilación del quinto carbono de la citosina en el ADN (Portela y Esteller 2010). La metilación de ADN (mADN) es catalizada por una familia de enzimas de metiltransferasas de ADN: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L (Jones y Liang 2009). Las enzimas DNMT3A, DNMT3B DNMT3L se encargan de la metilación *de novo*, mientras que la DNMT1 conserva los patrones de la mADN ya establecidos después de la división celular. Por su parte la DNMT2 metila secuencias de tRNA (Jones y Liang 2009). En general la mADN es una marca represiva involucrada en la impronta genómica, la regulación de la transcripción, inactivación del cromosoma-X y para el silenciamiento de secuencias repetitivas promoviendo la estabilidad cromosomal (Kuan et al., 2017).

La mADN ocurre casi exclusivamente en el contexto del dinucleótido CpG en mamíferos, de los cuales se estima que existen 28 millones en todo el genoma (Portela y Esteller 2009; Stirzaker et al., 2010). Sin embargo, existen zonas del genoma con una alta densidad de CpGs llamadas islas de CpG (ICGs) que casi invariablemente no están metiladas (Portela y Esteller 2010) (Figura 1). Las ICGs se definen como regiones mayores a 200 pb con al menos 50% de contenido G+C y una proporción de al menos 0.6 del contexto CpG en comparación con la proporción esperada estadísticamente (Guardiola et al., 2015). En células normales, cerca del 60% de los genes promotores humanos están asociados con ICGs no metilados. Sin embargo, algunos de ellos (6%) se metilan de manera tejido-específica durante estadios tempranos del desarrollo embrionario (Portela y Esteller 2010). Asimismo, regiones genómicas a 2kb de distancia de las ICGs se hipermetilan en cáncer, un fenómeno que se asocia con represión de la transcripción (Stirzaker et al., 2010). Por otro lado, la mADN intragénica generalmente está asociada positivamente con la transcripción, excepto en el primer exón, donde esta asociación parece ser inversa (Brenet et al., 2011).



**Figura 1:** La distribución de la mADN en células normales. Las piruletas llenas y vacías indican CpGs metilados y no metilados, respectivamente (de Stirzaker et al., 2010). Promoter: Promotores, Shore: Playa, CpG Island: Isla CpG, Genic: región génica, Intergenic: región intergénica, enhancer: Potenciador, CpG poor: sitio pobre en CpGs. La línea curvada verde representa el mRNA.

### 1.1.2 La función mitocondrial y su relación con la mADN

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula de doble hélice circular de alrededor de 16 mil pares de bases que se encuentra anclada en la membrana interna de la mitocondria (Yu et al., 2013). La principal función de este organelo es generar energía en la forma de adenosina trifosfato (ATP), a través de la fosforilación oxidativa. Esto requiere la acción de cinco complejos de la cadena transportadora de electrones, los cuales son: el complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo bc1), complejo IV (citocromo-c oxidasa) y el complejo V (ATP sintasa) (Gu et al., 2013).

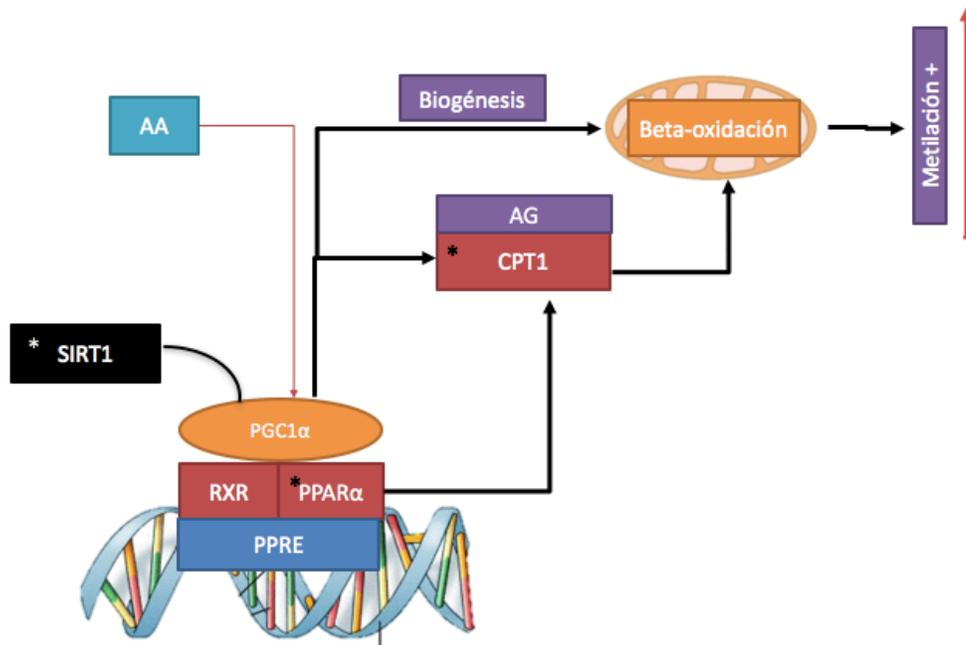
El ADNmt codifica específicamente para las subunidades de los complejos I, III y IV de la cadena transportadora de electrones, así como a la ATP sintasa del complejo V. Durante la respiración mitocondrial los electrones del complejo I y III pueden reaccionar con el oxígeno para formar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yu et al., 2013). Los ROS engloban los radicales libres como son el superóxido, el radical hidróxilo y el oxígeno singlete. En condiciones donde se propicia su exceso (como por ejemplo la aterosclerosis) estos radicales pueden causar estrés oxidativo induciendo daños en los lípidos, proteínas y el ADN (Zhang et al., 2016).

Uno de los mecanismos para regular los niveles de ROS en condiciones de estrés celular es por medio del “Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha” (PGC1 $\alpha$ ). Este gen estimula la biogénesis de mitocondrias y la activación de distintas enzimas para dismantelar los ROS (Austin y St Pierre 2012 Cantó y Aurwex 2009). Interesantemente, la expresión de PGC1 $\alpha$  es reducida en el tejido adiposo epicardial de pacientes diabéticos con enfermedad coronaria (Moreno-

Santos et al., 2016) y en el tejido adiposo y musculo esquelético de individuos con obesidad (Supruniuk et al., 2017). Además, estudios independientes mencionan que la diabetes tipo 2 (DT2) y la obesidad muestran una reducción en el número de copias (nc) de ADNmt (Xu et al., 2011, Lee et al., 2014). Por lo tanto, disrupción en la biogénesis de la ADNmt mediado por PGC1 $\alpha$ , en conjunto con una alta prevalencia de ROS, pueden ser indicadores de enfermedades cardiovasculares.

Un estudio reciente realizado en un cultivo de células de riñón con una mutación en la Polimerasa-gamma (POLG) dominante negativa mostro que la integridad de la mitocondria es vital para mantener los patrones de mADN de genes nucleares (Lozoya et al., en 2018). En particular, a medida que la mitocondria perdía su función, se alteran los patrones de transcripción y la producción de metabolitos relacionados con vías del metabolismo de varios aminoácidos, incluyendo el ciclo de la metionina. Inicialmente, los cambios transcripcionales se asociaron con un incremento en la mADN en regiones génicas y intergénicas, revirtiéndose esa hipermetilación cuando el ADNmt se degradaba en su totalidad (Lozoya et al., en 2018). En contraste, las alteraciones en la transcripción y en la mADN asociadas con la perdida de la función mitocondrial estaban ausentes si se mantenía la oxidación de NADH. Esta indica que la oxidación de NADH es vital para la regulación de la mADN (Lozoya et al., en 2018). Asimismo, se observó una mADN diferencial en el cerebro de cepas de ratones con genomas nucleares idénticos, pero con diferentes genomas mitocondriales (Vivian et al., 2017). Por lo tanto, existe evidencia directa entre la función mitocondrial y la mADN de genes nucleares (Lozoya et al., en 2018; Vivian et al., 2017). Esto implica que factores que influyan en la integridad de las mitocondrias, como por ejemplo los ROS (Yu et al., 2014, Yu et al., 2016), podrían ser modificadores indirectos de la mADN.

Se sabe también que la beta-oxidación mitocondrial de los ácidos grasos (AGs) es importante para inducir cambios en la mADN (Silva-Martínez et al., 2016). En lo particular, se evidenció que en células THP-1 estimuladas con el ácido araquidónico (AA; un AG con propiedades proinflamatorias y pro-aterogénicas), muestran un incremento de 10% en la mADN. Asimismo, al inhibir PPAR $\alpha$  o el “Carnitine Palmitoyltransferase 1A” (CPT1A) (un blanco de PPAR $\alpha$ ), a través del agonista GW6471 o etomoxir, respectivamente, la mADN inducida por el AA se abolía en su totalidad (Figura 2). Por su parte, la estimulación de fibroblastos embrionarios de ratón nulos en la Sirtuin 1 (Sirt1) con AA tenía un efecto similar reduciéndose el efecto hipermetilante en un 50% (Silva-Martinez et al., 2016). Sirt1 es una desacetilasa, y entre sus blancos esta PGC1 $\alpha$ , un coactivador de PPAR $\alpha$ . Todo lo anterior indica que el metabolismo lipídico puede afectar la mADN.



**Figura 2. Factores involucrados en la mADN inducido por el AA en células THP-1.** PPAR $\alpha$ , un factor de transcripción y su coactivador PGC1 $\alpha$  regulan genes en la vía de la beta-oxidación mitocondrial; \*indica proteínas que son necesarias para inducir un incremento en la mADN al estimular células con el AA (Silva-Martinez et al., 2016). AA=ácido araquidónico, AG=ácidos grasos; PPRE=Elemento de respuesta de PPAR (“PPAR response element”); RXR=Retinoico-x reinoico.

## 1.2 La función mitocondrial y la mADN en la aterosclerosis

### 1.2.1 Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria de la pared de las arterias medianas y largas, caracterizada inicialmente por la acumulación subendotelial de “células espumosas”; es decir macrófagos que fagocitan lipoproteínas, algunas de las cuales están oxidadas. Estos fenómenos resultan en una inflamación crónica y la aparición de una lesión fibrocelular compleja (ateroma o placa aterosclerótica), en la cual participan la infiltración de células del sistema inmunitario, proliferación y migración del músculo liso y la deposición de matriz extracelular (Aldons 2000; Benjamin et al., 2018; Kher y Marsh 2004). El ateroma es generalmente asintomático. Sin embargo, en una minoría

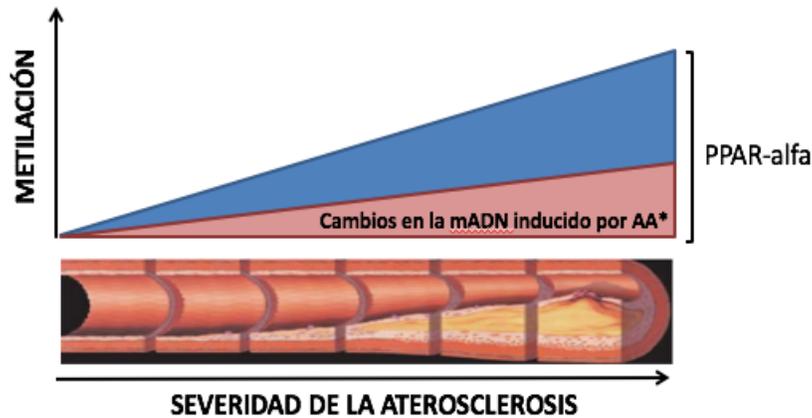
de individuos el ateroma se vuelve estructuralmente frágil y sufre ruptura. La subsecuente trombosis causa las complicaciones clínicas de la aterosclerosis, dependiendo de la localización anatómica del ateroma: infarto del miocardio, derrame cerebral y enfermedad vascular periférica (Aldons 2000; Benjamin et al., 2018; Kher y Marsh 2004). Las complicaciones clínicas de la aterosclerosis representan unas de las principales causas de muerte alrededor del mundo (Weber y Noels et al., 2010). De acuerdo con la American Heart Association existen 8 estadios histológicos de la aterosclerosis (Stary et al., 2000; Porwal et al., 2016):

- Estadio I: predominancia de células espumosas
- Estadio II: múltiples capas de células espumosas
- Estadio III: conjuntos de lípidos extracelulares sin un núcleo lipídico definido.
- Estadio IV: núcleo lipídico bien definido con una superficie luminal cubierta por íntima normal (fibroateroma)
- Estadio V: núcleo lipídico con una capa fibrosa con o sin calcificación.
- Estadio VI: fibroateroma con hematomas y trombosis
- Estadio VII: predominio de calcificaciones
- Estadio VIII: predominio de cambios en el tejido fibroso.

### **1.2.2 La mADN en la aterosclerosis**

Experimentos en modelo animales han demostrado que cambios en la mADN juegan un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, inclusive en etapas tempranas a esta, causando tanto hipermetilación como hipometilación en las aortas (Lund et al., 2004). Hablando específicamente en estudios en humanos, se sabe que la aterosclerosis presenta patrones aberrantes en la mADN; la placa aórtica estable (placa no pronta a ruptura) presenta una hipermetilación global del ADN en comparación con la porción normal de la misma aorta (Zaina et al., 2014). En contraste, en la aterosclerosis avanzada, las placas de las carótidas derivadas de individuos que sufrieron derrame cerebral muestran una hipometilación global del ADN (Zaina et al., 2015). También, existe una correlación entre la mADN de CpGs específicas y el grado histológico de la enfermedad (del III al VII), la mayoría mostrando una correlación positiva (Valencia-Morales et al., 2015). Además, la anotación funcional de los genes asociados con estos sitios reveló un enriquecimiento en la vía de

PPAR $\alpha$  (Figura 3). De manera interesante, ~25% de los CpGs que correlacionaron con severidad sobrelapaban con CpG metilados diferencialmente (CpGs-DM) en células estimulados con el AA.



**Figura 3 Cambios en la mADN en la aterosclerosis y su posible asociación con la función mitocondrial:** Alrededor del 25% de los CpGs que muestran un nivel de la mADN dependiente de la severidad de aterosclerosis sobrelapan con CpGs que cambian sus estados de la mADN en células THP-1 estimuladas con el AA. El análisis de enriquecimiento en los CpGs severodependientes mostró la presencia de la vía PPAR $\alpha$  (Silva et al., 2016; Valencia et al., 2015).

Lo anterior indica que la aterosclerótica está asociada con cambios en mADN que son tejido-específicas y que dependen del grado de severidad de la enfermedad. En particular, los cambios en el último están asociadas con procesos mitocondriales y con el metabolismo de los AGs. Sin embargo, la anotación funcional de los genes asociados con los CpGs-DM en aortas con placas estables comparada con aortas sin placas, no se encontraron vías asociadas con procesos mitocondriales (Zaina et al., 2014).

### 1.2.3 Función y disfunción mitocondrial en la aterosclerosis y/o sus factores de riesgo

Entre los factores de riesgo para la aterosclerosis que pueden causar daños en la mitocondria se conocen la dislipidemia, hipertensión, diabetes, el tabaquismo y la edad (Madamanchi y Runge 2007).

A continuación, se enlista evidencia que estas condiciones están asociadas con la integridad mitocondrial.

1. Dislipidemia: ratones nulos para la apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>), un factor importante en el reciclaje hepático de las lipoproteínas, son hiperlipidémicos y muestran daño mitocondrial antes de la aparición del ateroma (Yu et al., 2012). Asimismo, el grado del daño oxidativo se correlacionaba con la extensión de las placas ateroscleróticas (Stachura y Grzegorz-Pierzynowski 2009). También niveles elevados de la lipoproteína de baja densidad (LDL) están asociados con un mayor riesgo de aterosclerosis. La modificación oxidativa del LDL por los ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) producidos en la pared vascular y los macrófagos, resulta en un incremento en el estrés oxidativo y nitroxidativo. Estos inducen disfunción endotelial, promoviendo la adhesión leucocitaria, inflamación, trombosis, y la proliferación del músculo liso y factores que participan en la progresión del ateroma (Madamanchi y Runge 2007; Marín-García 2012, Marín-García et al., 2013, Dorighello et al., 2016).
2. Hipertensión: ratas hipertensas muestran deficiencias en la producción de ATP y anomalías en la absorción de calcio. Asimismo, ratones deficientes en el gen “superóxido dismutasa” SOD2 (encargado de la desactivación de los ROS), desarrollaron hipertensión al ser alimentados con una dieta alta en sal (Madamanchi y Runge 2007)
3. Diabetes mellitus: los ROS inhiben la señalización entre el receptor de la insulina y el transportador de glucosa, llevando a la RI. A su vez, la hiperglucemia induce la generación de ROS como el superóxido en células endoteliales. Esto interrumpe la cadena transportadora de electrones y la fosforilación en la mitocondria, resultando en la formación de peróxido y una ineficiente síntesis de ATP (Marín-García 2013).
4. El tabaquismo: el fumar induce daño endotelial, activación plaquetaria y oxidación del LDL que promueve la aterogénesis y daño en el ADNmt (Yu et al., 2012; Madamanchi y Runge 2007).
5. Edad: la teoría del envejecimiento mitocondrial propone que la producción de ROS, el daño al ADNmt, y el mal funcionamiento de la cadena respiratoria están ligados. Comprobando lo anterior, un modelo murino con una mutación puntual en POLG, mostró que se acumulaban mutaciones puntuales en el ADNmt con la edad. Además, ese modelo mostró declive en las

enzimas de la cadena respiratoria y en la producción de ATP. También, se observó que un suplemento de ROS inhibió la POLG a esos ratones mutantes (Madamanchi y Runge 2007)

6. Polimorfismos en el gen PGC1 $\alpha$  (Wu et al., 2016) están asociadas con enfermedades cardiovasculares y la DT2. Asimismo, en pacientes con DT2 se ha visto que la hipermetilación del promotor de PGC1 $\alpha$  tiene una asociación inversa con el número de copias del ADNmt en músculo esquelético (Barres et al., 2009). Por su parte, el número de copias del ADNmt se ha asociado directamente, o indirectamente, con patologías relacionadas a la aterosclerosis (Liu et al., 2017, Zhang et al., 2017).

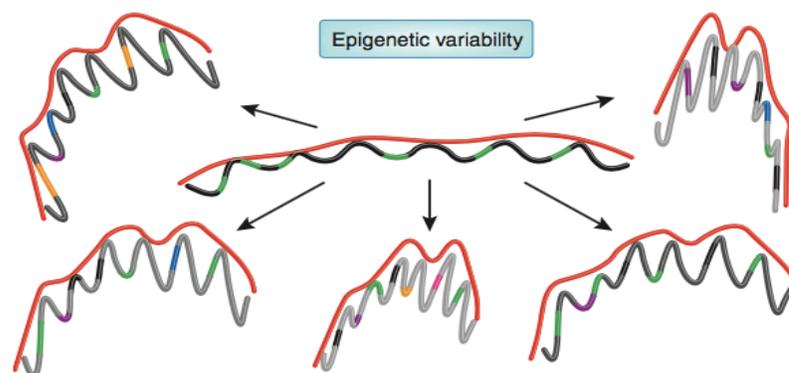
### **1.3 Análisis de la variación diferencial, ¿una alternativa para el análisis de microarreglos de metilación de aterosclerosis y sus factores de riesgo?**

Actualmente, el valor delta-beta ( $\Delta\beta$ ) – la diferencia en los valores promedios de la mADN de una muestra interés y su control - es el parámetro más usado para identificar CpGs que son diferencialmente metilados (CpGs-DM). Sin embargo, un nuevo enfoque estadístico basado en la búsqueda de CpGs diferencialmente variables en la mADN (CpGs-DVM) ha surgido como una alternativa para análisis los microarreglos de metilación. Este nuevo enfoque consiste en encontrar valores atípicos biológicos en la mADN por medio de pruebas de homogeneidad de varianzas, como el test de Bartlett (Teschendorff et al., 2016). Este enfoque ha sido implementado con éxito en enfermedades selectas como el cáncer cervicouterino (Teschendorff et al., 2012) y el de mama (Teschendorff et al., 2016). En estos ejemplos, encontraron CpGs-DVM asociados con genes (gCpGs-DV) en tejido aparentemente sano, el cual posteriormente se volvió neoplásico, manteniéndose estas marcas una vez que el tumor se había consolidado.

El razonamiento del uso de este método se basa en la hipótesis que la selección natural favorece a las secuencias genéticas que promueven la variación en condiciones donde la selección es constante y está presente el suficiente periodo; ejemplos de lo anterior, pueden ser el cáncer de piel causado por la radiación UV constante, o el cáncer de hígado por el virus de la hepatitis B (Feinberg, 2014). Asimismo, entre los factores que también pueden causar variación epigenética a través del tiempo está el envejecimiento (Figura 4), causando cambios de expresión en genes que pudieran causar diversas neoplasias o fomentar la progresión de la lesión aterosclerótica (Issa, 2011). Por su parte, enfermedades como la obesidad, la hipertensión arterial, la dislipidemia, la diabetes mellitus

promueven un envejecimiento acelerado en el tejido vascular fomentando la aterosclerosis (Barton et al., 2016; Frasca et al., 2017). Entonces con lo anterior, se puede pensar que la variación epigenética puede ser un factor contribuyente en la etiología de las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis.

Hasta la fecha, existen dos estudios donde se ha aplicado el enfoque de buscar CpGs-DVM en enfermedades cardiovasculares., ambos con el enfoque de casos y controles. El primero se encontró gCpGs-DVM implicados en la obesidad, diabetes, cáncer de mama en una población afroamericana con obesidad (Xu et al., 2013). El segundo, identificó CpGs-DVM entre gemelos discordantes de Diabetes mellitus tipo 1 (Paul et al., 2016). Estos CpGs-DVM estaban enriquecidos en elementos regulatorios, vías implicadas en el metabolismo de las células inmunes y el ciclo celular (Paul et al., 2016). Por lo tanto, la identificación de CpGs-DVM puede ser una alternativa y/o complemento del enfoque de buscar CpGs-DM en aterosclerosis y condiciones que predisponen para esta enfermedad. Dado el papel importante de la función mitocondrial en la mADN, se tiene la hipótesis que CpGs-DVM en la aterosclerosis (y en condiciones asociadas con esta) están asociadas con genes relevantes para la función mitocondrial.



**Figura 4: Variación epigenética:** Durante la diferenciación, un compartimiento de ADN (molécula central) asociado con la lámina nuclear (hilo rojo) presenta metilación variable (verde), que puede ser alterada en condiciones como el envejecimiento o el cáncer (las moléculas de alrededor). Cambios en la mADN incluyen la pérdida o ganancias en diferentes regiones (diferentes colores). Esta inestabilidad crea un mosaísmo epigenético que promueve la selección Darwiniana a nivel de tejido (Issa 2011).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótesis**

Existen CpGs-DVM en la aterosclerosis y en condiciones predispuestas a la misma que están asociados con procesos mitocondriales

### **2.2 Objetivo General**

Identificar CpGs-DVM en la aterosclerosis humana y a sus factores de riesgo, así como sus posibles asociaciones con procesos mitocondriales.

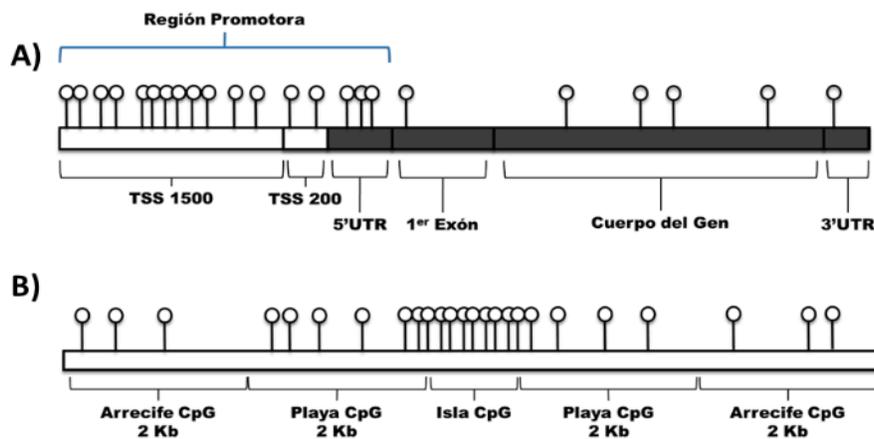
### **2.3 Objetivos específicos**

- 1) Identificar CpGs-DVM y realizar el análisis funcional en dos cohortes de aterosclerosis.
- 2) Comparar los resultados del análisis funcional de gCpGs-DVM y gCpGs-DM.
- 3) Realiza un análisis comparativo entre la cohorte de las aortas y las cohortes de la resistencia a la insulina, obesidad y tabaquismo,
- 4) Determinar el número de copias del ADNmt en arterias sanas y enfermas,
- 5) Determinar si existe una correlación entre el número de copias del ADNmt y CpGs-DVM o DM.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3. 1 Análisis de datos provenientes de microarreglos de mADN.

Para identificar los CpGs-DVM en la aterosclerosis y enfermedades consideradas factores de riesgo para esta, se usaron datos previamente publicados y generados en la plataforma 450K de Illumina. Esa plataforma analiza alrededor 450,000 sitios CpG en todo el genoma. Cada CpG está clasificado respecto a su posición génica (promotor, 5'UTR, primer exón, cuerpo del gen y 3'UTR) y de acuerdo a las ICGs (playas, arrecifes y el mar abierto) (Figura 5). Las playas, arrecifes y mar abierto se definen como regiones localizadas a 2kb, 4kb y > 4kb de las ICGs, respectivamente (Rechadache et al., 2012).



**Figura 5.** La anotación de los sitios CpG en el microarreglo 450K respecto: A) la región génica o B) ICGs (Silva, 2017).

Se analizaron los siguientes datos de microarreglos de 450K:

- 1) Número de acceso **GSE46394**: Una cohorte de 15 individuos con aterosclerosis asintomática; es decir con una placa estable (Tabla suplementaria 1). Para cada individuo se analizó la mADN de una parte de la aorta con o sin placa, siendo un estudio pareado.
- 2) Número de acceso **GSE66500**: Una cohorte de 38 individuos que fueron sometidos a la endarterectomía; 19 de manera preventiva (asintomáticos) y 19 porque sufrieron un evento cerebrovascular. Para cada individuo se analizó la placa de la carótida.
- 3) Número de acceso **GSE53045**: Una cohorte de 111 mujeres afroamericanas discordantes para fumar (50 y 61 fumadoras y no fumadoras, respectivamente). En promedio, las fumadoras fumaban

de 5 a 7 cigarrillos al día, mientras que los controles eran no fumadoras. Para cada individuo se analizó el tejido sanguíneo.

4) Número de acceso **GSE76398**: Una cohorte de mujeres con obesidad sin o con RI según los parámetros de la prueba HOMA IR. Se analizó tejidos sanguíneos para 40 casos y 40 controles y el tejido omental para 38 casos y 40 controles.

5) Número de acceso **GSE88940**: Una cohorte 20 mujeres adolescentes discordantes para obesidad (10 con y 10 sin obesidad). Se consideró como obesidad los individuos ubicados en el percentil 95th, (según lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud). Para cada individuo se analizó el tejido adiposo visceral.

Para los datos de la plataforma 450K, se calcularon los valores Beta ( $\beta$ ), con la fórmula  $\beta = M/(M+N+1)$ , donde M es el valor de la intensidad de fluorescencia del metilado y N el valor de la intensidad de fluorescencia del no metilado. Una vez obtenidos los valores  $\beta$ , las matrices se procesaron con el paquete de R CHAMP® versión 2.6.4 (Morris et al., 2014). Se usó la función `champ.filter` con los parámetros predeterminados y un valor de detección de valor de  $p > 0.05$ , si una sonda pasaba este umbral, significa que la detección de señal de la hibridación de la sonda del arreglo fue deficiente, por lo tanto el software lo remueve del análisis. También esta función remueve SNPs, alineamientos erróneos y los cromosomas sexuales. Después se usó la función `champ.impute` con los parámetros predeterminados, para eliminar CpGs que tengan un valor de NA superior al 20%, y se usó la función `champ.norm` de igual manera con los parámetros por defecto, para normalizar los valores beta con el método BMIQ. Este último paso es necesario debido a que el arreglo tiene dos tipos de sondas: las sondas tipo I y tipo II, las cuales tienen distribuciones ligeramente distintas por el tipo de identificación de la mADN; las sondas tipo I usan dos tipos de subsondas tanto para el alelo metilado como no el metilado, siendo la extensión de bases la misma para ambos alelos, por su parte las sondas tipo II del arreglo usan solo una sonda para ambos alelos, y la extensión depende del estado de metilación del ADN genómico a hibridar. La principal función de la normalización BMIQ es ajustar los valores beta de ambos tipos de sondas, para que sean estadísticamente comprables (Dedeurwaerder et al., 2014).

Una vez corregidos los posibles sesgos de la matriz, se transformaron los valores  $\beta$  a M-values, la cual es una transformación logit, realizada con la fórmula:  $M\text{-value} = \log_2(\beta_i/1 - \Delta\beta_i)$ . Los valores M tienen una mayor robustez y validez al realizar los análisis estadísticos (Du et al., 2010). Para identificar los CpGs-DVM se utilizó el algoritmo IEVORA, el cual está disponible como un script

ejecútatele de R en el material suplementario de la publicación de Teschendorff y colaboradores (2016) (<https://www.nature.com/articles/ncomms10478>), aceptando un FDR<0.05. El algoritmo está basado en la prueba de Bartlett, corregida por medio de los q-values (FDR, “False Discovery Rate,” por sus siglas en ingles), regularizado por una prueba t de student con un valor de p sin corregir <0.05. Para cada CpGs-DVM, se calculó el  $\Delta\beta$  promediando los valores de los casos (enfermos), restándolo del promedio de los valores de los controles. Una  $\Delta\beta$  positiva o negativa significa una hipermetilación en los enfermos o los controles respectivamente. Se calculó también el  $\Delta V$  que es la resta de la varianza de los enfermos y los sanos en cada CpGs-DVM.

Para la creación de dendogramas y mapas de calor con los valores  $\beta$  e las cohortes de Aortas y carótidas se usó el paquete de R `gloplots`® versión 3.0.1(Warnes 2009) con la función `heatmap.2` utilizando el algoritmo `complete` y la distancia euclidiana. Los mismos parámetros se utilizaron para crear el mapa de calor de los genes en común con la aterosclerosis y las otras cohortes analizadas usando los valores del Delta-Beta. Se realizó la anotación funcional usando la biblioteca KEGG con el paquete de R `ClusterProfiler` versión 1.9, el cual permite realizar comparaciones múltiples con varios grupos (Yu et al., 2012b), se usaron los parámetros por defecto, aceptando un FDR menor a 0.05.

Por último, para el análisis de metilación diferencial se utilizó el método estándar de la prueba t de student, filtrando los CpGs de acuerdo con la corrección de Bonferroni, aceptando valores de  $p = 1.0 \times 10^{-7}$  (Zaina et al., 2014). La matriz utilizada para este análisis es la misma matriz depurada por el paquete CHAMP, que se utilizó para el análisis de variación diferencial de igual manera.

### **3.2 Determinación semicuantitativa del número de copias de ADN mitocondrial**

Se cuantificó el número de copias de ADNmt según el protocolo de Rooney et al., 2016. El protocolo consiste en la amplificación por PCR de un fragmento del genoma mitocondrial de 221pb (que va desde la posición 14,620 a la 14,841) que incluye un fragmento del gen ND6 (presente en el complejo I de la cadena transportadora respiratoria), un tRNE (ARN de transferencia) y un fragmento del CYTB (presente en el complejo III de la cadena respiratoria). Se realizó el PCR utilizando 15ng de ADN genómico, 5 $\mu$ l de 10x PCR Buffer, 1.5  $\mu$ l de CLMg2, 1  $\mu$ l de los primers forward y reverse, respectivamente, 1  $\mu$ l de dNTPs y 0.2 $\mu$ l de Taq polimerasa, completando el resto con agua para alcanzar los 50 $\mu$ l por reacción. El programa de amplificación por PCR fue: 95°C por 2 minutos, 94°C

por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, con una extensión final de 5 minutos a 72°C por un total de 18 ciclos. Para asegurar que las condiciones de PCR representaban la fase exponencial, se verificó que una muestra diluida en un 50% (alrededor de 7.5 ng) presentará una reducción del 50% del producto de PCR respecto a la muestra sin diluir. Los productos de PCR fueron cuantificados con SYBR Green I de la siguiente manera: primero se realizó una “working-solution” de SYBRGreen® (1µl diluido en 99 µl de 1x TE; TE=10mM Tris, 1mM EDTA, pH=8). Posteriormente se mezcló 0.5 µl de “working-solution” con 2.5 µl del producto de PCR y 22 µl de TE y se cuantificó la fluorescencia usando el fluorómetro “Infinite M1000” en las instalaciones de la Unidad Genómica Avanzada (UGA) (excitación de 480nm y una emisión de 520nm). A los valores arbitrarios de fluorescencia obtenidos se le resta el control con solo TE. Se realizaron dos replicas técnicas, se transformaron los valores en logaritmo y se promediaron. Entonces una vez con los datos promediados y con una distribución normal (según la prueba de Kolmogorov Smirnov), se compararon las medias usando el estadístico t de Student pareado.

### **3.3 Correlaciones entre el número de copias de ADNmt y los CpGs-DVM**

Se usó el coeficiente de Pearson para la correlación de los datos del número de copias del ADNmt y los M-Values de los CpGs-DVM.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificación de los CpGs Diferencialmente Variables (CpGs-DVM)

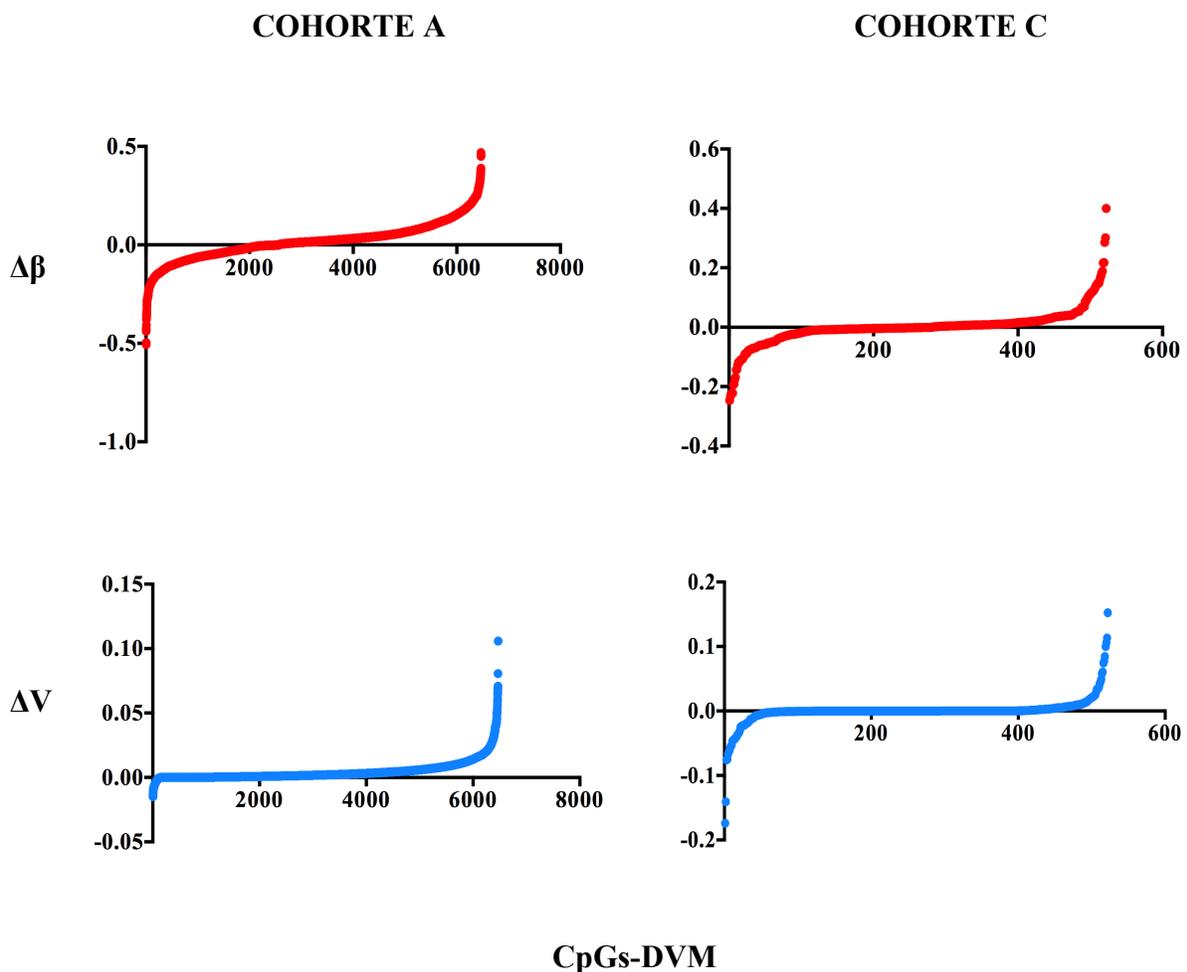
Para identificar los CpGs-DVM se analizaron microarreglos 450K derivados de dos cohortes de individuos con placas ateroscleróticas en la aorta o en la carótida. En la cohorte de las aortas se analizaron regiones con o sin placa asintomáticas; es decir una aorta con placa estable o sin placas de un total de 15 individuos con grados de severidad histológico del III al VII. En la cohorte de las carótidas se analizaron placas inestables e inestables derivadas de 38 individuos diferentes que fueron sometidos a la endarterectomía; 19 de manera preventiva (placa estable) y 19 porque sufrieron un evento cerebrovascular (placa inestable).

Tomando en cuenta un  $FDR < 0.05$ , se identificaron 6,469 y 522 CpGs-DVM en la cohorte de las aortas y carótidas respectivamente. Además, observamos que a pesar de ser el enriquecimiento significativo según la prueba hipergeométrica ( $p < 0.05$ ), la mayoría de los genes con CpGs-DVM fueron específicos para cada cohorte ya que solo el 26% de los genes encontrados en las carótidas con placas inestables coincidían con los obtenidos en la cohorte de las Aortas con placas estables (107/406 de los genes únicos en las carótidas). En ambos casos, la mayoría de los CpGs eran CpGs-DVM con genes (gCpGs-DVM), siendo el porcentaje de estos de 71% y 80 % en aortas y carótidas respectivamente. En promedio se encontró 2 y 1 CpGs-DVM por gen resultando en 3,261 y 367 gCpGs-DVM únicos en la cohorte de las aortas y carótidas respectivamente. Respecto a la distribución génica de se pudo notar mayor número de los CpGs-DVM en las regiones promotoras y en el cuerpo del gen en comparación con otras regiones, tanto en las aortas como en las carótidas (Tabla 1). Sin embargo, ambas distribuciones no fueron estadísticamente significativas en comparación con la distribución de sondas esperada del microarreglo 450K ( $p = 0.892$ ,  $p = 0.549$  respectivamente).

**Tabla 1:** Número de gCpGs-DVM respecto a la región génica. Cohorte A: Aortas con placa estable, Cohorte C: Aortas con Placa inestable.

Grupo	gCpGs-DVM			
	Cohorte A		Cohorte C	
	Todos	Genes Únicos	Todos	Genes Únicos
<b>Promotores</b>	1,253	1,077	187	183
<b>5'UTR</b>	523	417	51	51
<b>Primer exón</b>	267	243	22	22
<b>Cuerpo del gen</b>	2,353	1,667	144	139
<b>3'UTR</b>	257	228	16	16

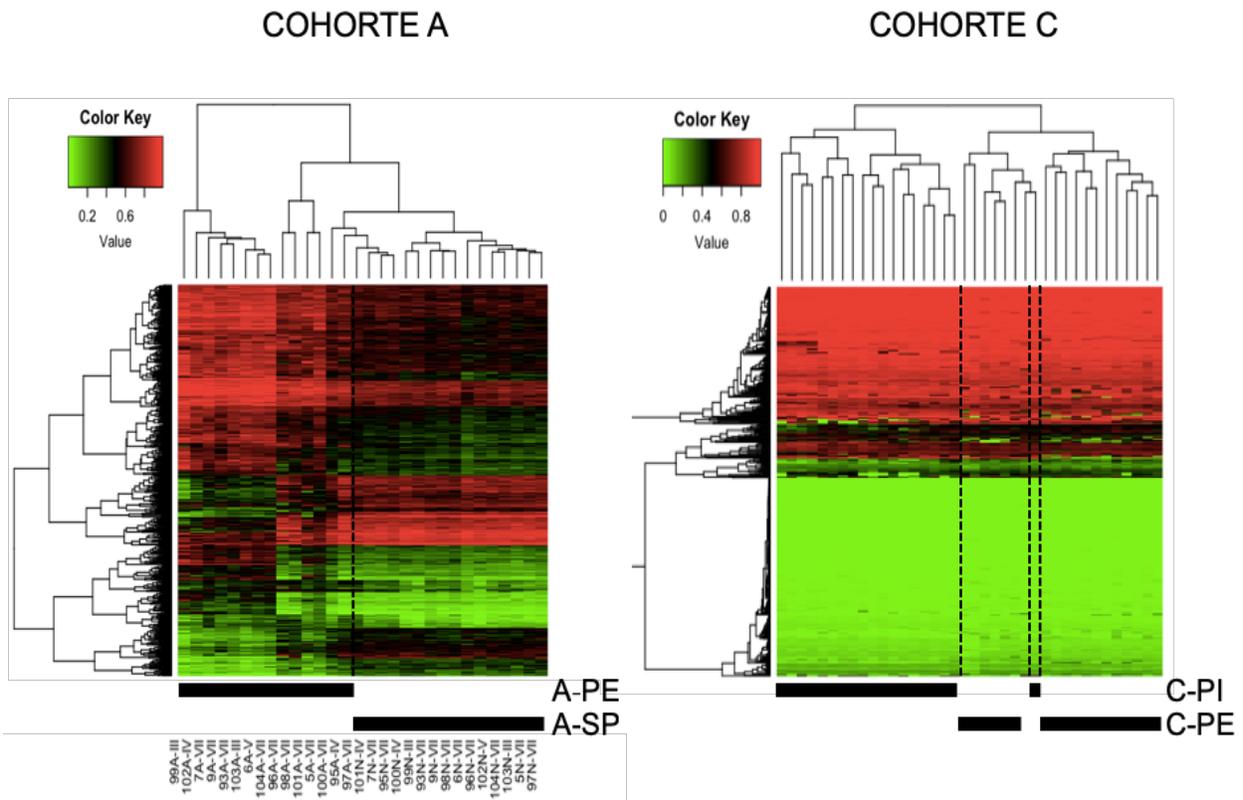
Para determinar la dirección de cambio y de la varianza de la mADN, se calculó el valor  $\Delta\beta$  y  $\Delta$  varianza ( $\Delta V$ ) de la siguiente manera: en la cohorte de las aortas entre las porciones con placa estable y sin placa, y en la cohorte de las carótidas entre las placas estables e inestables. Una  $\Delta\beta$  y  $\Delta V$  positiva significa hipermetilación y más variabilidad de la mADN, respectivamente, en las aortas con placa estable o las carótidas con placa inestable. Se observó que la mayoría de los CpGs-DVM en la cohorte de las aortas tuvieron un valor de  $\Delta\beta$  positivo mientras que la tenencia fue opuesta en la cohorte de las carótidas (69 y 54%, respectivamente) (Figura 6). Por otro lado,  $\Delta V$  fue positiva en ambas cohortes (95 y 56%, respectivamente). También observamos que los valores de  $\Delta\beta$  son mayores en la cohorte de las aortas mientras que el  $\Delta V$  fue mayor en la cohorte de las carótidas.



**Figura 6:** Comportamiento del  $\Delta\beta$  y  $\Delta V$  en la cohorte A (cohorte de las aortas) y C (cohorte de las carótidas): Cada punto rojo y azul representa el valor de  $\Delta\beta$  y  $\Delta V$ , respectivamente, de CpGs-DVM. Eje y:  $\Delta\beta$  o  $\Delta V$ , Eje x: CpGs-DVM.

Estos resultados indican que los tejidos ateroscleróticos tienden a mostrar mayor variabilidad en la mADN respecto a los tejidos no ateroscleróticos. El mayor número de CpGs-DVM en la aorta respecto a la carótida podría ser por mayor heterogeneidad celular en la comparación de las aortas con placa estable con las aortas sin placa respecto a las carótidas con placa inestable contra las carótidas con placa estable. Sin embargo, comparando las arterias de las aortas con placa estable y las carótidas con placa estable de personas con estadios ateroscleróticos parecidos (estadio VII) (es decir entre células de las aortas y carótidas con placas severas), encontramos 12,170 CpGs-DVM entre las aortas y carótidas con placa estable. Sin embargo, la mayoría de ellos (84%) variaban en las carótidas. Esto indica que la heterogeneidad celular por sí sola no explica el incremento de CpGs-DVMs en la cohorte de las aortas con respecto a la de las carótidas.

Dado que la cohorte de las aortas incluye porciones de tejido con estadios de severidad del III al VII, nos preguntamos si los CpGs-DVM muestran cambios en la mADN durante el desarrollo de la aterosclerosis. Para este fin se realizó un dendrograma usando los valores beta de cada CpGs-DVM de ambas cohortes (Figura 7). Observamos que en las aortas hubo una clara separación entre aortas sin placa y con placa, notándose mayores niveles de metilación en las aortas enfermas. Por su parte en la cohorte las carótidas, el análisis de agrupamiento también se ve en su mayoría una separación entre las placas estables e inestables (con excepción de una muestra de las placas inestables, la cual se agrupó con las placas estables). Se pudo notar que tanto las placas estables e inestables tienen niveles de metilación parecidos.



**Figura 7: Dendrograma de valores de  $\beta$  de CpGs-DVM de las cohortes de las aortas y carótidas.** Para fines ilustrativos se usaron 1490/6,469 CpGs-DVM que tuvieron un  $\Delta\beta$  igual a  $\pm 0.10$  en la cohorte de las aortas; en la cohorte de las carótidas se usaron todos los 522 CpGs-DVM. Cohorte A: cohorte las aortas estables y sin placas, Cohorte C: cohorte de carótidas estables e inestables. A-PE, aortas con placas estables; A-SP, aortas sin placas; C-PE y C-PI, carótidas con placas estables e inestables, respectivamente; los números romanos en a) indican el grado de severidad de la enfermedad (III-VII); los colores rojo y verde indican hipermetilación e hipometilación, respectivamente.

En conjunto, los datos indican que la mayoría de las CpGs-DVM son tejido-específicas y están las asociadas con regiones génicas, sobre todo en el cuerpo del gen y regiones promotoras. Además, las CpGs-DVM en las aortas con placa estable tenían mayores niveles de la mADN y varían más respecto a las aortas sin placa. Al contrario, CpGs-DVM asociadas con las carótidas con placa inestable estaban más hipometiladas y mostraron mayor variación en la mADN respecto a las carótidas con placa estable.

## 4.2 Análisis funcional.

Generalmente la mADN en la región promotora, 5'UTR y primer exón está asociada con silenciamiento génico, mientras que la mADN en el cuerpo del gen está asociado con la expresión. Por esta razón optamos por realizar el análisis funcional de gCpGs-DVM según su estado de metilación o localización génica. Analizamos los siguientes 6 grupos de gCpGs-DVM: 1) Todos los genes; 2) Hipermetilados,  $\Delta\beta+$ ; 3) Hipometilados,  $\Delta\beta-$ ; Región Promotora, incluyendo también las regiones 5utr y primer exón; 5) Cuerpo del gen; 6) 3'UTR. Se utilizó el software ClusterProfiler que permite realizar comparaciones múltiples entre las primeras cinco vías más significativas de cada grupo y visualizar cuales convergen entre sí.

El análisis funcional mostro que la mayoría de las vías enriquecidas fueron cohortes-específicas (Figura 8). En la cohorte de las aortas se obtuvieron 15 vías enriquecidas en el grupo de todos los genes, entre las más importantes están la señalización de MAPK y la infección del virus del papiloma. Por otro lado, en la cohorte de las carótidas se obtuvo enriquecimiento en 4 vías en el grupo de todos los genes, figurando entre estas la senescencia celular y la adhesión focal. Solo la vía “focal adhesión” (adhesión focal) se encontró en común entre las dos cohortes.

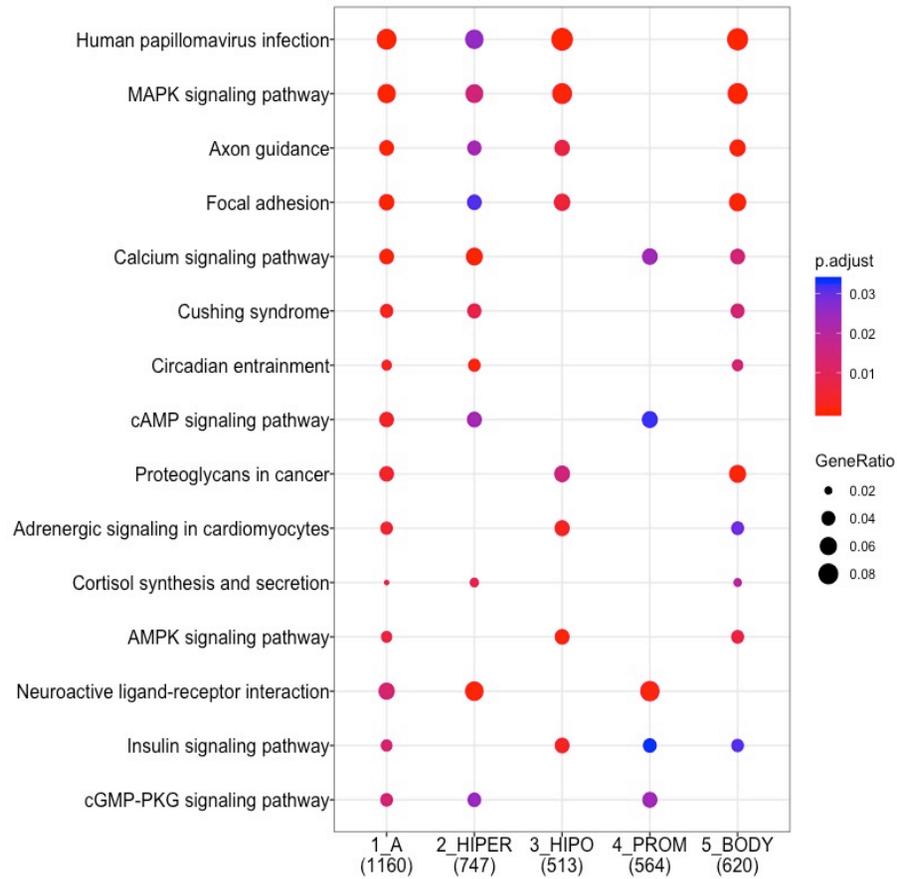
En la cohorte de las aortas, 54 y 46% de las vías identificadas tuvieron una mayor orientación y enriquecimiento estadístico en los grupos hipometilados e hipermetilados, respectivamente. En ambos casos, la mayoría de estos estaban también enriquecidos en el grupo del cuerpo del gen (100 y 57% de los grupos hipometilados e hipermetilados, respectivamente). Las excepciones fueron las vías de interacción neuractiva del ligando-receptor (“neuroactive ligand-receptor interaction”) y la señalización de cAMP, las cuales estaban enriquecidas únicamente en la región promotora. Las vías enriquecidas comunes en el grupo hipermetilados y cuerpo del gen podrían estar expresadas. Estas incluyen las vías de señalización de calcio (“calcium signaling”), el síndrome de Cushing (“Cushing síndrome”), el arrastre circadiano (“circadian entrainment”), síntesis y secreción del cortisol (“cortisol synthesis and secretion”). De la misma manera, la vía de señalización de la insulina podría estar activa ya que está enriquecida en los grupos hipometilados, promotores y cuerpo del gen. A la inversa, las demás vías con mayor enriquecimiento estadístico en los grupos hipometilados y cuerpo del gen podrían estar silenciadas. Estas incluyeron a MAPK, AMPK, la adhesión focal (“focal adhesión”), la señalización adrenérgica de los cardiomiocitos (“Adrenergic signaling in cardiomyocytes”) (Figura 8a).

Por su parte, muchas de las vías identificadas en la cohorte de las carótidas resultaron grupo-

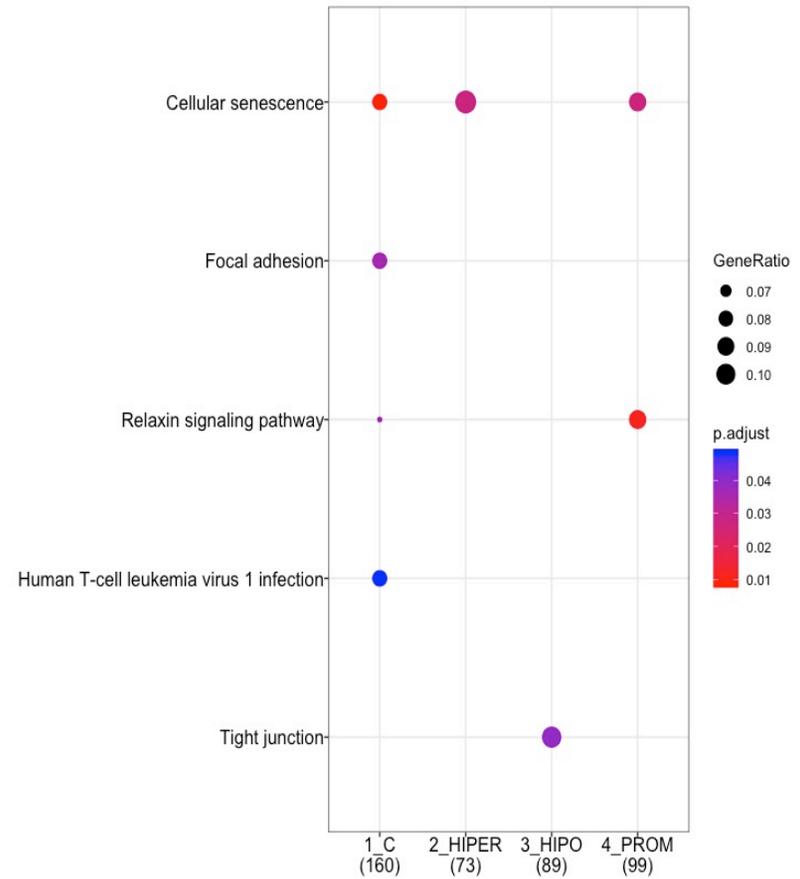
específicas, salvo una excepción, siendo esta la vía senescencia celular (“celular senescence”), la cual se encontró tanto en la región promotora como en el grupo de hipermetilados, indicando que podría estar silenciada.

Por lo tanto, de lo anterior se puede concluir que gCpGs-DVM en aortas y carótidas están asociadas con vías de señalización distintas. También se recalca que los gCpGs-DVM las aortas con placa estable mostraron vías enriquecidas mayormente localizadas en el cuerpo del gen, mientras que las carótidas con placa inestable hay pocos enriquecimientos, la mayoría grupo-específicos como fue el caso de la adhesión focal, la unión estrecha (“Tight junction”) y el virus de la leucemia humana en las células T tipo 1 (“Human T leukemia virus 1 infection”).

a)



b)



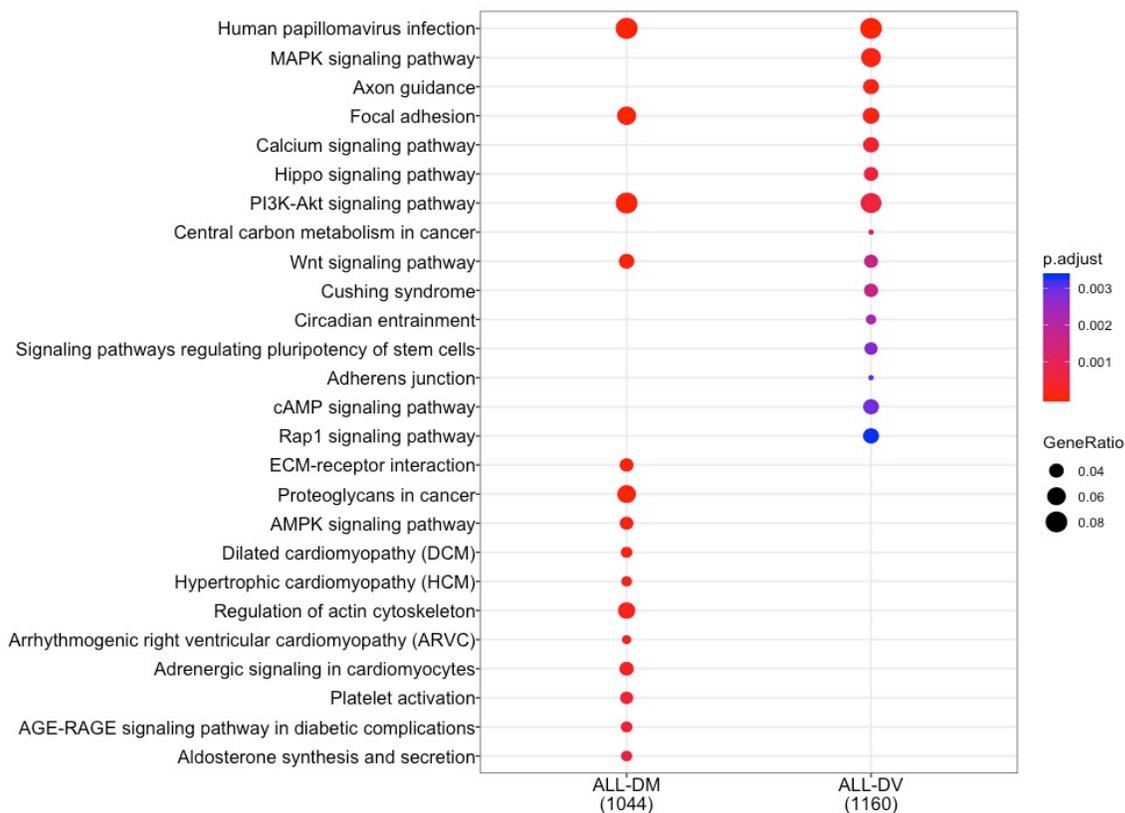
**Figura 8:** Análisis en vías KEGG de gCpGs-DVM en las cohortes de las aortas y carótidas de acuerdo al estado de la mADN y la localización génica de los gCpGs-DVM; a) Cohorte de las aortas; b) Cohorte de las carótidas; HIPER: hipermetilado, HIPO: hipometilado, PROM: región promotora, 5UTR y del primer exón, BODY: cuerpo del gen, p.adjust: p ajustada (FDR). Los números debajo de cada grupo indican el número gCpG-DVM (input) para el análisis KEGG. El color de los puntos representa el FDR (p.adjust), mientras más cercano a rojo o azul mayor o menor significancia estadística respectivamente. GeneRatio: Relación entre el número de genes del set de datos y el número de genes totales de la vía, a mayor GeneRatio mayor será tamaño del punto.

### 4.3 Análisis funcional de CpGs-DVM y CpGs-DM

Para identificar los CpG-DM, se usó el estadístico t de student con la corrección de Bonferroni (método estándar para el análisis de metilación diferencial). En este análisis se obtuvieron 6,598 CpGs-DM, de los cuales el 69% eran gCpGs-DM. De estos 2,872 fueron genes únicos y 33% (956/2,872) de ellos coincidían con gCpGs-DVM. Se realizó el análisis funcional usando los siguientes grupos: 1) Todos los gCpGs-DVM o DM), 2) genes específicos en los CpGs-DVM o DM) y genes comunes entre los gCpGs DVM y DM.

Se obtuvieron 13 y 11 vías representadas para el enfoque DVM y DM en el grupo de todos los gCpGs, respectivamente (Figura suplementaria 1) figurando en ambos las vías de MAPK, AMPK, y la adhesión focal, entre otras. Las vías del metabolismo central del cáncer, la vía neuroactiva del receptor ligando, y las “Vías de señalización reguladoras de la pluripotencia de las células madre” fueron exclusivas del enfoque DVM, encontrándose de igual manera en el grupo de genes específicos en los gCpGs DVM. Por su parte en los genes específicos de los gCpGs DM se obtuvo 6 vías estadísticamente significativas relacionadas a procesos como los Proteoglicanos en Cáncer, cardiopatías, la infección del virus del papiloma, entre otras. En cuanto a los genes comunes entre los gCpGs DM y DVM, se obtuvieron 14 vías, la mayoría de estos en el grupo todos los gCpGs-DVM o DM.

Para visualizar las vías prioritarias de cada grupo por ClusterProfiler, se repitió el análisis funcional desactivando la función que busca enriquecimientos comunes entre las vías obtenidas de cada grupo. Las vías de la infección por el virus de papiloma, adhesión focal, señalización de PI3K-AKT y la señalización de Wnt siguen coincidiendo con el enfoque DM y DVM. Sin embargo, la mayoría de las vías encontradas eran diferentes indicando que cada método arroja información distinta (Figura 9). Entre las vías más significativas entre los CpGs-DVM se encontraban la vía del virus de papiloma ( $3.1569e-06$  con 92 genes de los 339 totales de la vía), y la vía de señalización de MAPK ( $6.5777e-05$ , con 78 genes de los 295 totales de la vía). En conclusión, ambos métodos estadísticos arrojan vías muy parecidas, pero priorizan vías distintas cuando se seleccionan las 15 más significativas.



**Figura 9:** Comparación de las primeras 15 de vías KEGG más significativas obtenidas en los CpGs DM y los CpGs DVM. ALL-DM: todos los gCpGs-DM, ALL-DV: todos los gCpGs-DVM. El color de los puntos representa el FDR (p.adjust), mientras más cercano a rojo o azul mayor o menor significancia estadística respectivamente. GeneRatio: Relación entre el número de genes del set de datos y el número de genes totales de la vía, a mayor GeneRatio mayor será tamaño del punto.

#### 4.4 Análisis comparativo entre CpGs-DVM en la aterosclerosis y sus factores de riesgo

Con el fin de contestar la pregunta si los CpGs-DVM en la aterosclerosis estaban presentes en individuos que tenían factores de riesgo asociadas a ésta, se analizaron datos de 450K de cohortes representativos de obesidad, tabaquismo y RI. En la Tabla 2 se muestran el número de CpGs-DVM obtenidos en cada cohorte, el  $\Delta\beta$ ,  $\Delta V$ , así como el número de gCpGs-DVM que coincidían con la cohorte de las aortas. Respecto al  $\Delta\beta$ , solo la cohorte de tabaquismo mostro la misma tendencia observada en la cohorte d las aortas (Tabla 2 y Figura suplementaria 2), mientras que las demás cohortes mostraron una marcada  $\Delta\beta$  negativa. Por su parte, como se observó en las cohortes de las aortas y carótidas la  $\Delta V$  era positiva en todas las cohortes; la excepción fue la cohorte de la Resistencia

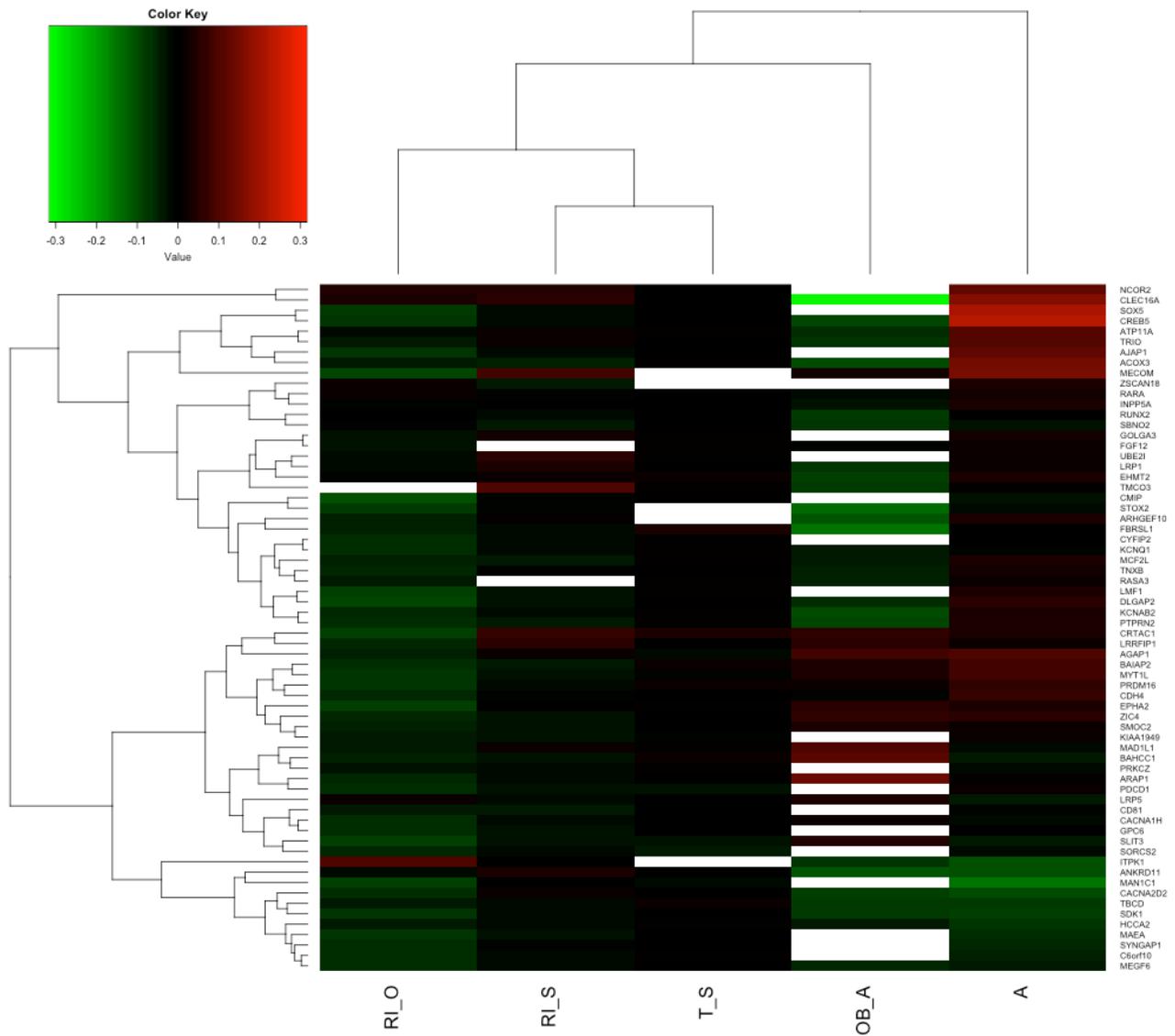
en la insulina (tejido omental). La coincidencia de los gCpGs-DVM de cada cohorte con la cohorte de las aortas fue de 25 a 34% y fueron significativos según la prueba hipergeométrica.

**Tabla 2:** CpGs-DVM de cada cohorte.

Cohorte	Todos	$\Delta\beta$ +/- (%)	$\Delta V$ +/- (%)	En genes únicos	Genes en común con A/ Genes totales de cada cohorte
<b>Obesidad</b>	797	41/59	85/15	523	180/523*
<b>RI Sangre</b>	6935	18/82	51/49	3827	973/3827*
<b>RI Omental</b>	9004	14/86	74/26	4016	1110/4016*
<b>Tabaco</b>	7104	75/25	68/32	4310	1075/4310*

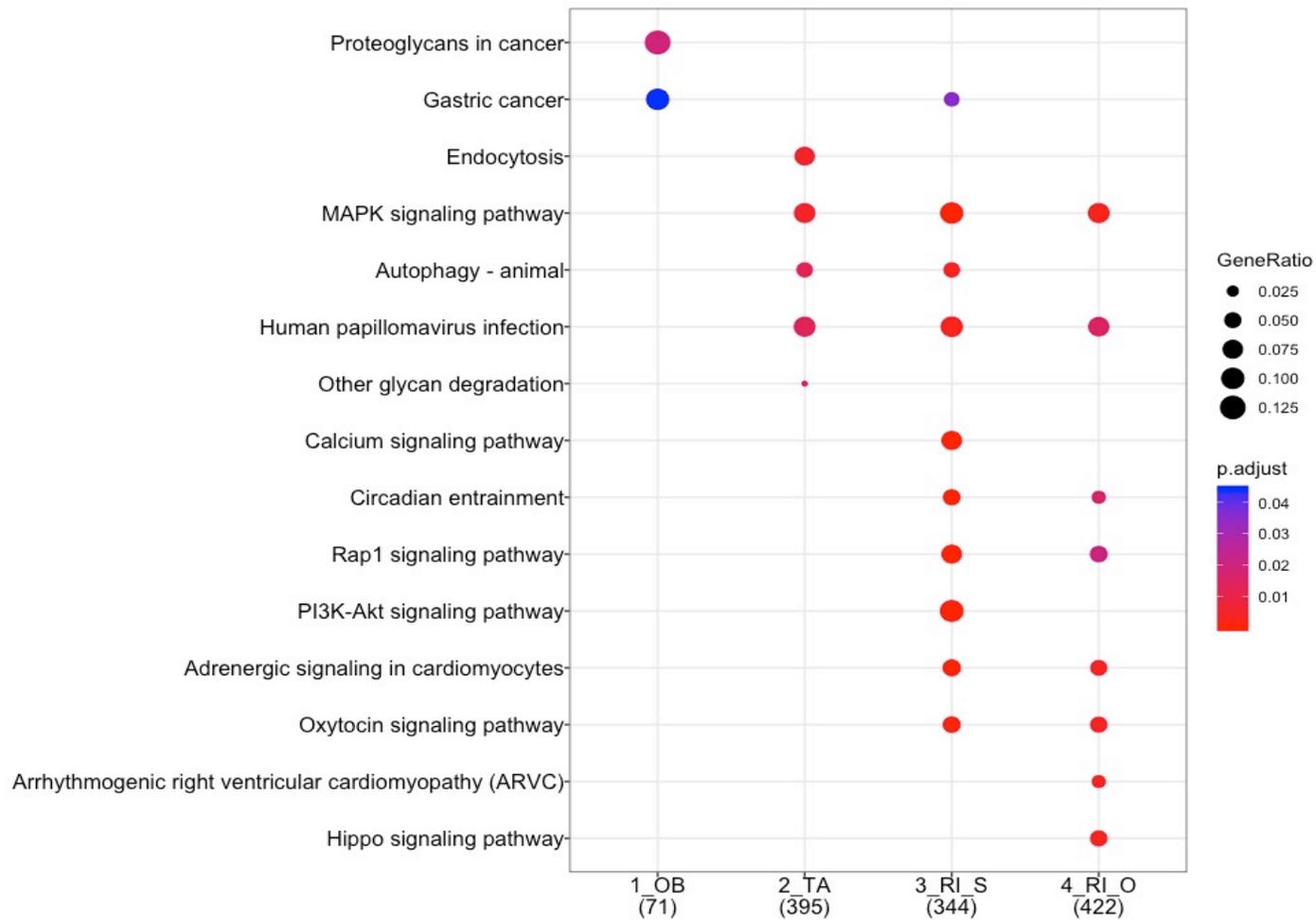
\*;  $p < 0.05$  según la prueba hipergeométrica de enriquecimiento. A: cohorte de las aortas.

Posteriormente, se hizo una dendrograma de los niveles de la mADN de las CpG-DVM de las 4 cohortes tomando como referencia la cohorte de las aortas (Figura 10). Se usaron un total de 67 gCpG-DVM cuyo criterio de selección fue que al menos estén compartidos en 4 de las 6 cohortes analizadas. La cohorte de las aortas fue el grupo más alejado del dendrograma, seguido por el de obesidad. Las cohortes de la resistencia a la insulina (en tejido omental y en sangre) se agruparon cercanamente, siendo la mayoría de los genes en común con una marcada hipometilación. Por lo tanto, se pudo concluir que la mayoría de las cohortes tienen diferentes patrones de mADN respecto a la cohorte de las aortas. El grupo de tabaquismo se agrupó más cerca de la resistencia a insulina a pesar de que el primero tiene una marcada hipermetilación. Esto puede ser debido a que ambos son del mismo tejido (sanguíneo).



**Figura 10: Mapa de calor donde se muestra los perfiles de mADN de los gCpGs-DVM de cada cohorte.** Se usó el promedio del  $\Delta\beta$  de gCpGs-DVM, los gCpGs-DVM del cohorte A fueron la referencia. A: cohorte de aortas estables e inestables, RI\_O (resistencia a la insulina en el tejido omental), RI\_S (resistencia a la insulina en sangre), T\_S (tabaquismo en tejido sanguíneo), OB\_S, obesidad en tejido adiposo.

Finalmente, se hizo un análisis de anotación funcional utilizando los genes en común entre cada cohorte y la cohorte de las aortas (5 grupos en total). Se obtuvieron 18 vías significativas (Figura 11). Entre las vías más significativas y con mayor enriquecimiento de genes (geneRatio) esta la señalización de MAPK y la infección del virus del papiloma. También se pudo notar que hubo más congruencia entre las cohortes de RI y tabaquismo.

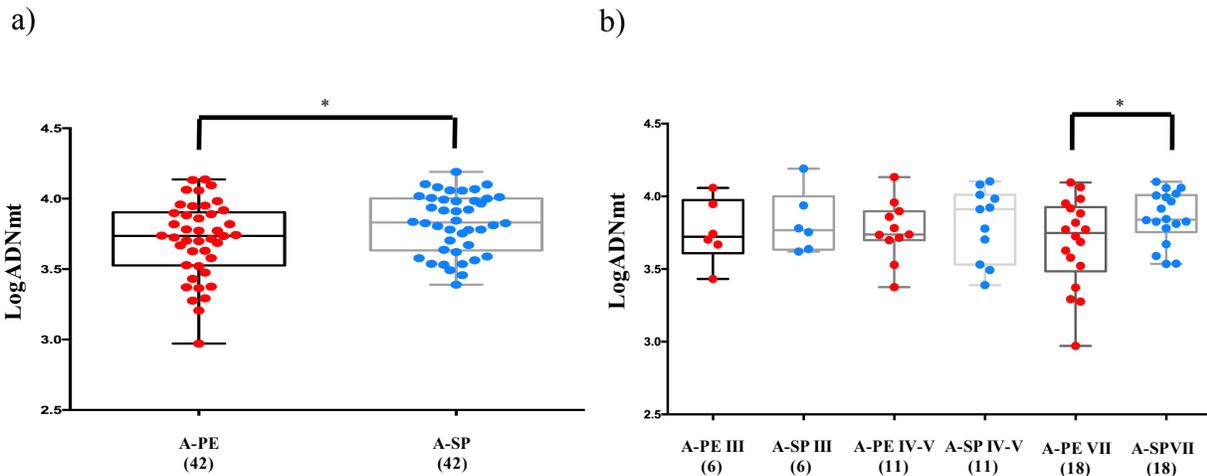


**Figura 11:** Comparación de los enriquecimientos funcionales KEGG entre los gCpGs-DVM común entre la cohorte de las aortas y los demás cohortes. OB, obesidad, TA: tabaquismo, RI\_S: resistencia a la insulina en sangre, RI\_O: resistencia a la insulina en el tejido Omental, p.adjust: p ajustada (FDR). Los números debajo de cada grupo indican los genes que entraron en el análisis KEGG, en cada grupo del análisis. El color de los puntos representa el FDR (p.adjust), mientras más cercano a rojo o azul mayor o menor significancia estadística respectivamente. GeneRatio: Relación entre el número de genes del set de datos y el número de genes totales de la vía, a mayor GeneRatio mayor será tamaño del punto

## 4.5 Asociación entre número de copias de ADN mitocondrial y CpGs-DVM

Dado nuestra hipótesis, que la variación en la mADN podría estar asociada a procesos mitocondriales, se realizó primero un ensayo de número de copias de ADNmt en los individuos de la cohorte de las aortas. En total se analizaron las aortas con placa y sin placa de 42 individuos. Los valores de fluorescencia y su transformación logarítmica están en la Tabla suplementaria 2.

El valor promedio del número de copias del ADNmt fue significativamente mayor en las aortas sin placas respecto a las aortas con placas estables (3.8 contra 3.7,  $p < 0.0096$ , respectivamente) (Figura 12a). Estratificando de acuerdo con el grado de severidad histológico, se obtuvo únicamente una diferencia significativa entre las aortas con placas estables de grado histológico VII en comparación con las aortas sin placas de las mismas (3.7 y 3.9 respectivamente,  $p = 0.0072$ ) (Figura 12b).



**Figura 12:** El número de copias del ADNmt en AE y SP: **a)** todas las muestras **b)** muestras estratificadas de acuerdo al grado de severidad; roja=A-PE, azul=A-SP;., números romanos indican la severidad de la aterosclerosis, \* $p < 0.05$ . Los números en paréntesis indican el número de muestras utilizadas en cada grupo. AE: Aorta con placa estable, A-SP: Aorta sin placa.

Posteriormente, se analizó si existe una correlación entre el número de copias de ADNmt con los M-values de cada CpG-DVM identificado en la cohorte de las aortas. Si bien no se obtuvieron correlaciones significativas ( $FDR < 0.05$ ), se obtuvieron un total de 136 CpGs-DVM en las aortas con placa estable y 415 en las aortas sin placas que se correlacionaron con el número de copias del ADNmt con una asociación nominal ( $p < 0.05$ ). De estos la mayoría eran gCpGs-DVM (84 y 66%, respectivamente). Interesantemente, tanto en las aortas sin placas como en las aortas con placa estable, la mayoría de los CpGs-DVM tuvo una R negativa con el número de copias del ADNmt (84 y 66%, respectivamente), indicando una asociación inversa entre ambas variables. Al realizar su la anotación

funcional no se observó ningún enriquecimiento significativo (FDR<0.05). Sin embargo, entre las vías con una asociación nominal ( $p<0.05$ ), en las aortas sin placas se encontró la señalización de MAPK y la adhesión focal, entre otras. Por otro lado, en las aortas con placa estable se encontró enriquecimiento en las vías de la regulación de la longevidad, la señalización de mTOR, la diabetes de la edad madura que se presenta en el joven (MODY, “Maturity onset diabetes of the Young”), asimismo se pudo notar que en tanto aortas con placas estables y sin placa se encontró la vía de la resistencia a la insulina (Tabla 3).

**Tabla 3:** Anotación funcional de gCpGs-DVM que correlacionan con número de copias del ADNmt en A-SP y A-PE

A-SP				
ID	Vía	gCpGs-DVM	Genes totales <sup>+</sup>	P.val
hsa04931	Insulin resistance	7	107	0.0008
hsa04010	MAPK signaling pathway	10	295	0.0100
hsa04510	Focal adhesion	7	199	0.0248
hsa05203	Viral carcinogenesis	7	201	0.0261
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	4	79	0.0271
A-PE				
ID	Vía	gCpGs-DVM	Genes totales	P.val
hsa04931	Insulin resistance	4	107	0.0022
hsa04213	Longevity regulating pathway	3	62	0.0040
hsa04150	mTOR signaling pathway	4	151	0.0076
hsa05165	Human Papillomavirus infection	6	339	0.0077
hsa04950	Maturity onset diabetes of the young (MODY)	2	26	0.0079

ID: Número de identificación único para una vía KEGG, P.val = valor de P, +=Nota: numero asociados con la vía KEGG, Genes totale., el número de genes conforman la vía KEGG en su totalidad. A-SP: Aortas sin placas, A-PE: Aortas con placa estable,

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 La mADN de CpGs-DVM en la aterosclerosis y condiciones que predispone a esta.

El análisis de IEVORA reveló que existen CpGs-DVM asociados con la aterosclerosis y la mayoría de estos (69%) presentaba hipermetilación en las aortas con placas. Esto concuerda con un análisis previo donde se encontró que el 91% de los CpGs-DM estaban hipermetilados en las aortas con placa aterogénica (Zaina et al., 2014). Por otro lado, en la cohorte de las carótidas la mayoría de los CpGs-DVM (54%) tenían una orientación a la hipometilación en placas inestables comparado con placas estables. De cierta manera esto concuerda con un estudio anterior donde se pudo observar una hipometilación marcada en los individuos días después de someterse a la endarterectomía (Zaina et al., 2014). Esto indicaría que los CpGs-DVM tienen un comportamiento dinámico dependiendo si la lesión es estable o inestable, parecido a lo reportado con los CpGs-DM.

En las cuatro cohortes seleccionadas como factores de riesgo de la aterosclerosis (obesidad, tabaquismo y RI en sangre y tejido normal), existían gCpGs-DVM compartidos entre ellos. Sin embargo, la mADN de los gCpGs-DVM asociada con cada enfermedad eran muy diferente con respecto a la cohorte de las aortas. Los CpGs-DVM de las cohortes de la resistencia a la insulina y obesidad tuvieron una marcada tendencia a estar hipometilados. Esto es parecido a un estudio de CpGs-DM en tejido hepático de personas obesas discordantes por DT2, donde el 92% de los sitios CpGs estaban hipometilados (Kirchner et al., 2016). Esto contrasta con otro estudio donde la mayoría de los CpGs-DVM en la obesidad estaban hipermetilados (Xu et al., 2013). Sin embargo, en este mismo estudio los CpGs-DM tuvieron una caracterizada hipometilación. Entonces se puede inferir que tanto en patologías relacionadas con alteraciones en la señalización de insulina como obesidad se caracterizan mayormente por una hipometilación, indicando que estos perfiles son independientes si son CpGs-DVM o CpGs-DM. Por último, en la cohorte de tabaquismo la mayoría de los sitios CpGs-DVM estuvieron hipermetilados. Esto contrasta con los datos de CpG-DMs obtenidos por Dogan y colaboradores (2014) donde la proporción de CpGs-DM hiper-hipometilados era aproximadamente igual (49% y 51% respectivamente). Esto podría indicar que los CpGs-DVM en tabaquismo tienen un perfil de metilación hacia la hipermetilación, sin embargo, se tendría que analizar otra cohorte con este enfoque para corroborar este resultado. Interesantemente el perfil del tabaco fue parecido al de la aterosclerosis en el sentido que ambos presentan hipermetilación, pudiendo indicar la estrecha relación de ambas morbilidades, no obstante, al realizar el mapa de calor se encontró más cercano al

tejido sanguíneo de la resistencia a la insulina, sin embargo esto pudo ser debido a que ambos eran cohortes donde se usó el tejido sanguíneo.

En cuanto a la variación en la mADN, tanto en la aterosclerosis, como en la mayoría las cohortes asociadas con condiciones que predisponen a ésta, se detectó mayor variación en los tejidos enfermos respecto a los sanos. Esto concuerda con un estudio de cáncer donde la varianza en la mADN era mayor en los tejidos enfermos (Teschendorff y Widschwendter 2016). Sugiriendo que algunos CpGs con variación epigenética podrían conferir un posible riesgo a desarrollar estas enfermedades.

## **5.2 Análisis de enriquecimiento**

El análisis funcional de los gCpGs-DVM mostró que las vías enriquecidas en las cohortes de las aortas y las carótidas eran distintas. En ambas cohortes se encontró enriquecimiento en procesos involucrados en la homeostasis y biogénesis de este organelo, destacando en las carótidas la vía de la senescencia celular (Wiley et al., 2015) y en las aortas las vías de la regulación de la insulina (Marín-García 2007), AMPK y MAPK (Canto y Aurwex 2009; Barger et al., 2001), las cuales se discutirán a continuación.

La senescencia celular es un proceso observado en lesiones avanzadas, como sería el caso de las carótidas analizadas en este trabajo. Se sabe que en las placas avanzadas hay bajos niveles de la relación NAD<sup>+</sup>/NADH (vital para la formación de ATP en la cadena respiratoria), debido a la deficiente función mitocondrial (Wiley et al., 2015), impidiendo procesos como la proliferación celular. Esta vía al estar enriquecida en los grupos de hipermetilados y promotores, podría indicar un posible silenciamiento, pudiendo ser un factor protector. Interesantemente Zaina y colaboradores (2015), visualizo que días después del infarto cerebral, se observó demetilación de genes ateroprotectores.

También es interesante la presencia de la señalización de insulina ya que en condiciones donde hay hiperglucemia (como la Resistencia a la Insulina y la diabetes) se asocian con la creación de superóxido en las células endoteliales, interrumpiendo la fosforilación oxidativa y promoviendo la aterosclerosis (Marín-García 2013). Esta vía estaba enriquecida en el grupo de hipometilados, la región promotora y el cuerpo de los genes, indicando que podría estar activa, pudiendo ser esto último un mecanismo protector para la mantener la homeóstasis e impedir el avance de la lesión aterosclerótica,

respaldando lo anterior, se sabe que en modelos murinos ApoE<sup>-/-</sup> nulos también en el gen receptor de la insulina, se vio un aumento del ateroma en las aortas (Rask-Madsen et al., 2010).

Con respecto a la vía de AMPK, se sabe que este gen fosforila directamente a PGC-1 alfa, aumentando su actividad transcripcional (Canto y Aurwex 2009), si bien en los CpGs DV no se obtuvieron directamente los genes AMPK y PGC1-alfa, se obtuvo representado el gen CPT1, el cual es activado por PGC1-alfa y podría estar implicado en la homeostasis mitocondrial a través de la activación de la beta-oxidación (Zaina y Lund 2017). Por lo tanto, al estar la vía AMPK en el grupo de hipometilado y en el cuerpo del gen, una parte de la vía podría estar silenciada, entorpeciendo posiblemente procesos como biogénesis mitocondrial.

Tal vez uno de los hallazgos más importantes de este trabajo, es el enriquecimiento en la vía de señalización de MAPK, la cuál fue la segunda vía con más significancia en la agrupación de todos los genes en la cohorte de las aortas ( $p= 6.57775e-05$ , 78 genes). Las MAPKs regulan funciones celulares esenciales como la proliferación, diferenciación y apoptosis, y estas se dividen en tres grupos: las p38 (MAPK11-14), las “c-Jun N terminal kinase” (JNK 1-3) y las “signal-regulated protein kinase” (ERK1, ERK2) (Roux y Blenix, 2004; Wang et al., 2012).

Esta vía podría estar involucrada en procesos asociados con la biogénesis mitocondrial y el metabolismo de los lípidos, debido a que se tiene evidencia que la MAPK-p38 puede fosforilar PPAR $\alpha$  en un cultivo de cardiomiocitos neonatales de ratón (Barger et al., 2001). De igual manera en esta misma investigación se visualizó que PGC1 $\alpha$  en conjunto con la MAPK-p38 promueve un aumento en la expresión de PPAR $\alpha$ . Por otra parte, nuestros estudios muestran que la beta-oxidación inducida por la activación de CPT1 a través de PPAR $\alpha$  resulta en niveles elevados de la mADN sobre todo dentro el cuerpo de los genes (Silva-Martinez et al., 2016). Asimismo, otro experimento posterior demostró que la hipermetilación en células THP-1 mediada por el ácido araquidónico, disminuía si se inhibían MAPK p38 y JNK de manera independiente (de la Rocha et al., artículo sometido).

Si bien, en la cohorte de las aortas no se obtuvo directamente los genes MAPKp38 (MAPK11), y JNK (MAPK8), se encontraron entre los gCpG-DVM genes que probablemente están relacionados o tienen interacción con estos, como son CPT1A, ERK2(MAPK1) y MAPK10(JNK3). CPT1A, como se mencionó, es una enzima activada por PPAR $\alpha$ , el cual lleva los ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria (Lund y Zaina 2017). Por su parte, se sabe que ERK2 al ser estimulado con insulina en hepatocitos de ratón, se notó un incremento en la fosforilación y actividad de PPAR $\alpha$  (Burns y Vanden-Heuvel 2007). Por otro lado, JNK3(MAPK10) es una isoforma de JNK, el cual es activado

en las células neuronales del hipotálamo cuando hay una alta ingesta de grasas, evitando el exceso de adiposidad y la resistencia a la insulina a través del control de la ingesta calórica mediado por la leptina (Solinas y Becattini 2017).

Dado que nuestros datos muestran que la vía de MAPK tiene mayor enriquecimiento estadístico en el grupo de hipometilados y en el cuerpo del gen, esto podría indicar que una parte considerable de esta vía está menos activa en la aterosclerosis, pudiendo entorpecer la fosforilación de PPAR $\alpha$ , la biogénesis mitocondrial, entre otras funciones. Interesantemente esta vía también estuvo presente en las dos cohortes de RI y en la de tabaco, indicando que puede estar alterada en estas patologías, pudiendo estar asociada con el desarrollo de la placa aterogénica en el contexto de estas morbilidades.

### **5.3 Comparación entre el método de metilación diferencial y variación diferencial.**

Se pudo observar que en las 15 vías con mayor significancia estadística en el enfoque DVM y DM se priorizan vías distintas; por ejemplo, se encontró que MAPK era una de las con mayor significancia estadística en los CpGs-DVM, mientras que estaba en la posición 54 en los CpGs-DM. Esto es relevante en el sentido que, en los EWAS, generalmente se reportan las primeras 10-20 vías obtenidas, por lo tanto el uso de los dos métodos puede ser útil para brindar detectar vías relevantes, conclusión similar a la de Xiu y colaboradores(2012), los cuales en un estudio de obesidad observaron que el estadístico DVM y DM tenían distintos enriquecimientos en las primeras 10 vías. No obstante, se tiene que resaltar que en la aterosclerosis la mayoría de las vías obtenidas en los dos enfoques tendieron a ser bastante similares en el análisis comparativo de ClusterProfiler (como se muestra en la Figura suplementaria 1), indicando que ambos métodos al final brindan información parecida en el contexto de la enfermedad.

Sin embargo, se destaca que alrededor de del 70% de los gCpGs-DVM fueron exclusivos del enfoque DVM. Si bien en la anotación funcional de estos gCpGs solo se obtuvieron 3 vías que pasaron el FDR, relacionadas con procesos como el metabolismo del cáncer, la pluripotencia celular y procesos neuronales, es notable mencionar que entre las vías con una tendencia estadística ( $p < 0.1$  datos no mostrados), encontramos factores de riesgo de la aterosclerosis como la diabetes MODY, así como la vía de señalización de MAPK. Nótese que la vía de MAPK y la señalización de la insulina, al incluir todos los gCpGs-DVM, aumentaron su significancia estadística siendo representadas en los

análisis funcionales. Lo anterior indicaría que estos genes podrían ser relevantes para el desarrollo de la placa aterosclerótica.

También es importante mencionar que en el contexto del cáncer el estadístico DVM ha demostrado sensibilidad en la detección de CpGs estadísticamente significativos que su contraparte en DM, en tejidos aparentemente sanos que se volvieron patogénicos, permaneciendo estas marcas una vez establecido el tumor (Teschendorff y Widschwendter 2016). Por lo tanto, para comprobar si los CpGs-DVM podrían tener un valor predictivo para el riesgo de padecer la aterosclerosis, sería interesante realizar un análisis comparando una porción de aorta de individuos sin aterosclerosis contra las porciones “sanas” de individuos con aterosclerosis. Se destaca que este análisis no fue realizado en este trabajo, al no encontrarse datos de metilación públicos en aortas sanas de individuos que no presentaran la enfermedad.

#### **5.4 Número de copias de ADNmt y su asociación con CpGs-DVM**

Las arterias sanas tuvieron mayor número de copias de ADNmt que las arterias enfermas de manera global, obteniendo algo similar estratificado este resultado en las arterias grado VII. Estos resultados son parecidos a un otro estudio donde los leucocitos de individuos con enfermedad coronaria tenían menor número de copias ADNmt en comparación con los controles (Liu et al., 2017). De la misma manera, otro análisis mostró una asociación inversa entre el número de copias ADNmt en sangre y el riesgo de muerte cardíaca súbita (Zhang et al., 2017). Por lo tanto, el número de copias del ADNmt puede ser un posible marcador que podría indicar la presencia de enfermedades coronarias.

En cuanto a los CpGs-DVM que mostraban una correlación con el número de copias de ADNmt, en su anotación funcional se encontraron las vías de señalización de la resistencia a la insulina tanto en las aortas con placa estable y sin placa, pudiendo reflejar la estrecha relación de esta vía con la mitocondria como se ha mencionado anteriormente. Por otro lado, la vía de MAPK se encontró representada en las aortas sin placas, mientras que las vías de la regulación de la longevidad en las aortas con placa estable. Llama la atención la presencia de estas dos vías, debido a que el envejecimiento se asocia como un factor de riesgo de la aterosclerosis con un subsecuente daño mitocondrial (Madamanchi y Runge 2007), y la vía de MAPK, discutida previamente, la cual podría estar asociada con la regulación de genes de la beta-oxidación mitocondrial (Barger et al., 2001).

Por último, encontramos una correlación inversa entre el número de copias de ADNmt y la mADN de los CpGs-DVM. Dado que en las aortas con placa estable la mayoría de los CpGs-DVM están hipermetilados y que el número de copias de ADNmt era menor respecto a las aortas sin placas, lo anterior podría indicar una asociación de ambos parámetros como el estudio de Lozoya y colaboradores (2018) ha sugerido, que cambios en la integridad del mtADN podría causar alteraciones en el mADN. Sin embargo, esta conclusión tiene que comprobarse en un estudio futuro, ya que las asociaciones fueron nominales.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 6.1 Conclusiones

- En casi todas las cohortes, el  $\Delta V$  resultó positivo, independientemente de la orientación de la mADN. Esto indicaría que la variación en la mADN podrían indicar un posible riesgo para desarrollar estas enfermedades.
- En la anotación funcional de los gCpGs-DVM se destaca la presencia de la vía de MPAK, la cual podría estar implicada en la regulación de la biogénesis mitocondrial, a partir de la fosforilación de PPAR-alfa. Al tener mayor significancia estadística en el grupo hipometilados en el cuerpo del gen, indicaría que gran parte de la vía esta silenciada, impidiendo posiblemente funciones como la biogénesis mitocondria.
- MAPK también estuvo representada en patologías como la resistencia a la insulina y el tabaco, pudiendo tener un papel relevante en el desarrollo de la placa aterosclerótica, en el contexto de estos factores de riesgo.
- En la anotación funcional de los genes obtenidos en los enfoques DVM y DM, se puede notar que priorizan vías distintas, sin embargo, ambos métodos proveen información bastante parecida al realizar un análisis comparativo.
- Interesantemente se encontró que el 70% de los genes encontrados en los CpGs-DVM fueron exclusivos, los cuales nominalmente están asociados con vías asociadas con la señalización de insulina y MAPK, las cuales posteriormente adquirieron mayor significancia estadística al usar todos los genes obtenidos. Esto pudiera destacar la relevancia de estos genes en el desarrollo de la placa aterosclerótica. Indicando que ambos métodos encuentran blancos distintos posiblemente pudiendo ser entonces complementarios.
- El número de copias de ADNmt resulto ser mayor en las arterias sanas en comparación con las enfermas lo cual indicaría que la homeostasis mitocondrial está comprometida en la aterosclerosis, pudiendo ser un marcador molecular para enfermedades coronarias.
- Existe una correlación negativa entre el número de copias de ADNmt y los CpGs-DVM tanto en las aortas con placas y sin placas, sugiriendo un mecanismo en el cual cambios en la integridad del ADNmt podría causar alteraciones en la mADN.

- Interesantemente la vía de MAPK también salió nominalmente significativa en la correlación del ADNmt con los CpGs-DVM en las aortas sin placas, recalcando la asociación de esta vía con los procesos mitocondriales.

## 6.2 Perspectivas

- Realizar un análisis de expresión diferencial de RNA a escala global (e.g. RNA-Seq) para entender si los CpGs-DVM afectan la transcripción génica.
- Realizar un ensayo de Variación en la metilación del mADN con tejidos de aortas de individuos sin presencia de aterosclerosis, y compararlo con el tejido “sano” de individuos con la patología. Esto con el fin de comprobar si los CpGs-DVM tienen alto valor predictivo para el desarrollo de la enfermedad
- Aumentar el tamaño de muestra de las aortas analizadas por los microarreglos 450K, para mejora la significancia estadística en el análisis funcional de los gCpG-DVM que correlacionaban con ncADMmt.

## 7. REFERENCIAS

Aldons, J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), 233-241

Arner, P., Sahlqvist, A. S., Sinha, I., Xu, H., Yao, X., Waterworth, D., ... & Thorell, A. (2016). The epigenetic signature of systemic insulin resistance in obese women. *Diabetologia*, 59(11), 2393-2405.

Austin, S., & St-Pierre, J. (2012). PGC1 $\alpha$  and mitochondrial metabolism—emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci*, 125(21), 4963-4971.

Barger, P. M., Browning, A. C., Garner, A. N., & Kelly, D. P. (2001). p38 Mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  a potential role in the cardiac metabolic stress response. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44495-44501.

Barrès, R., Osler, M. E., Yan, J., Rune, A., Fritz, T., Caidahl, K., ... & Zierath, J. R. (2009). Non-CpG methylation of the PGC-1 $\alpha$  promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell metabolism*, 10(3), 189-198.

Barton, M., Husmann, M., & Meyer, M. R. (2016). Accelerated vascular aging as a paradigm for hypertensive vascular disease: prevention and therapy. *Canadian Journal of Cardiology*, 32(5), 680-686.

Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A. J., Socci, N. D., & Scandura, J. M. (2011). DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PloS one*, 6(1), e14524.

Benjamin, E. J., Virani, S. S., Callaway, C. W., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., ... & de Ferranti, S. D. (2018). Heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 137(12), e67-e492.

Burns, K. A., & Heuvel, J. P. V. (2007). Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(8), 952-960.

Cantó, C., & Auwerx, J. (2009). PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current opinion in lipidology*, 20(2), 98.

Cao, H. (2014). Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *Journal of Endocrinology*, 220(2), T47-T59.

de la Rocha, C., Rodríguez-Ríos, D., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., Alvarado-Caudillo, Y., Orozco-Castellanos, L.M., Galván-Chía, J.P., Tiesen-Favier A., Zaina, S., Lund, G. (2018). A modest supplement of arachidonic acid induces cumulative metabolic and epigenetic changes across three generations in mice. Artículo en proceso.

Dedeurwaerder, S., Defrance, M., Bizet, M., Calonne, E., Bontempi, G., & Fuks, F. (2013). A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing. *Briefings in bioinformatics*, 15(6), 929-941

Dogan, M. V., Shields, B., Cutrona, C., Gao, L., Gibbons, F. X., Simons, R., ... & Philibert, R. A. (2014). The effect of smoking on DNA methylation of peripheral blood mononuclear cells from African American women. *BMC genomics*, 15(1), 151.

Hubal, M.J., Barbeiro, M.D., Nadler, E.P. (2016). Analysis of obesity-induced DNA methylation in visceral adipose tissue (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE88940>).

Du, P., Zhang, X., Huang, C. C., Jafari, N., Kibbe, W. A., Hou, L., & Lin, S. M. (2010). Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC bioinformatics*, 11(1), 587.

Du, P., Kibbe, W.A. and Lin, S.M., (2008) 'lumi: a pipeline for processing Illumina microarray', *Bioinformatics* 24(13):1547-1548

Frasca, D., Blomberg, B. B., & Paganelli, R. (2017). Aging, obesity, and inflammatory age-related diseases. *Frontiers in immunology*, 8, 1745.

Feinberg, A. P. (2014). Epigenetic stochasticity, nuclear structure and cancer: the implications for medicine. *Journal of internal medicine*, 276(1), 5-11.

Gnocchi, D., Pedrelli, M., Hurt-Camejo, E., & Parini, P. (2015). Lipids around the clock: focus on circadian rhythms and lipid metabolism. *Biology*, 4(1), 104-132.

Gorenne, I., Kavurma, M., Scott, S., & Bennett, M. (2006). Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 72(1), 9-17.

Gonzalez-Hunt, C. P., Rooney, J. P., Ryde, I. T., Anbalagan, C., Joglekar, R., & Meyer, J. N. (2016). PCR-Based Analysis of Mitochondrial DNA Copy Number, Mitochondrial DNA Damage, and Nuclear DNA Damage. *Current protocols in toxicology*, 67(1), 20-11.

Gu, F., Chauhan, V., Kaur, K., Brown, W. T., LaFauci, G., Wegiel, J., & Chauhan, A. (2013). Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain

complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Translational psychiatry*, 3(9), e299.

Guardiola, M., Vallvé, J. C., Zaina, S., & Ribalta, J. (2016). Epigenética en la arteriosclerosis. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 28(2), 102-119.

Hsu, C. C., Tseng, L. M., & Lee, H. C. (2016). Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Experimental Biology and Medicine*, 241(12), 1281-1295.

Issa, J. P. (2011). Epigenetic variation and cellular Darwinism. *Nature genetics*, 43(8), 724.

Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?. *Genes & cancer*, 2(6), 607-617.

Jones, P. A., & Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics*, 10(11), 805.

Kher, N., & Marsh, J. D. (2004). Pathobiology of atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost*, 30, 665-672.

Kuan, P. F., Song, J., & He, S. (2017). methylDMV: simultaneous detection of differential dna methylation and variability with confounder adjustment. In *PACIFIC SYMPOSIUM ON BIOCOMPUTING 2017* (pp. 461-472).

Kuo, H. K., & Fujise, K. (2011). Human papillomavirus and cardiovascular disease among US women in the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003 to 2006. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(19), 2001-2006.

Lawson, J. S., Glenn, W. K., Tran, D. D., Ngan, C. C., Duflou, J. A., & Whitaker, N. J. (2015). Identification of human papilloma viruses in atheromatous coronary artery disease. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 2, 17.

Liu, L. P., Cheng, K., Ning, M. A., Li, H. H., Wang, H. C., Li, F., ... & Guo, W. Y. (2017). Association between peripheral blood cells mitochondrial DNA content and severity of coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 261, 105-110.

Lozoya, O. A., Martinez-Reyes, I., Wang, T., Grenet, D., Bushel, P., Li, J., ... & Santos, J. H. (2018). Mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) oxidation links the tricarboxylic acid (TCA) cycle with methionine metabolism and nuclear DNA methylation. *PLoS biology*, 16(4), e2005707.

Lund, G., Andersson, L., Lauria, M., Lindholm, M., Fraga, M. F., Villar-Garea, A., ... & Zaina, S. (2004). DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29147-29154.

Madamanchi, N. R., & Runge, M. S. (2007). Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation research*, 100(4), 460-473.

Marín-García, J. (2012). *Mitochondria and their role in cardiovascular disease*. Springer Science & Business Media.

Marín-García, J. (2013). The Role of Mitochondria in Atherosclerosis. In *Mitochondria and Their Role in Cardiovascular Disease* (pp. 295-303). Springer, Boston, MA.

Moreno-Santos, I., Pérez-Belmonte, L. M., Macías-González, M., Mataró, M. J., Castellano, D., López-Garrido, M., ... & Teresa-Galván, E. (2016). Type 2 diabetes is associated with decreased PGC1 $\alpha$  expression in epicardial adipose tissue of patients with coronary artery disease. *Journal of translational medicine*, 14(1), 243.

Morris TJ, Butcher LM, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK and Beck S (2014). "ChAMP: 450kChip Analysis Methylation Pipeline." *Bioinformatics*, 30(3), pp. 428-430. doi: 10.1093/bioinformatics/btt684 (URL: <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt684>).

Paul, D. S., Teschendorff, A. E., Dang, M. A., Lowe, R., Hawa, M. I., Ecker, S., ... & Burden, F. (2016). Increased DNA methylation variability in type 1 diabetes across three immune effector cell types. *Nature communications*, 7, 13555.

Pisarenko, O., Shulzhenko, V., Studneva, I., Pelogeykina, Y., Timoshin, A., Anesia, R., ... & Kunduzova, O. (2015). Structural apelin analogues: mitochondrial ROS inhibition and cardiometabolic protection in myocardial ischaemia reperfusion injury. *British journal of pharmacology*, 172(12), 2933-2945.

Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28(10), 1057.

Porwal, V., Khandelwal, S., Jain, D., & Gupta, S. (2016). Histological classification of atherosclerosis and correlation with ischemic heart disease: A autopsy based study. *Annals of Pathology and Laboratory Medicine*, 3(2), A99-104.

Rask-Madsen, C., Li, Q., Freund, B., Feather, D., Abramov, R., Wu, I. H., ... & Clermont, A. (2010). Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. *Cell metabolism*, 11(5), 379-389.

Rechache, N. S., Wang, Y., Stevenson, H. S., Killian, J. K., Edelman, D. C., Merino, M., ... & Kebebew, E. (2012). DNA methylation profiling identifies global methylation differences and markers of adrenocortical tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *97*(6), E1004-E1013.

Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews*, *68*(2), 320-344.

Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., & Berger, S. L. (2016). Epigenetic mechanisms of longevity and aging. *Cell*, *166*(4), 822-839.

Silva-Martínez, GA (2017). *Perfiles de metilación del ADN en células THP-1 estimuladas con ácido araquidónico (AA) o ácido oleico (AO) y su impacto transcripcional* (disertación Doctoral, Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Politécnico Nacionanl).

Silva-Martínez, G. A., Rodríguez-Ríos, D., Alvarado-Caudillo, Y., Vaquero, A., Esteller, M., Carmona, F. J., ... & Wrobel, K. (2016). Arachidonic and oleic acid exert distinct effects on the DNA methylome. *Epigenetics*, *11*(5), 321-334.

Solinas, G., & Becattini, B. (2017). JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Molecular metabolism*, *6*(2), 174-184.

Sтары, H. C. (2000). Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *20*(5), 1177-1178.

Stirzaker, C., Taberlay, P. C., Statham, A. L., & Clark, S. J. (2014). Mining cancer methylomes: prospects and challenges. *Trends in Genetics*, *30*(2), 75-84.

Supruniuk, E., Mikłosz, A., & Chabowski, A. (2017). The Implication of PGC-1 $\alpha$  on Fatty Acid Transport across Plasma and Mitochondrial Membranes in the Insulin Sensitive Tissues. *Frontiers in physiology*, *8*, 923.

Teschendorff, A. E., Gao, Y., Jones, A., Ruebner, M., Beckmann, M. W., Wachter, D. L., ... & Widschwendter, M. (2016). DNA methylation outliers in normal breast tissue identify field defects that are enriched in cancer. *Nature communications*, *7*, 10478.

Teschendorff, A. E., Jones, A., & Widschwendter, M. (2016). Stochastic epigenetic outliers can define field defects in cancer. *BMC bioinformatics*, *17*(1), 178.

Teschendorff, A. E., & Widschwendter, M. (2012). Differential variability improves the identification of cancer risk markers in DNA methylation studies profiling precursor cancer lesions. *Bioinformatics*, 28(11), 1487-1494.

Valencia-Morales, M., Zaina, S., Heyn, H., Carmona, F. J., Varol, N., Sayols, S., ... & Lund, G. (2015). The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression. *BMC medical genomics*, 8(1), 7.

Vivian, C. J., Brinker, A. E., Graw, S., Koestler, D. C., Legendre, C., Gooden, G. C., ... & Welch, D. R. (2017). Mitochondrial genomic backgrounds affect nuclear DNA methylation and gene expression. *Cancer research*, canres-1473.

Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., ... & Schwartz, M. (2009). gplots: Various R programming tools for plotting data. *R package version*, 2(4), 1.

Wang, M., Amano, S. U., Flach, R. J. R., Chawla, A., Aouadi, M., & Czech, M. P. (2013). Identification of Map4k4 as a novel suppressor of skeletal muscle differentiation. *Molecular and cellular biology*, 33(4), 678-687.

Walker, B. R. (2007). Glucocorticoids and cardiovascular disease. *European journal of endocrinology*, 157(5), 545-559.

Weber, C., & Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine*, 17(11), 1410.

Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., ... & Gerencser, A. A. (2016). Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell metabolism*, 23(2), 303-314.

Wu, H., Deng, X., Shi, Y., Su, Y., Wei, J., & Duan, H. (2016). PGC-1 $\alpha$ , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Endocrinology*, JOE-16.

Xu, F. X., Zhou, X., Shen, F., Pang, R., & Liu, S. M. (2012). Decreased peripheral blood mitochondrial DNA content is related to HbA1c, fasting plasma glucose level and age of onset in type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 29(7), e47-e54.

Xu, X., Su, S., Barnes, V. A., De Miguel, C., Pollock, J., Ownby, D., ... & Wang, X. (2013). A genome-wide methylation study on obesity: differential variability and differential methylation. *Epigenetics*, 8(5), 522-533.

Yu, E., & Bennett, M. R. (2016). The role of mitochondrial DNA damage in the development of atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 223-230.

Yu, E., & Bennett, M. R. (2014). Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(9), 481-487.

Yu, E., Calvert, P. A., Mercer, J. R., Harrison, J., Baker, L., Figg, N. L., ... & Logan, A. (2013). Mitochondrial DNA damage can promote atherosclerosis independently of reactive oxygen species through effects on smooth muscle cells and monocytes, and correlates with higher risk plaques in humans. *Circulation*, CIRCULATIONAHA-113.

Yu, E., Mercer, J., & Bennett, M. (2012). Mitochondria in vascular disease. *Cardiovascular research*, 95(2), 173-182.

Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., & He, Q. Y. (2012b). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics: a journal of integrative biology*, 16(5), 284-287.

Zaina, S., & Lund, G. (2017). Connecting the Dots Between Fatty Acids, Mitochondrial Function, and DNA Methylation in Atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*, 19(9), 36.

Zaina, S., Gonçalves, I., Carmona, F. J., Gomez, A., Heyn, H., Mollet, I. G., ... & Esteller, M. (2015). DNA methylation dynamics in human carotid plaques after cerebrovascular events. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, ATVBAHA-115.

Zaina, S., Heyn, H., Carmona, F. J., Varol, N., Sayols, S., Condom, E., ... & Esteller, M. (2014). A DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, CIRCGENETICS-113.

Zhai, C., Cheng, J., Mujahid, H., Wang, H., Kong, J., Yin, Y., ... & Chen, W. (2014). Selective inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway regulates autophagy of macrophage and vulnerability of atherosclerotic plaque. *PloS one*, 9(3), e90563.

Zhang, Y., Guallar, E., Ashar, F. N., Longchamps, R. J., Castellani, C. A., Lane, J., ... & Boerwinkle, E. (2017). Association between mitochondrial DNA copy number and sudden cardiac death: findings from the Atherosclerosis Risk in Communities study (ARIC). *European heart journal*, 38(46), 3443-3448.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

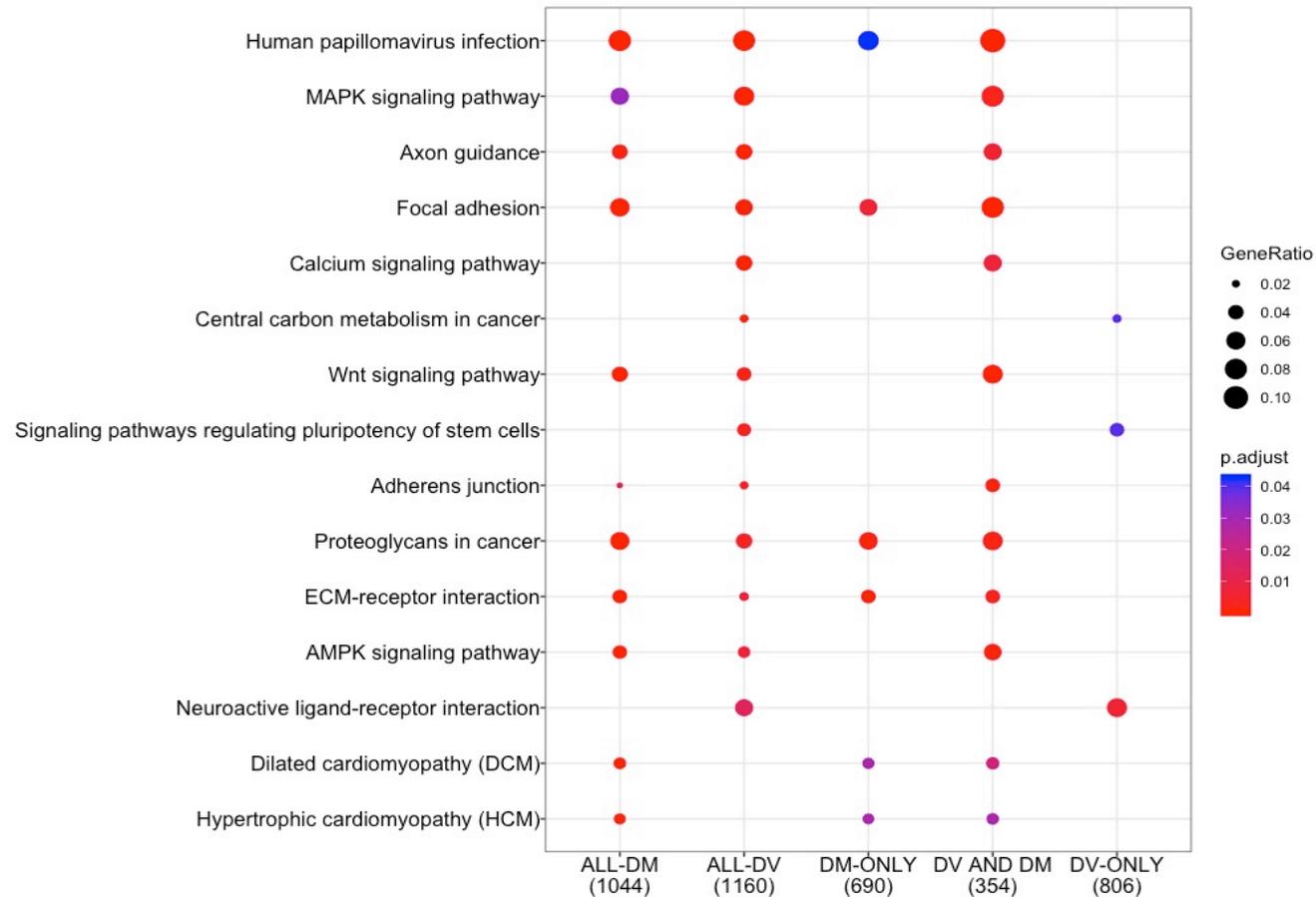
Zhao, C., & Xue, H. (2012). A simple method for high-throughput quantification of genome-wide DNA methylation by fluorescence polarization. *Epigenetics*, 7(4), 335-339.

## **8. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

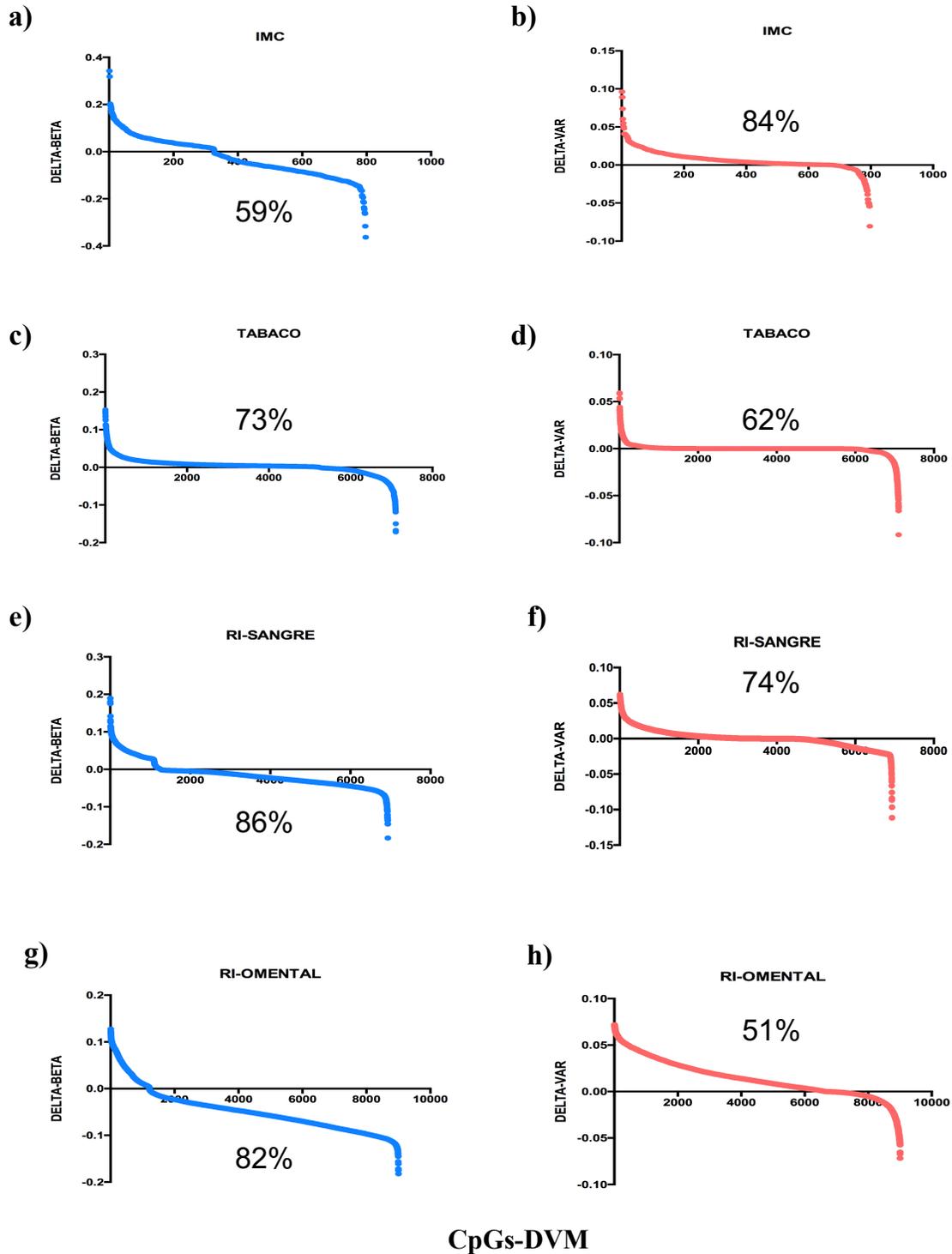
### **8.1 Acerca de las tablas suplementarias.**

Las tablas suplementarias se pueden consultar en el siguiente enlace (<https://www.dropbox.com/s/lbfdg1sukfv1qcy/TESIS-FINAL-NFRAGOSO-TABSUP.xlsx?dl=0>), o solicitándolo al presente autor de esta tesis al siguiente correo [nicolasfragosobargas@gmail.com](mailto:nicolasfragosobargas@gmail.com)

## 8.2 Figuras Suplementarias.



**Figura suplementaria 1:** Comparación de los CpGs-DVM y CpGs-DM usando vías KEGG: ALL-DV y ALL-DM, todos los CpGs-DVM y DM, respectivamente; DM-ONLY y DV-ONLY, gCpGs- específicas para DVM y DM; DV AND DM; gCpGs común entre DVM y DM, p.adjust: p ajustada (FDR). El color de los puntos representa el FDR (p.adjust), mientras más cercano a rojo o azul mayor o menor significancia estadística respectivamente. GeneRatio: Relación entre el número de genes del set de datos y el número de genes totales de la vía, a mayor GeneRatio mayor será tamaño del punto



**CpGs-DVM**

**Figura suplementaria 2: Comportamiento del Delta-Beta y el Delta-Var en las cohortes de obesidad, tabaquismo, Resistencia a la insulina (Sangre y Omental):** a-b)  $\Delta\beta$  y  $\Delta V$ , respectivamente, en la cohorte de obesidad; c-d)  $\Delta\beta$  y  $\Delta V$ , respectivamente, en la cohorte de tabaquismo; e-f)  $\Delta\beta$  y  $\Delta V$ , respectivamente, en la cohorte de RI-sangre; g-h)  $\Delta\beta$  y  $\Delta V$ , respectivamente, en la cohorte de RI (omental). Cada punto azul y rojo representa el valor de  $\Delta\beta$  y  $\Delta V$ , respectivamente, de cada CpGs-DVM. Eje y: valores de Delta-beta o Delta-Var, eje x: CpGs-DVM. Los números de arriba y abajo del eje X indican el % de CpGs-DVM que tenían valores positivos o negativos, respectivamente de  $\Delta\beta$  y  $\Delta V$ .