

Estado de metilación de regiones promotoras de tres genes de respuesta inflamatoria en una muestra de colombianos con problemas de consumo de alcohol: un estudio exploratorio

Mauricio Rey Buitrago^{1,2*}, Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez²

¹ Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

² Departamento of Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

* Correspondencia: Mauricio Rey Buitrago. Carrera 45 No. 26-85, Instituto de Genética, Edificio 426, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia. Tel: +57 1 3165000, ext: 11610. Correo electrónico: mrey@unal.edu.co

Recibido: 5 de septiembre de 2023

Revisado: 10 de enero de 2024

Aceptado: 17 de enero de 2024

RESUMEN

Introducción: La dependencia del alcohol exhibe un patrón de herencia multifactorial. Las vías de respuesta inflamatoria han despertado un interés particular, específicamente el aspecto epigenético está muy influenciado étnicamente y por la evolución personal de la enfermedad. **Objetivo:** Comparar el estado de metilación de una región promotora con islas CpG de algunos genes candidatos a dianas farmacéuticas en la vía de respuesta inflamatoria, entre controles e individuos con consumo problemático de alcohol de una muestra de una población universitaria colombiana. **Métodos:** Previamente, se realizaron estudios sobre 29 variantes genéticas que afectan a 10 genes implicados en la respuesta inflamatoria. Luego se realizó análisis de la expresión de ARNm y proteínas de algunos de estos genes, perfilando a tres genes para estudios de metilación, a saber, *SNCA*, *MIF* e *IFNGR1*. Se analizó el estado de metilación del ADN modificado con bisulfito mediante PCR con marcaje fluorescente, electroforesis capilar y validación con secuenciación de Sanger. **Resultados:** Existen cambios en el estado de metilación del promotor de los genes *MIF* y *SNCA* en los casos. Se observó concordancia entre la expresión génica y el estado de metilación en *MIF* en la muestra general, y también con la síntesis de ARNm-*SNCA*, sin cambios apreciables en la proteína, aunque con diferencias según el sexo. **Conclusión:** Nuestro estudio proporcionó información sobre el estado de

metilación de los promotores *SNCA* y *MIF* y su relación con la expresión génica en fenotipos de consumo problemático de alcohol. Estas dos proteínas se proponen como candidatas para estudios de modelado.

Palabras Clave: Metilación, modificación con bisulfito, respuesta inflamatoria, alcohol, *SNCA*, *MIF*, *IFNGR1*

SUMMARY

Methylation status of promoter regions of three inflammatory response genes in a sample of Colombians with alcohol consumption problems - an exploratory study

Introduction: Alcohol dependence exhibits a multifactorial inheritance pattern. The inflammatory response pathways have aroused particular interest; specifically the epigenetic aspect is highly influenced by ethnicity and by the personal evolution of the disease. **Objective:** To compare the methylation status of a promoter region with CpG islands of some candidate genes for pharmaceutical targets in the inflammatory response pathway, between controls and individuals with problematic alcohol consumption from a sample of a Colombian university population. **Methods:** Previously, studies were carried out on 29 genetic variants that affect 10 genes involved in the inflammatory response. Analysis of the mRNA and protein expression of some of these genes was then performed, profiling three genes for methylation studies, namely *SNCA*, *MIF*, and *IFNGR1*. The methylation status of bisulfite-modified DNA was analyzed by PCR with fluorescent labeling, capillary electrophoresis, and validation with Sanger sequencing. **Results:** There are changes in the methylation state of the promoter of the *MIF* and *SNCA* genes in the cases. Concordance was observed between gene expression and methylation status in *MIF* in the general sample, and also in the synthesis of mRNA-*SNCA*, without appreciable changes in the protein, although with differences according to sex. **Conclusion:** Our study provided information on the methylation status of the *SNCA* and *MIF* promoters and its relationship with expression in problem drinking phenotypes. These two proteins are proposed as candidates for modeling studies.

Keywords: Methylation, bisulfite modification, inflammatory response, alcohol, *SNCA*, *MYF*, *IFNGR1*

RESUMO

Estado de metilação de regiões promotoras de três genes de resposta inflamatória em uma amostra de colombianos com problemas de consumo de álcool – um estudo exploratório

Introdução: A dependência do álcool apresenta um padrão de herança multifatorial. As vias de resposta inflamatória têm despertado particular interesse, especificamente o aspecto epigenético é altamente influenciado etnicamente e pela evolução pessoal da doença. **Objetivo:** Comparar o estado de metilação de uma região promotora com ilhas CpG de alguns genes candidatos a alvos farmacêuticos na via de resposta inflamatória, entre controles e indivíduos com consumo problemático de álcool de uma amostra de uma população universitária colombiana. **Métodos:** Anteriormente, foram realizados estudos com 29 variantes genéticas que afetam 10 genes envolvidos na resposta inflamatória. A análise do mRNA e da expressão proteica de alguns desses genes foi então realizada, traçando o perfil de três genes para estudos de metilação, a saber, *SNCA*, *MIF* e *IFNGR1*. O status de metilação do DNA modificado com bissulfito foi analisado por PCR com marcação fluorescente, eletroforese capilar e validação com sequenciamento Sanger. **Resultados:** Há alterações no estado de metilação do promotor dos genes *MIF* e *SNCA* nos casos. Foi observada concordância entre expressão gênica e status de metilação em *MIF* na amostra geral, e também com a síntese de mRNA de *SNCA*, sem alterações apreciáveis na proteína, embora com diferenças de acordo com o sexo. **Conclusão:** Nosso estudo forneceu informações sobre o estado de metilação dos promotores *SNCA* e *MIF* e sua relação com a expressão gênica em fenótipos problemáticos de consumo de álcool. Estas duas proteínas são propostas como candidatas para estudos de modelagem.

Palavras-chave: Metilação, modificação de bissulfito, resposta inflamatória, álcool, *SNCA*, *MIF*, *IFNGR1*

INTRODUCCIÓN

El alcohol se constituye en la principal sustancia psicoactiva de uso legal que se consume en Colombia, particularmente en la población universitaria, el 95 % de los estudiantes declaran haber consumido alcohol al menos una vez en la vida, el 85 % declara un consumo reciente, el 62 % declara un consumo actual, el 75 % de la población encuestada

tienen conducta de riesgo, es decir 3 de cada 4 personas pueden ser consideradas como bebedoras de riesgo o con un uso perjudicial y finalmente el 14% de la población muestra signos de dependencia [1].

La alcohol-dependencia es una enfermedad de carácter multifactorial con un componente genético de alrededor del 50%. La evidencia genética acumulada, aunque con resultados contradictorios y una gran heterogeneidad, más la concordancia incompleta entre gemelos monocigóticos en respuesta al alcohol, sugiere que además de los factores genéticos y ambientales, son importantes los epigenéticos [2]. Además, los resultados tan distintos y con escasa reproducibilidad en estudios de variantes genéticas asociados al alcoholismo nos hacen pensar que, quizás añadido a la heterogeneidad génica propia de las enfermedades de herencia multifactorial, las diferencias se deban a alteraciones en un nivel diferente a la secuencia del ADN como lo son: la expresión génica o su regulación, la interacción entre genes, las variables metabólicas, otras enfermedades concomitantes, el estado nutricional, el estado de la microbiota intestinal, etc. de los pacientes [3, 4]. El alcohol y sus “metabolitos” pueden causar cambios epigenéticos, alterando el estado de metilación del ADN, modificando las histonas y la expresión de miRNA contribuyendo a la alteración en numerosas vías de señalización celulares [5, 6].

Las alteraciones genéticas han sido ampliamente estudiadas, particularmente las variantes de nucleótido simple (SNV's) que son sustituciones de una base (nucleótido) por otra en la secuencia de un gen que debe estar en al menos el 1% de la población. Pueden ser marcadores genéticos ideales en la búsqueda de genes de susceptibilidad a una enfermedad o genes que determinan la respuesta a un fármaco determinado [7-9]. Los hallazgos más robustos de la influencia genética sobre el alcoholismo están relacionados con SNV's de genes que codifican enzimas para el metabolismo del etanol que implican la conversión del etanol a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y este último a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). En el sistema nervioso, el citocromo P4502E1 del sistema microsomal, en bebedores fuertes cobra relevancia. En Asia las variantes *ADH1B*2*, que genera una enzima con 100 veces más actividad y *ALDH2*2* con menor actividad conllevan al fenotipo que presenta enrojecimiento facial, hipotensión, dolor de cabeza y náuseas y por tanto se consideran un factor de protección [7]. En Colombia, nuestro grupo de investigación realizó un estudio con una muestra poblacional de la región central del país encontrando que una combinación particular de genotipos de *ADH1B*, *ADH1C*, *ALDH2* y *CYP2E1* podría estar llevando a la población a un posible riesgo, dado que al presentar alelos cuyo producto enzimático permite una tasa de oxidación mayor del etanol (*ADH1B*2*, *ADH1C*1*, *CYP2E1c2*) combinados con el genotipo homocigoto de *ALDH2*1* aumentaría las tasas de aclaramiento del alcohol y acetaldehído dando como resultado una mayor tolerancia al consumo de cantidades elevadas de alcohol,

siendo esto un factor de riesgo para desarrollar una dependencia. Esta característica sumada a otros factores como son los sociológicos, psíquicos y ambientales contribuyen fuertemente a la susceptibilidad de una población a la enfermedad [10, 11].

Los estudios con genes candidatos y particularmente los ensayos con SNV's en humanos no son suficientes para explicar los mecanismos tan complejos del efecto neurotóxico del alcohol y los diversos fenotipos del alcoholismo. A pesar de la complejidad del panorama, los estudios de genómica total, expresión génica (transcriptómica y proteómica) nos muestran algunas redes íntimamente ligadas con los cambios funcionales que se presentan. Mediante técnicas de microarreglos y neuroproteómica se analizó la expresión génica en la corteza prefrontal de tejidos humanos postmortem de individuos con historial de adicción a distintos psicoactivos, incluido el alcohol, encontrando alteración significativa en genes de distinta localización y función celular, además de los ya mencionados anteriormente del metabolismo, se han descrito genes de transducción de señales (*CREB1*, *MAPK1*, *NTRK2*, *SOD2*), genes de inflamación (*TNFR1*, *IL-1R*, *IL-6R*, *TLR2*, *TLR4* y *NFκβ*), genes inmunitarios y de otras vías como la vía de señalización de calmodulina, genes de tránsito del retículo endoplasmático y aparato de Golgi, genes estructurales del cito-esqueleto, adhesión celular, receptores nucleares y moléculas que modulan la plasticidad neuronal, el circuito de recompensa, la memoria y arquitectura dendrítica [12-15].

Otra arista de esta enfermedad compleja, es el aspecto epigenético, más del 50% de estudios epigenéticos hacen referencia a la metilación del ADN por ser cambios más estables y técnicamente más fáciles de realizar, mientras la obtención de muestras adecuadas y su procesamiento para otros tipos de estudios epigenéticos es más compleja [16, 17]. En el genoma de mamíferos alrededor del 75% de dinucleótidos CpG metilados se encuentran principalmente en elementos repetitivos y de regulación génica, además alrededor de la mitad de los genes están asociados a islas CpG y su estado de metilación depende de factores externos como la dieta, estilo de vida y de condiciones fisiológicas y clínicas específicas [18].

El consumo continuo de alcohol altera la metilación del ADN de tres formas: por inhibición de las ADN metiltransferasas (*DNMT*); interfiriendo el metabolismo de carbohidratos, por cambios en el estado redox de las células; o limitando la disponibilidad de ácido fólico que disminuye la concentración de S-adenosilmetionina (*SAM*) [19]. Todo lo anterior, lleva a un estado de hipometilación generalizado en el organismo de consumidores crónicos de alcohol, cambiando la actividad de promotores, alterando la transcripción de genes. Aunque se ha evidenciado hipermetilación de secuencias tipo CCGG y de islas CpG en promotores de genes candidatos que han sido asociados al alcoholismo como: el transportador de dopamina (*SLC6A3*), la vasopresina (*ADH*),

el péptido natriurético atrial (*ANP*), la proopiomelanocortina (*POMC*), la proteína del retículo endoplasmático inducida por homocisteína (*HERPUD*), la alfa sinucleína (*SNCA*), la monoaminooxidasa A (*MAO A*), el transportador de serotonina (*SLC6A4*), la subunidad 2B del receptor de N-metil-D-aspartato (*GRIN2B*), la prodinorfina (*PDYN*), entre otros, mostrando diferencias en patrones de metilación entre controles y pacientes con dependencia al alcohol [20-22]. Por otro lado, los fármacos zebularina y 5-aza-2-deoxicitidina bloquean a *DNMT* alterando la metilación del promotor del factor neurotrópico derivado de cerebro (*BDNF*) y de la reelina (*RELN*) implicados en la plasticidad en el hipocampo en respuesta al alcohol [23].

Diferentes estudios han permitido establecer las redes funcionales que más frecuentemente han relacionado al alcoholismo con alteraciones del estado de metilación de islas CpG de promotores de genes involucrados en neurodesarrollo, neurocomportamiento, metabolismo de lípidos y respuesta inflamatoria. Con relación a esta última función, se ha encontrado al gen de receptor tipo toll-4 (*TLR4*) hipermetilado causando la alteración de la vía con efectos de neurotoxicidad y neurodegeneración [24]. Por otro lado, otros autores han encontrado hipometilación en genes reguladores de la respuesta inmune a través de interleuquina 1-beta (*IL-1 β*), *IL-4*, *IL-10* y factor de necrosis tumoral alpha (*TNF- α*) que se relacionan con aumento de infecciones y cáncer en el tracto digestivo en los bebedores de alcohol. En particular, el consumo de alcohol a nivel hepático puede alterar la síntesis de proteínas relacionadas con respuesta inflamatoria e inmunidad innata y particularmente el metabolito S-adenosilmetionina y, por tanto, disminuir la metilación del ADN [25]. Además, la hipometilación del promotor del gen miRNA-34a, inducida por el etanol, cambia los patrones de expresión de genes como caspasa 2 (*CASP2*), sirtuina 1 (*SIRT1*), metaloproteinasas 2 y 9 (*MMP2* y *MMP9*) relacionados con la supervivencia de los hepatocitos [26].

En este estudio seleccionamos los siguientes genes candidatos: *SNCA* (sinucleína), *MIF* (factor de inhibición de la migración de macrófagos) e *IFNGR1* (receptor tipo 1 del interferón gamma) a partir de los resultados de trabajos previos propios sobre SNV (polimorfismos de nucleótido único) en la región promotora, haplotipos, epistasis y expresión, en donde resultaron ser promisorios blancos terapéuticos [27, 28]. *SNCA* juega un papel importante en los procesos de neuroprotección y neurotoxicidad, y su ausencia aumenta la sensibilidad del sistema de recompensa cerebral en los consumidores crónicos de alcohol [29-31]. Sin embargo, esta proteína podría plegarse de forma incorrecta una vez fuera de la célula nerviosa, activando la microglía [32]. Por otro lado, el promotor de *SNCA* se ha relacionado principalmente con la variante Rep-1, un polimorfismo repetido de un dinucleótido con variados alelos en diferentes poblaciones humanas. A medida que el alelo es más corto, menor es la expresión del gen y se ha asociado con la predisposición al consumo de alcohol [30]. El riesgo de enferme-

dades neurodegenerativas aumenta con el consumo excesivo de alcohol, especialmente en individuos que tienen variantes de fácil agregación, con ciertos SNV en la región codificante del gen [30, 33]. Además, los polimorfismos en la región 3'-UTR del gen *SNCA* podrían estar relacionados con cambios que modifican la estructura secundaria del ARNm y cómo se unen a él los miARN, lo que a su vez afecta su expresión génica [34].

MIF es una proteína que controla tanto la inmunidad innata como la adquirida. En grandes bebedores de alcohol se incrementa su expresión y el uso del fármaco inhibidor, Ibudilast, muestra buenos efectos, lo que sugiere que MIF debería ser evaluado como un biomarcador para predecir la respuesta psicoterapéutica y farmacológica en pacientes con problemas de consumo de alcohol. Se considera un candidato viable para una diana terapéutica [35].

Los interferones gamma (IFN γ) son producidos por los linfocitos T CD4⁺, los NK y NKT con la función de activar las células presentadoras de antígenos como macrófagos y células dendríticas, además de funcionar como estimuladores e inmunomoduladores del sistema inmune. Además actúa como activador de iNOS e induce la síntesis de inmunoglobulinas y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II. Por otro lado, los receptores de los IFN γ (tipo I y II) se expresan de manera ubicua actuando por la vía de JAK-STAT. Es conocido que el consumo excesivo de alcohol, finalmente inhibe la respuesta inmune, aumentando la susceptibilidad a infecciones. Durante la fase inicial del alcoholismo se activa la vía de los interferones, aumentando la sensibilidad de células hepáticas al TNF- α y la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12 [36].

La epigenética puede cambiar dinámicamente en respuesta a factores externos y puede proveer un mecanismo que explique mejor cómo el ambiente afecta la expresión génica y, por tanto, los diferentes fenotipos de la enfermedad a medida que progresa (tolerancia, abstinencia, recaída, etc.) [28, 29]. Hay características particulares de las adicciones como la recaída, que difícilmente se explica por aspectos genómicos; hoy en día hay evidencias que cambios en la regulación de enzimas relacionadas con alteraciones epigenéticas podrían explicar estos fenómenos [31, 37-39]. Además, los cambios epigenéticos son dinámicos y reversibles y, por tanto, potentes candidatos para intervenciones terapéuticas [40].

En los últimos años se han desarrollado diversos estudios que muestran la alteración en estados de metilación en islas CpG de números genes de pacientes con uso problemático del alcohol, particularmente los relacionados con respuesta inflamatoria [3, 41]. El objetivo de este trabajo fue determinar el estado de metilación de islas CpG de

regiones promotoras de tres genes candidatos: *IFNGR1*, *MIF* y *SCNA*, de respuesta inflamatoria y relacionarlos con el uso problemático del alcohol, comparando controles y casos colombianos.

METODOLOGÍA

La definición del objeto de estudio.

Para el reclutamiento inicial de voluntarios se tuvo en cuenta a hombres y mujeres mayores de 18 años, nacidos en Colombia, residentes en la ciudad de Bogotá, que estuvieran vinculados a la Universidad Nacional de Colombia, ya sea como estudiantes, docentes o empleados, y que accedieran a participar en el estudio firmando consentimiento informado. A todos los sujetos incluidos en el estudio se les aplicó el cuestionario AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) como instrumento de clasificación de la gravedad de la dependencia del alcohol validado para Colombia por Campo-Arias *et al.* [42] y Ospina-Díaz *et al.* [43]. La selección de la muestra de individuos se hizo por conveniencia, el grupo control se seleccionó teniendo en cuenta que fueran personas del mismo sexo y edades similares a los casos y que obtuvieran puntajes AUDIT menores de siete, mientras que la selección de individuos con uso problemático del alcohol (casos) se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios: individuos cuyo primer problema con sustancias adictivas fuese el alcohol y que obtuvieron puntajes AUDIT mayores a siete. Por otro lado, a todos ellos, tanto controles como casos, se les realizó una entrevista semiestructurada, elaborada con base en Scoppetta *et al.* [44] y Silla-Stoel y Rosón-Hernández [45] con el objetivo de obtener mayor información sobre hábitos, frecuencia y cantidad de consumo, estado médico, antecedentes personales y familiares. De igual forma se calculó los gramos de alcohol consumidos por los participantes en el estudio teniendo en cuenta su último consumo, no olvidando que se requería una abstinencia de 48 horas [46]. Se excluyeron los voluntarios que reportaron infecciones, alergias, algún tratamiento farmacológico, enfermedades hepáticas y psiquiátricas diagnosticadas.

Del muestreo inicial en el que participaron 139 personas, 73 se clasificaron como controles y 66 como personas con consumo problemático de alcohol [27], se seleccionaron 25 personas de cada grupo para este estudio, teniendo en cuenta el valor AUDIT. 25 voluntarios con los puntajes AUDIT más bajos, igual o menores a siete para los controles y 25 con puntajes más altos, mayores a siete para el grupo de casos. Fue un estudio descriptivo con un muestreo no probabilístico por conveniencia, aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Estudio del estado de metilación

El estudio del estado de metilación de las regiones promotoras de los genes seleccionados, se realizó mediante la técnica de modificación con bisulfito del ADN, seguido de PCR específica para metilación y electroforesis capilar de productos fluoromarcados, reportado previamente por Shi [47]. Por otro lado, para la validación de los resultados se ejecutó la prueba de metilación específica mediante PCR (MSP) [48] seguida de secuenciación del ADN por el método de Sanger y Coulson [49]. Empleamos las dos técnicas, la primera de uso general y la segunda como prueba de verificación de los resultados. Se obtuvieron los perfiles de metilación de las islas CpG de segmentos de promotores de forma indirecta teniendo en cuenta que el ADN metilado migró más rápido que su contraparte no metilado. Se confirmó estos hallazgos mediante secuenciamiento directo de algunas muestras seleccionadas.

El principio de la modificación de ADN con la técnica de bisulfito de sodio se basa en su capacidad de convertir a todos los residuos de citosina (C) no metiladas en uracilos (U) mediante deaminación y su visualización en la secuencia como timina (T); la citosina metilada es resistente a la reacción y permanece como citosina [48]. Los iniciadores de PCR (Tabla 1) que se utilizaron flanqueaban las islas CpG que se modificaron por igual después del tratamiento del ADN con el bisulfito y aprovecha las diferencias de metilación en su interior para discriminar entre estas secuencias.

Tabla 1. Características de los iniciadores empleados en la amplificación por PCR de segmentos del promotor ricos en secuencias CpG de los genes seleccionados en ADN modificado por la técnica del bisulfito.

Gen	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Longitud del iniciador (pb)*	Temperatura de hibridación (°C)	Longitud del amplicón (pb)*
<i>IFNGR1</i>	Directo	TTTTTTTTTATATTTAGAA GTTTAGGTTT	28	59,5	293
	Inverso	AACCCTACTCACACCCTA CATAAC	24		
<i>SNCA</i>	Directo	AAAATTTTGAAGATATTT GAATTAAAG	27	59,9	444
	Inverso	CTAATCCTCCTCCTTCTCC TTCTC	25		
<i>MIF</i>	Directo	TAGTGGAAATGAATTGGG TTTTATTT	25	59,8	134
	Inverso	AATCTTTCTTAATCCTTTC ACTAAATCAC	29		

*pb: pares de bases.

Para poder tener un ADN metilado de referencia, se amplificaron los segmentos de interés con iniciadores fluoromarcados y una parte de los productos se sometieron a reacción de metilación total, otra no y ambas se corrieron en electroforesis capilar y se determinaron los tamaños de estos productos. Para ello se siguieron los protocolos de la casa comercial de la enzima EcoRI Methyltransferasa descritos en detalle por Rey-Buitrago [27].

El ADN se purificó de células mononucleares de sangre mediante la técnica de precipitación salina [27, 50] y su pureza e integridad se confirmó mediante la medición espectrofotométrica y electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, teñidos con SYBR®safe. Se seleccionaron algunas muestras, se purificaron y se les realizó secuenciamiento de Sanger. Por otro lado, los productos de PCR amplificados empleando los mismos iniciadores, pero esta vez fluoro-marcados con 5-FAM (5-caxboxifluoresceína), se corrieron en electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 310. La electroforesis capilar permite separar fragmentos de ADN marcados con diferentes fluorocromos en una sola corrida utilizando un polímero lineal de acrilamida (POP-4) contenido en un capilar. Al migrar a través del capilar los fragmentos se van separando por tamaño, pasan por la ventana de detección donde un láser emite señales que excitan los fluorocromos, dicha emisión es detectada por el equipo y transformada en registros gráficos o electroferogramas. La muestra, el amplificado (entre 0,5 y 2 μ L (microlitros)) se disolvió en 12,5 μ L de formamida Hi-Di y se le adicioneo 0,5 μ L de Rox-500 (Applied Biosystems), marcador interno de tamaño molecular fluoromarcado. Se desnaturalizaron las muestras por 5 minutos a 95 °C e inmediatamente fueron colocadas en frío hasta el momento de la electroforesis capilar. Los fragmentos fueron corridos a 60 °C, usando un capilar de 36 cm con módulo de corrida GS STR POP4 (1.0 mL) F.md4, en promedio 30 minutos y los resultados de las corridas se analizaron con el software GenMarker v2.2.0.

Análisis estadístico

El tamaño de los amplificados se presentó como la media \pm SD (desviación estándar) del tamaño determinado y para la comparación entre casos y controles se empleó la prueba paramétrica de t para igualdad de medias o el estadístico no paramétrico prueba U de Mann-Whitney. Para determinar la distribución de los datos, se realizó la prueba de Shapiro wilk. En los casos donde no se presentó una distribución normal, se emplearon pruebas no paramétricas. También fue realizada la prueba de Levene para la homocedasticidad de las varianzas ($p>0,05$). Si los resultados presentaban normalidad y homocedasticidad, se realizó la prueba ANOVA de dos factores, con test post hoc de Bonferroni, cuando fue necesario. Se construyeron diagramas de caja con el propósito de visualizar más claramente las diferencias entre los grupos de muestras objeto de análisis, se determinó un nivel de significación de $\alpha=0,05$ en todos los casos. Todos los cálculos se ejecutaron con el programa SPSS versión 23.

RESULTADOS

De los sujetos control que se examinaron, 14 fueron mujeres y 11 hombres. En el grupo de consumo problemático de alcohol, 7 fueron mujeres y 18 fueron hombres. En los dos grupos, la edad de los participantes fue similar, con sujetos de entre 18 y 37 años, y una media de 24 y 23,5 años para controles y casos, respectivamente. Tanto en el grupo control como en el grupo con problemas con la bebida, aproximadamente el 90 % de los participantes comenzaron a beber alcohol antes de los 18 años. Los dos grupos estaban compuestos principalmente por estudiantes universitarios de pregrado, quienes predominaron en el grupo de casos y profesionales que trabajaban en la universidad, perteneciendo estos últimos en mayor proporción al grupo control (Tabla 2) [28].

Considerando que el cuestionario AUDIT es una herramienta de tamizaje, se empleó adicionalmente un cuestionario semiestructurado, en el cual se planteó una pregunta específica acerca de la cantidad media de alcohol consumida durante la última sesión, entre otras. En el ámbito de los controles, aproximadamente el 50% de los individuos consumieron principalmente cerveza, con un promedio de 37 g de alcohol por evento, mientras que aquellos con un consumo problemático de alcohol consumieron principalmente cerveza, ron y brandy, con un promedio de 209 g de alcohol por evento. La puntuación del AUDIT y los gramos de alcohol consumidos en una sesión de bebida nos permitieron categorizar claramente nuestra muestra en sujetos control y casos, que coincidieron en un 100%. La mayoría de estos últimos (>50%) podrían clasificarse como dependientes del alcohol. En cuanto al nivel socioeconómico, no encontramos diferencias entre los dos grupos, lo que representa la misma proporción de individuos de condición de clase media. La mayoría de los individuos que padecían alcohol-dependencia manifestaron el consumo de otras sustancias psicoactivas como marihuana y tabaco, con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control. Aunque el criterio de selección fue que la primera sustancia consumida fuera el alcohol, los consumidores de otras sustancias no fueron excluidos debido a la imposibilidad de encontrar bebedores exclusivos de alcohol (Tabla 2) [28].

Tabla 2. Características sociodemográficas de los participantes en el estudio [28].

Parámetro	Grupo de consumo problemático de alcohol, n (%)	Grupo de controles, n (%)	Consumo problemático de alcohol vs Controles (Valor p)
Edad: promedio \pm SD (años)	23,5 \pm 3,9	24,1 \pm 3,9	0,937 [#]
Rango etario (años)	18-35	20-37	

Parámetro		Grupo de consumo problemático de alcohol, n (%)	Grupo de controles, n (%)	Consumo problemático de alcohol vs Controles (Valor p)
Sexo	Hombres	18 (72)	11 (44)	0,085
	Mujeres	7 (28)	14 (56)	
Puntuación AUDIT				
Rango 0-7		0 (0)	25 (100)	0,000*
Rango >7		25 (100)	0 (0)	
Consumo de alcohol por evento (g, gramos)		209±92	37±25	0,000*
Edad de inicio de consumo de alcohol (años)				0,2971
<18		22 (88)	24 (96)	
>18		3 (12)	1 (4)	
Familiares con problemas de consumo de alcohol				0,390
Sí		9 (36)	12 (48)	
No		0 (0)	0 (0)	
No sabe, no responde		16 (64)	13 (52)	
Consumo de otras sustancias sicoactivas				0,000*
Sí		25 (100)	12 (48)	
No		0(0)	13 (52)	
Estrato socioeconómico				0,948
Bajo		7 (28)	6 (24)	
Medio		18 (72)	18 (72)	
Alto		0 (0)	1 (4)	

n= número de individuos.

*Diferencias estadísticamente significativas.

Análisis de varianza $p < 0,005$.

Con relación al ensayo de metilación de regiones promotoras de los genes seleccionados, la acumulación de diferencias entre C/T en los amplificados produce una diferencia en la relación masa/carga. Nuestros ensayos y los reportados en la literatura [51] mostraron que el ADN metilado migró más rápido que su contraparte no metilada. La figura 1S, muestra los electroferogramas típicos de fragmentos de ADN modificado con bisulfito y amplificado empleando iniciadores de PCR específicamente diseñados para tal fin. Se puede observar dos picos, el de mayor tamaño corresponde a ADN sin

metilar, es así como el segmento de *SNCA* generó un producto de tamaño en promedio de 450,6 pb; el *INFGRI* con un producto de 286,2 pb y *MIF* con un producto de 128,8 pb. Por otro lado, el primer pico, de menor tamaño corresponde al mismo segmento de ADN, pero metilado, con tamaños de 447,4; 284,7 y 125,5 pb, respectivamente (tabla 3, figura 1). Algunos de los productos de la PCR de este ensayo fueron sometidos a secuenciación, la figura 2S corresponden a electroferogramas de secuencia, se evidencia segmentos con metilación total y parcial, en este último caso dependiendo del porcentaje de islas CpG metiladas y su posición en los electroferogramas de secuencia se observa el solapamiento de los picos citosina (C) y timina (T). Optando por la electroforesis capilar, diseño ya probado previamente [47], nos muestra los tamaños de los fragmentos amplificados, lo cual dependerá del grado de metilación, aunque si estas diferencias son pequeñas o hay cambio de posición de los grupos metilados, más no en el número, no se podrán discriminar en el electroferograma.

Por otro lado, se calculó el tamaño de estos amplificados metilados y sin metilar teniendo en cuenta el aparente cambio de masa por la reacción, de acuerdo con Boyd *et al.* [51] en el contexto de análisis de metilación con bisulfito, la transición C/T resulta en aproximadamente 0,1 nucleótidos o par de bases (nt o pb) la diferencia en el cambio aparente de tamaño de los fragmentos y es aditiva. Los productos de PCR del ADN modificado con bisulfito que contenía más C, aparentemente más cortos migraron más rápido que los que contenían T, aunque podría presentarse alteraciones relacionadas con el tamaño de los amplificados (entre más grandes, más difícil su resolución) y la presencia de estructuras secundarias también puede alterar su interpretación, lo cual no fue nuestro caso. En la tabla 3 se observa la diferencia entre los segmentos metilados y no metilados experimentales y predichas, siendo mucho mayores en las predichas de *SNCA* e *INFGRI*, quizás una evidencia de la metilación parcial de las muestras y detectada en la secuenciación (ver figura 2S). Se observa claramente que la secuencia de segmentos de ADN de controles muestra mezcla de citosinas metiladas y sin metilar, lo que no se evidencia o es mucho menor en los casos.

Al promediar los resultados para el grupo de control y casos, se encontró que no había diferencias en estado de metilación del segmento del promotor rico en islas CpG del gen *INFGRI*, por lo cual no se utilizó en los subsiguientes análisis [28]. Se encontró diferencias estadísticamente significativas al analizar los segmentos del promotor rico en islas CpG de los genes *SNCA* y *MIF*, donde se evidencia más metilación en el grupo de casos de individuos con consumo problemático del alcohol (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de medias del tamaño de amplificadas de segmentos del promotor ricos en islas CpG de ADN modificado con bisulfito y corridos en electroforesis capilar de los genes *SNCA*, *INFGRI* y *MIF* en controles y casos de individuos con consumo problemático de alcohol. Entre más pequeños sean los segmentos significa mayor grado de metilación.

Gen	Distribución (Prueba Shapiro-Wilk)	Comparación varianzas (Prueba de Levene) Valor P	Comparación de medias del tamaño del ADN amplificado (test de U de Mann-Whitney), nt o pb [#]	Valor P
<i>SNCA</i>	Control: n=25 No Normal Alcohol:n=25 No Normal	0,040	449,35±0,44 448,82±0,46	0,000*
<i>INFGRI</i>	Control: n=25 No Normal Alcohol:n=25 No Normal	0,259	284,85±0,38 284,75±0,30	0,357
<i>MIF</i>	Control: n=25 No Normal Alcohol:n=25 No Normal	0,000*	125,15±0,08 124,69±0,61	0,009*

n= número de individuos.

pb: pares de bases.

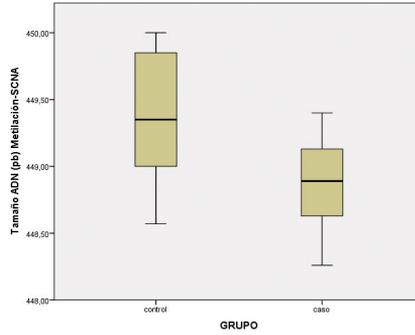
*Diferencias estadísticamente significativas $p < 0,005$.

Tabla 4. Tamaños de grupo de segmentos génicos amplificados experimentalmente y predichos de ADN metilado y no metilado corridos en electroforesis capilar.

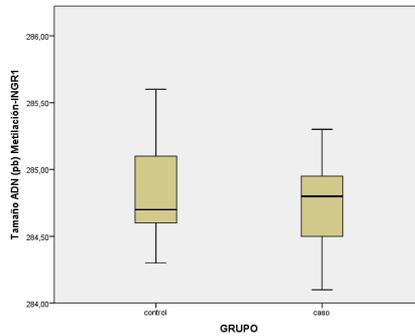
Gen	Número de islas CpG	Tamaños promedio de los amplificadas observados experimentalmente (nt, pb)*			Tamaños promedio de los amplificadas predichos teóricamente (nt, pb)*		
		ADN totalmente metilado	ADN sin metilar	Diferencia	ADN totalmente Metilado	ADN sin metilar	Diferencia
<i>SNCA</i>	23	447,4	450,6	3,2	441,7	446,3	4,6
<i>INFGRI</i>	25	284,7	286,2	1,5	290,5	295,5	5,0
<i>MIF</i>	9	125,2	128,8	3,6	131,1	132,9	1,8

*nt: nucleotido ó pb: pares de bases

a)



b)



c)

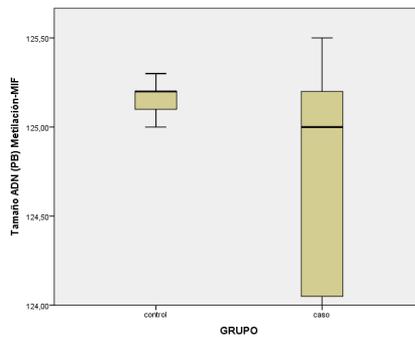


Figura 1. Tamaño de amplificadores de ADN modificado con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes *SNCA* (a), *INFGRI* (b) y *MIF*(c) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles y casos (consumo problemático de alcohol). Entre más pequeños sean los segmentos significa mayor grado de metilación. Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea que representa la mediana.

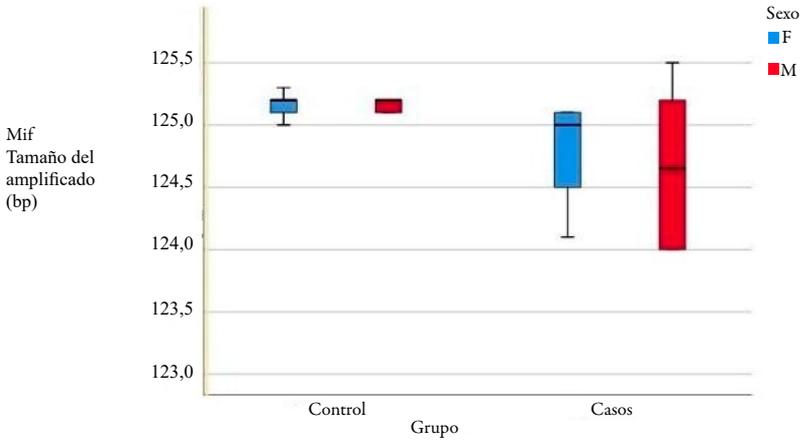
De acuerdo con los resultados de expresión [28], con relación al gen *MIF*, la transcripción relativa de ARNm disminuyó en los casos al igual que la proteína, como era de esperarse, y como se mostró arriba, el estado de metilación del promotor es mayor, lo cual se corresponde con lo esperado teóricamente, ya que la metilación de la región promotora de los genes conlleva disminución de la transcripción [52], y al producirse menos ARNm se sintetizará menos proteína, lo que es concordante con nuestros resultados. Por otro lado, en el caso del gen *SNCA*, no hubo cambios tanto en la transcripción relativa del ARNm como en la concentración proteica en la muestra general, aunque hubo diferencias estratificando por sexo (figura 2). Con relación al estado de metilación del segmento seleccionado del promotor de *SNCA* estaba más metilado en alcohol-dependientes, lo que no es concordante con los datos de expresión, aunque no hay que olvidar que la concentración de proteínas se determinó en plasma sanguíneo y los análisis de ARNm y estado de metilación del ADN se realizaron en células mononucleares de sangre, dos blancos sanguíneos diferentes, aunque son componentes de un mismo tejido y están muy interrelacionados (Tabla 5). De igual forma, debe considerarse las diferencias debidas al sexo de los participantes, pues el comportamiento de la expresión es distinto en hombres y mujeres, con aumento de ARNm y disminución de la concentración plasmática de *SNCA* en hombres [28].

Tabla 5. Comparación de medias de la medida de expresión relativa (adimensional) de ARNm en células mononucleares de sangre periférica y concentración de proteína en plasma (pg/mL), de los genes *SNCA* y *MIF* de controles y casos alcohol-dependientes [28].

Gen	Grupo	Promedio	Valor P
<i>MIF</i> n=50 mRNA	Control, n=25 Casos: Consumo problemático de alcohol, n=25	1,39±0,63 0,92±0,43	0,004*
<i>MIF</i> N=50 Proteína (pg/mL)	Control, n=25 Casos: Consumo problemático de alcohol, n=25	8898,34±5342,38 4391,42±1659,75	0,001*
<i>SNCA</i> n=50 mRNA	Control, n=25 Casos: Consumo problemático de alcohol, n=25	1,02±0,74 1,42±1,17	0,193
<i>SNCA</i> N=50 Proteína (pg/mL)	Control, n=25 Casos: Consumo problemático de alcohol, n=25	198,13±135,62 199,31±165,77	0,585

n= número de individuos. *Diferencias estadísticamente significativas $p < 0,005$.

a)



b)

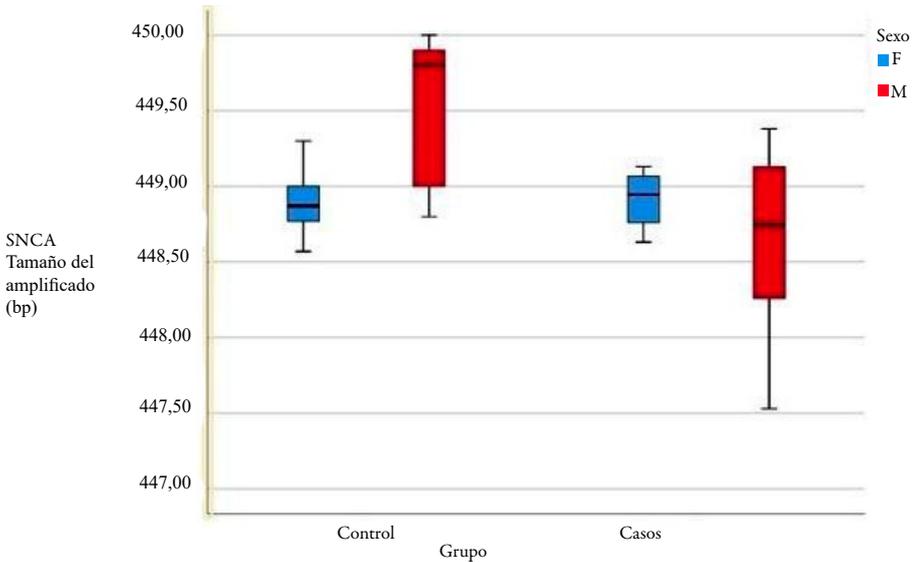


Figura 2. Tamaño de amplificadores de ADN modificados con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes *MIF* (a) y *SNCA* (b) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles y casos, estratificados por sexo. A mayor tamaño del amplificador, menor grado de metilación. Los datos se presentan como un diagrama de caja que muestra el rango de valores del 25 al 75 % con una línea que representa la mediana.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha evidenciado que polimorfismos en la región promotora de un gen y que diferencias del estado de metilación de las islas CpG de esta región en genes que las posean, están asociados con su expresión alterada [53]. En este trabajo encontramos que el segmento estudiado del promotor de los genes *SNCA* y *MIF* con secuencias CpG se encontraba más metilado en individuos con uso problemático del alcohol que en los controles, hecho previamente evidenciado para *SNCA* por Bonsch *et al.* [54] que indicarían disminución de la actividad transcripcional, lo que efectivamente se observó al analizar las tasas de transcripción y concentración proteica de MIF, y sin cambios para *SNCA* en la muestra general [55, 56]. Por otro lado, al estratificar por sexo se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres, siendo los casos de hombres los que presentan mayor grado de metilación para las regiones promotoras de los dos genes (ver figura 2) y menor expresión proteica. De igual forma, se encuentran diferencias en metilación si estratificamos por edad, en el rango de edad de 18 a 30 años en el promotor de MIF y *SNCA* que están más metilados en casos que en los controles (datos no mostrados) [27], lo que coincide parcialmente con lo encontrado por otros autores, pues los casos están más metilados, pero en el grupo de jóvenes y no en el de mayor edad, como otros autores lo han reportado [56], aunque hay que tener en cuenta que el gran porcentaje de individuos con problemas de consumo de alcohol de nuestro estudio, se sitúan en la franja etaria de menores de 30 años y aún no pertenecen al grupo de grandes bebedores, además, el grupo de bebedores de mayor edad es muy reducido.

El promotor de *MIF* no contiene caja TATA, contiene islas CpG (34, para ser más exactos) desde la posición +1 hasta -300 a las que se une el factor de transcripción SP1, de igual forma posee secuencias tipo CRE, c-Myb, AP-4 y AML-1A a las que se les une diversos factores de transcripción, aunque solo SP1 y CREB lo hacen de manera conjunta regulando constitutivamente la expresión de MIF [57]. De acuerdo con la literatura, la metilación de islas CpG proximales en MIF, es un evento muy raro y menos relacionado con su transcripción, siendo más probable que modificaciones de histonas como la acetilación, ubiquitinación, sumoilación, metilación y fosforilación intervengan en la remodelación de la cromatina y se constituyan en mecanismos epigenéticos fundamentales en la regulación de la expresión de MIF [58]. Para el caso del gen *SNCA* desde la posición +1 hasta -1500 encontramos alrededor de 70 islas CpG, región promotora a la cual se unen diversos factores de transcripción. Se ha hallado un factor de transcripción que se une a esa región y al intrón 1, una proteína con motivos de dedos de zinc (ZSCAN21) y existe otro factor, GATA2 que se une a la misma región reguladora y al intrón 2 regulando la expresión constitutiva del gen [58]. Para

este gen, las islas CpG se han metilado con la técnica de CRISPR-cas9 en líneas celulares en modelos *in vitro* de enfermedad de Parkinson, comprobando la disminución de su expresión [59].

La hipermetilación en estos genes *SNCA* y *MIF* podría explicarse por una alteración en la maquinaria de la metilación, es decir, en las DNMT, lo que parece ser más probable a la luz de recientes estudios. Un ejemplo de ello es la alteración de la actividad de las DNMT, claves en el proceso de metilación del promotor de los genes *reelina* y *BDNF* en el hipocampo durante la inducción de la plasticidad sináptica. Igualmente, el empleo de fármacos como la zebularina y 5-aza-2-deoxicitidina, inhibidores de DNMT, pueden bloquear este proceso de inducción [56, 60]. Por otro lado, la evidencia para el proceso contrario es más contundente, es ampliamente conocido como la avitaminosis y malnutrición que padecen los bebedores crónicos de alcohol y particularmente la deficiencia de folato y metionina necesarios para la síntesis de moléculas donantes de grupos metilo durante la metilación podrían explicar la hipometilación [25].

Los mecanismos epigenéticos son dinámicos y reversibles, agentes químicos que modifiquen la metilación del ADN y acetilación de las histonas en la cromatina podrían ser excelentes candidatos para intervenciones terapéuticas, incluso la identificación de patrones epigenéticos específicos asociados a patologías particulares podrían servir de biomarcadores para la detección, diagnóstico o intervenciones preventivas [37]. La hipermetilación de los promotores de *SNCA* y *MIF* podría constituirse en candidatos a biomarcadores de la enfermedad.

En esta área de investigación se encuentran numerosos trabajos con resultados contradictorios, algunos se han llevado a cabo en células de sangre, sin separar leucocitos de no leucocitos, sin conocer sus variaciones interindividuales. El nivel de metilación en el ADN de sangre periférica puede no reflejar lo que sucede en otros tejidos, específicamente en cerebro o células bucales, aunque algunos trabajos han mostrado su correspondencia [25, 61-63]. Faltan evidencias que relacionen las alteraciones en la metilación del ADN en los promotores y las tasas de transcripción y por ello la necesidad de realizar este tipo de ensayos.

Por otro lado, se han encontrado diferencias en estados de metilación del ADN al comparar grupos étnicos; igualmente, al comparar grupos etarios, a mayor edad, mayor grado de metilación; también hay diferencias entre sexos, los hombres presentan mayor grado de metilación que las mujeres; la exposición a sustancias químicas, hábitos alimenticios, el fumar, realizar ejercicio físico, el índice de masa corporal, y particularmente en un mismo individuo los patrones de metilación son tejido-dependientes. Por tanto, al realizar estudios de metilación se debe tener en cuenta todos los aspectos ante-

rios que generan confusión, todos ellos alteran los patrones de metilación del ADN tanto de controles como de casos. De igual forma, se ha evidenciado que la alteración del patrón de metilación del ADN en los bebedores de alcohol va a depender de la fase de la enfermedad por la que estén transcurriendo: tolerancia, ansiedad, abstinencia y si se tiene adicionalmente otras codependencias. Algunos autores, también afirman que las personas con alcoholismo exhiben una mayor aceleración de la metilación del ADN con el aumento en la edad en comparación con controles sanos en todos los tipos de tejidos estudiados [19, 25, 63-66].

En este trabajo hemos encontrado aumento en la metilación en segmentos del promotor de los genes *SNCA* y *MIF*, relacionada con la disminución en la expresión relativa de mRNA y proteína *MIF* en individuos del grupo de consumo problemático de alcohol, sin cambios en *SNCA* en la muestra general, aunque con cambios en hombres del grupo de casos, donde se observa concordancia con la expresión de proteína y no de mRNA, lo que se puede explicar quizás por eventos reguladores postranscripcionales o por la naturaleza de la muestra. Por lo tanto, las terapias epigenéticas con blancos en la respuesta inflamatoria podrían evaluarse para el manejo del alcoholismo, además que podrían constituirse en biomarcadores de diagnóstico y clasificación de subtipos de pacientes, además de ser determinados fácilmente mediante una “biopsia líquida” no invasiva. Teniendo en cuenta la importancia de caracterizar estas proteínas como posibles blancos terapéuticos, es fundamental realizar análisis bioinformáticos y funcionales adicionales para valorar mejor este papel [67]. Sería interesante a futuro realizar un estudio similar con una muestra de mayor tamaño, además de poder explorar otros aspectos epigenéticos del alcoholismo y particularmente la acetilación de histonas y la presencia de microRNA en pacientes con gran y prolongado consumo de alcohol.

AGRADECIMIENTOS

En parte, este trabajo fue apoyado por fondos de la Universidad Nacional de Colombia (código Hermes 34766). Queremos agradecer las contribuciones de Tania Martínez, por su apoyo en el trabajo con los voluntarios y pacientes. Su apoyo logístico fue fundamental. También hay que agradecer a los voluntarios que, con sus muestras biológicas y su participación en el diligenciamiento de formularios y cuestionarios, hicieron posible la investigación. Igualmente a los estudiantes de semillero y jóvenes investigadores que trabajaron arduamente en proyectos relacionados con el estudio genético de la dependencia del alcohol en Colombia.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Proyecto PRADICAN, *II Estudio Epidemiológico Andino sobre Consumo de Drogas en la Población Universitaria Informe Regional 2012*, Lima, 2013. 106 p. URL: https://www.comunidadandina.org/StaticFiles/20132718338Informe_Regional.pdf
2. A. Agrawal, M.T. Lynskey, Are there genetic influences on addiction: Evidence from family, adoption and twin studies, *Addiction*, **103**(7), 1069–1081 (2008). URL: <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2008.02213.x>
3. H. Zhang, A.I. Herman, H.R. Kranzler, R.F. Anton, H. Zhao, W. Zheng, *et al.*, Array-based profiling of DNA methylation changes associated with alcohol dependence, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **37**(s1), 108–115 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2012.01928.x>
4. T.B. Franklin, I.M. Mansuy, Epigenetic inheritance in mammals: Evidence for the impact of adverse environmental effects, *Neurobiology of Disease*, **39**(1), 61–65 (2010). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.012>
5. X. Lin, G. Lian, S. Peng, Q. Zhao, Y. Xu, D. S. Ou-Yang, *et al.*, Reversing epigenetic alterations caused by alcohol: A promising therapeutic direction for alcoholic liver disease, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **42**(10), 1863–1873 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1111/acer.13863>
6. A. Vagga, A. Meshram, L. Kanyal, K. Meshram, Gene expression regulation by epigenetic mechanism an emerging way in alcoholics, *International Journal of Current Research and Review*, **13**(3), 43–49 (2021). Doi: <http://doi.org/10.31782/IJCRR.2021.13302>
7. S. Higuchi, S. Matsushita, T. Masaki, A. Yokoyama, M. Kimura, *et al.*, Influence of genetic variations of ethanol-metabolizing enzymes on phenotypes of alcohol-related disorders, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1025**(1), 472–480 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1196/annals.1316.058>
8. M. López-Jiménez, M. Vega-García, P. Mallorquín, *Microarrays y Biochips de ADN*, Genoma, Madrid, España, 2002.

9. E. Daudén, Farmacogenética II. Métodos moleculares de estudio, bioinformática y aspectos éticos, *Actas Dermo-Sifiliograficas*, **98**(1), 3-13 (2007). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(07\)70002-9](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(07)70002-9)
10. X.T. Castro-Matiz, F.A. Aristizabal-Gutierrez, M. Rey-Buitrago, Determination of genetic polymorphism Taqia (Ankk1) Taqib (Drd2), -141c Ins/Del (Drd2) and 40 Bp Vntr (Slc6a3) in the Colombian population and evaluation of their associations with alcoholism, *Journal of Substance Abuse & Alcoholism*, **3**(4), 1039 (2015). URL: <https://www.jscimedcentral.com/public/assets/articles/substanceabuse-3-1039.pdf>
11. M. Rey, A. Gutiérrez, B. Schroeder, W. Usaquén, A. Carracedo, I. Bustos, *et al.*, Allele frequencies for 13 STR's from two Colombian populations: Bogotá and Boyacá, *Forensic Science International*, **136**(1-3), 83–85 (2003). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00221-4](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00221-4)
12. B. Tabakoff, L. Saba, M. Printz, P. Flodman, C. Hodgkinson, D. Goldman, *et al.*, Genetical genomic determinants of alcohol consumption in rats and humans, *BMC Biology*, **7**, 70 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-70>
13. D.F. Levey, H. Le-Niculescu, J. Frank, M. Ayalew, N. Jain, B. Kirlin, *et al.*, Genetic risk prediction and neurobiological understanding of alcoholism, *Translational Psychiatry*, **4**, e391 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1038/tp.2014.29>
14. G. Egervari, C.A. Siciliano, E.L. Whiteley, D. Ron, Alcohol and the brain: From genes to circuits, *Trends in Neurosciences*, **44**(12), 1004–1015 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.09.006>
15. H. Sohma, E. Hashimoto, T. Shirasaka, R. Sunematsu, H. Ozawa, K.W. Boissl, *et al.*, Quantitative reduction of type I adenylyl cyclase in human alcoholics, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1454**(1), 11–18 (1999). Doi: [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(99\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(99)00018-6)
16. M. Verma, S. Rogers, R.L. Divi, S.D. Schully, S. Nelson, J. Su, *et al.*, Epigenetic research in cancer epidemiology: Trends, opportunities, and challenges, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **23**(2), 223–233 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0573>
17. M. Girardot, R. Feil, D. Llères, Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications, *Epigenomics*, **5**(6), 715–728 (2013). Doi: <https://doi.org/10.2217/epi.13.66>

18. T. Tatarinova, *DNA Methylation - From Genomics to Technology*, InTech, Janeza, 2012. 402 p. Doi: <https://doi.org/10.5772/2159>
19. S.D. Shukla, S. Zakhari, Epigenetics: A new frontier for alcohol research, *Alcohol Research: Current Reviews*, **35**(1), 1–2 (2013). URL: <https://arcr.niaaa.nih.gov/media/896/download?inline>
20. S.L. Hagerty, L.C. Bidwell, N. Harlaar, K.E. Hutchison, An exploratory association study of alcohol use disorder and DNA methylation, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **40**(8), 1633–1640 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1111/acer.13138>
21. C. Liu, R.E. Marioni, A.K. Hedman, L. Pfeiffer, P.C. Tsai, L.M. Reynolds, *et al.*, A DNA methylation biomarker of alcohol consumption, *Molecular Psychiatry*, **23**(2), 422–433 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1038/mp.2016.192>
22. T. Hillemacher, C. Weinland, B. Lenz, T. Kraus, A. Heberlein, A. Glahn, *et al.*, DNA methylation of the LEP gene is associated with craving during alcohol withdrawal, *Psychoneuroendocrinology*, **51**, 371–377 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.10.014>
23. L. Zhou, X. Cheng, B.A. Connolly, M.J. Dickman, P.J. Hurd, D.P. Hornby, Zebularine: A novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases, *Journal of Molecular Biology*, **321**(4), 591–599 (2002). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00676-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00676-9)
24. G. Szabo, J. Petrasek, S. Bala, Innate immunity and alcoholic liver disease, *Digestive Diseases*, **30**(Suppl. 1), 55–60 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1159/000341126>
25. M.B. Terry, L. Delgado-Cruzata, N. Vin-Raviv, H.C. Wu, R.M. Santella, DNA methylation in white blood cells, *Epigenetics*, **6**(7), 828–837 (2011). Doi: <http://doi.org/10.4161/epi.6.7.16500>
26. Y. Wan, K. McDaniel, N. Wu, S. Ramos-Lorenzo, T. Glaser, J. Venter, *et al.*, Regulation of cellular senescence by miR-34a in alcoholic liver injury, *The American Journal of Pathology*, **187**(12), 2788–2798 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.027>
27. M. Rey-Buitrago, *Variantes genéticas, expresión génica, metilación y búsqueda de blancos terapéuticos en vías de respuesta inflamatoria en una muestra de población universitaria colombiana con problemas de consumo de alcohol*, Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, 2022. 231 p. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/84041>

28. M. Rey, F.A. Aristizabal, Inflammatory response genes differentially expressed in a Colombian university cohort with alcohol consumption problems, *Genetics and Molecular Research*, **22**(3), GMR19159 (2023). Doi: <https://doi.org/10.4238/gmr19159>
29. F.N. Emamzadeh, Alpha-synuclein structure, functions, and interactions, *Journal of Research in Medical Sciences*, **21**(1), 29 (2016). Doi: <http://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>
30. P. Janeczek, J.M. Lewohl, The role of α -synuclein in the pathophysiology of alcoholism, *Neurochemistry International*, **63**(3), 154–162 (2013). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.007>
31. P.J. Hamilton, E.J. Nestler, Epigenetics and addiction, *Current Opinion in Neurobiology*, **59**, 128–136 (2019). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.05.005>
32. S.G. Daniele, D. Béraud, C. Davenport, K. Cheng, H. Yin, K.A. Maguire-Zeiss, Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded α -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders, *Science Signaling*, **8**(376), ra45 (2015). Doi: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005965>
33. P. Janeczek, R.K. MacKay, R.A. Lea, P.R. Dodd, J.M. Lewohl, Reduced expression of α -synuclein in alcoholic brain: influence of SNCA -Rep1 genotype, *Addiction Biology*, **19**(3), 509–515 (2014). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2012.00495.x>
34. Y.O. Nunez, R.D. Mayfield, Understanding alcoholism through microRNA signatures in brains of human alcoholics, *Frontiers in Genetics*, **3**, 43 (2012). Doi: <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00043>
35. M.C. Petralia, E. Mazzon, K. Mangano, P. Fagone, R. Di Marco, L. Falzone, *et al.*, Transcriptomic analysis reveals moderate modulation of macrophage migration inhibitory factor superfamily genes in alcohol use disorders, *Experimental and Therapeutic Medicine*, **19**(3), 1755–1762 (2020). Doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8410>
36. G. Szabo, D. Catalano, G. Bellerose, P. Mandrekar, Interferon α and alcohol augment nuclear regulatory Factor- κ B activation in HepG2 cells, and interferon α increases pro-inflammatory cytokine production, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **25**(8), 1188–1197 (2001). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.rb02335.x>

37. C.C.Y. Wong, J. Mill, C. Fernandes, Drugs and addiction: An introduction to epigenetics, *Addiction*, **106**(3), 480–489 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03321.x>
38. A.J. Robison, E.J. Nestler, Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction, *Nature Reviews Neuroscience*, **12**(11), 623–637 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1038/nrn3111>
39. J.A. Wasielewski, F.A. Holloway, Alcohol's interactions with circadian rhythms - A focus on body temperature, *Alcohol Research and Health*, **25**(2), 94–100 (2001). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6707125/pdf/arcr-25-2-94.pdf>
40. G. Andrés, N. Ashour, M. Sánchez-Chapado, S. Ropero, J.C. Angulo, The study of DNA methylation in urological cancer: Present and future, *Actas Urológicas Españolas*, **37**(6), 368–375 (2013). Doi: <http://doi.org/10.1016/j.acuro.2013.03.001>
41. M. Fiore, F. Giampiero, How alcohol drinking affects our genes: An epigenetic point of view, *Biochemistry and Cell Biology*, **97**(4), 345–356 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0248>
42. A. Campo-Arias, M. Villamil-Vargas, E. Herazo, Confiabilidad y dimensionalidad del AUDIT en estudiantes de medicina, *Psicología desde el Caribe*, **30**(1), 21–35 (2013). URL: <http://www.scielo.org.co/pdf/psdc/v30n1/v30n1a03>
43. J.M. Ospina-Díaz, F.G. Manrique-Abril, N.E. Ariza, Confiabilidad y dimensionalidad del Cuestionario para Identificación de Trastornos Debidos al Consumo de Alcohol (AUDIT) en estudiantes universitarios de Tunja (Colombia), *Salud Uninorte* (Barranquilla), **28**(2), 276–282 (2012). URL: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v28n2/v28n2a10.pdf>
44. O. Scoppetta, A. Pérez-Gómez, C. Lanziano-Molano, Perfiles asociados al consumo de alcohol de adolescentes escolarizados mediante análisis de correspondencias múltiples, *Acta Colombiana de Psicología*, **14**(1), 139–146 (2011). URL: <http://scielo.org.co/pdf/acp/v14n1/v14n1a12.pdf>
45. M. Silla-Stoel, B. Rosón-Hernández, Evaluación del consumo de alcohol y diagnóstico de patrón de consumo, *Trastornos Adictivos*, **11**(3), 191–199 (2009). Doi: [https://doi.org/10.1016/S1575-0973\(09\)72411-0](https://doi.org/10.1016/S1575-0973(09)72411-0)

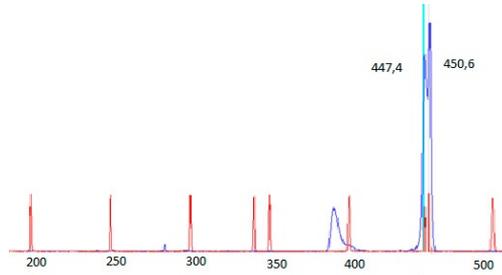
46. Canadian Centre on Substance Use and Addiction, *Knowing your limits with alcohol: A Practical Guide to Assessing Your Drinking*, CCSA.CCDUS, Canadá, 2019. 40 p. URL: https://www.ccsa.ca/sites/default/files/2019-08/CCSA-Knowing-Your-Limits-with-Alcohol-Guide-2019-en_0.pdf
47. X. Shi, J. Li, C. Zhao, S. Lv, G. Xu, Methylation analysis of hMLH1 gene promoter by a bisulfite-sensitive single-strand conformation polymorphism–capillary electrophoresis method, *Biomedical Chromatography*, **20**(8), 815–820 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1002/bmc.606>
48. J.G. Herman, J.R. Graff, S. Myöhänen, B.D. Nelkin, S.B. Baylin, Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**(18), 9821–9826 (1996). Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9821>
49. F. Sanger, A.R. Coulson, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase, *Journal of Molecular Biology*, **94**(3), 441–448 (1975). Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
50. S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Research*, **16**(3), 1215–1215 (1988). Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
51. V.L. Boyd, K.I. Moody, A.E. Karger, K.J. Livak, G. Zon, J.W. Burns, Methylation-dependent fragment separation: Direct detection of DNA methylation by capillary electrophoresis of PCR products from bisulfite-converted genomic DNA, *Analytical Biochemistry*, **354**(2), 266–273 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.04.009>
52. M. Nakao, Epigenetics: Interaction of DNA methylation and chromatin, *Gene*, **278**(1-2), 25–31 (2001). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00721-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00721-1)
53. B. Hoogendoorn, S.L. Coleman, C.A. Guy, S.K. Smith, M.C. O'Donovan, P.R. Buckland, Functional analysis of polymorphisms in the promoter regions of genes on 22q11, *Human Mutation*, **24**(1), 35–42 (2004). Doi: <https://doi.org/10.1002/humu.20061>
54. D. Bönsch, B. Lenz, J. Kornhuber, S. Bleich, DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in patients with alcoholism, *NeuroReport*, **16**(2), 167–170 (2005). URL: https://journals.lww.com/neuroreport/Abstract/2005/02080/DNA_hypermethylation_of_the_alpha_synuclein.20.aspx

55. D. Bönsch, B. Lenz, R. Fiszer, H. Frieling, J. Kornhuber, S. Bleich, Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism, *Journal of Neural Transmission*, **113**, 1299–1304 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0413-2>
56. A. Jowaed, I. Schmitt, O. Kaut, U. Wüllner, Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains, *The Journal of Neuroscience*, **30**(18), 6355–6359 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6119-09.2010>
57. T. Roger, X. Ding, A. Chanson, P. Renner, T. Calandra, Regulation of constitutive and microbial pathogen-induced human macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene expression, *European Journal of Immunology*, **37**(12), 3509–3521 (2007). Doi: <https://doi.org/10.1002/eji.200737357>
58. G. Suske, The Sp-family of transcription factors, *Gene*, **238**(2), 291–300 (1999). Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00357-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00357-1)
59. B. Kantor, L. Tagliaferro, J. Gu, M. E. Zamora, E. Ilich, C. Grenier, *et al.*, Down-regulation of SNCA expression by targeted editing of DNA methylation: A potential strategy for precision therapy in PD, *Molecular Therapy*, **26**(11), 2638–2649 (2018). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.019>
60. J.M. Levenson, T.L. Roth, F.D. Lubin, C.A. Miller, I. Huang, P. Desai, *et al.*, Evidence that DNA (Cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus, *Journal of Biological Chemistry*, **281**(23), 15763–15773 (2006). Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M511767200>
61. R. Zhang, Q. Miao, C. Wang, R. Zhao, W. Li, C.N. Haile, *et al.*, Genome-wide DNA methylation analysis in alcohol dependence, *Addiction Biology*, **18**(2), 392–403 (2013). Doi: <https://doi.org/10.1111/adb.12037>
62. Z.Z. Zhu, L. Hou, V. Bollati, L. Tarantini, B. Marinelli, L. Cantone, *et al.*, Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: A combined analysis, *International Journal of Epidemiology*, **41**(1), 126–139 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1093/ije/dyq154>
63. S.L. Hagerty, L.C. Bidwell, N. Harlaar, K.E. Hutchison, An exploratory association study of alcohol use disorder and DNA methylation, *Alcohol Clinical & Experimental Research*, **40**(8), 1633–1640 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1111/acer.13138>

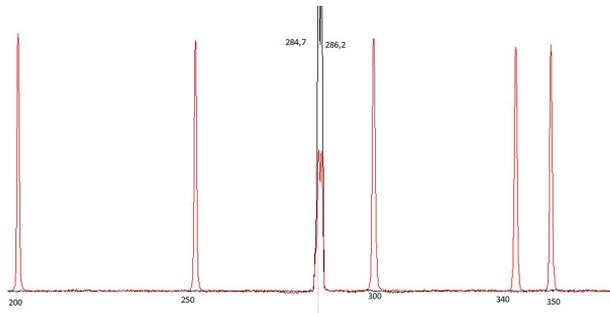
64. A.D. Rosen, K.D. Robertson, R.A. Hlady, C. Muench, J. Lee, R. Philibert, *et al.*, DNA methylation age is accelerated in alcohol dependence, *Translational Psychiatry*, **8**, 182 (2018). Doi: <http://doi.org/10.1038/s41398-018-0233-4>
65. H. Xu, F. Wang, H.R. Kranzler, J. Gelernter, H. Zhang, Alcohol and nicotine codependence-associated DNA methylation changes in promoter regions of addiction-related genes, *Scientific Reports*, **7**, 41816 (2017). Doi: <https://doi.org/10.1038/srep41816>
66. H.R. Elliott, K. Burrows, J.L. Min, T. Tillin, D. Mason, J. Wright, *et al.*, Characterisation of ethnic differences in DNA methylation between UK-resident South Asians and Europeans, *Clinical Epigenetics*, **14**, 130 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01351-2>
67. M. Rey, F.A. Aristizabal, Computational analysis of potential therapeutic targets in the inflammatory pathway for alcoholism, *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, **8**(6), 1960–1975 (2023). Doi: <https://doi.org/10.35629/7781-080619601975>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

a)



b)



c)

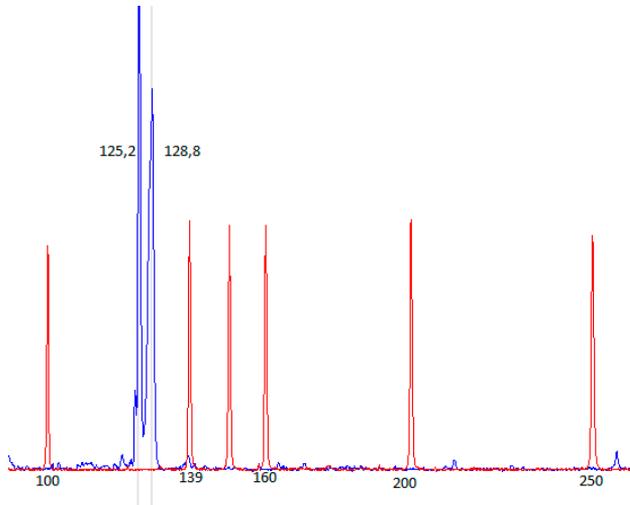


Figura 1S. Electroferogramas de amplificandos de genes seleccionados: SNCA (A), INFR1 (B) y MIF (C) que muestra el estado de metilación del segmento del promotor rico en islas CpG; el primer pico de cada figura corresponde a ADN control totalmente metilado mientras el segundo corresponde al mismo segmento sin metilar.

C)



Figura 2S. Electroferogramas de secuencia de amplificadores de ADN modificados con bisulfito de segmentos promotores ricos en islas CpG de los genes SNCA (A, B), INFGRI (C, D) y MIF (E, F) en lisado de células mononucleares sanguíneas de controles (primera imagen) y casos (segunda imagen). No olvidar: R=A o G; Y=C o T; K= T o G, W= A o T.

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

M. Rey Buitrago, F.A. Aristizábal-Gutiérrez, Estado de metilación de regiones promotoras de tres genes de respuesta inflamatoria en una muestra de colombianos con problemas de consumo de alcohol: un estudio exploratorio, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 114-144 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.110956>