

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**EVALUACIÓN DEL ESTADO DE METILACIÓN DEL COMPLEJO
MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE 1, C (HLA-C) Y SU
POSIBLE CORRELACIÓN CON EL ESTADO NUTRICIONAL DE
MADRES E INFANTES KICHWA EN ECUADOR**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÁSTER
EN BIOCENCIAS APLICADAS CON MENCIÓN EN
BIODESCUBRIMIENTO**

Ing. ERICK GONZALO VELASTEGUÍ PEÑAFIEL

DIRECTOR: ANDREA ORELLANA MANZANO Ph.D.

CODIRECTOR: EDWIN VERA Ph.D.

Quito, febrero 2024

© Escuela Politécnica Nacional (2023)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Erick Gonzalo Velasteguí Peñafiel, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Erick Gonzalo Velasteguí Peñafiel

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente trabajo fue desarrollado por la Ing. Erick Gonzalo Velasteguí Peñafiel, bajo nuestra supervisión.

Andrea Orellana Manzano Ph.D.
DIRECTOR DE PROYECTO

Edwin Vera Ph.D.
CODIRECTOR DE PROYECTO

AGRADECIMIENTO

A mi tutora de tesis Dra. Andrea Orellana por inspirar e instruir en mi crecimiento profesional y personal, por confiar en mi este maravilloso proyecto y orientar mi camino como en la ciencia.

A mi cotutor de tesis Dr. Edwin Vera por acompañarme desde el comienzo de la maestría y por demostrar siempre ese interés por desarrollar nuevos proyectos inspirando a futuros investigadores.

A la Dra. Mindy Muñoz por ser una tutora más en este proyecto y compartir conmigo su conocimiento siempre con una sonrisa

Al Dr. Wim Vanden Berghe por permitirme viajar por primera vez a otro lugar del mundo y aprender de ciencia de los mejores. Por demostrarme el tipo de científico y de persona que quiero ser el resto de mi vida.

A mi compañera María José Muentes por ser la mejor amiga que pude encontrar en esta maestría.

A mi familia y amigos por siempre ser una fuerza de motivación

A la Escuela Politécnica Nacional, la Escuela Politécnica del Litoral y al proyecto VLIR-Network por permitirme estudiar esta maestría gracias al programa de becas. Sin esta ayuda: mi educación, el desarrollo de este proyecto y la publicación de los artículos que derivaron del mismo hubieran sido imposibles.

DEDICATORIA

Por ser siempre fuente de inspiración y valentía, aún a la distancia

Para mi madre y mi hermana

Por ser la mejor compañía y decisión

Para mi gatita Mapacha

Evaluación del estado de metilación del complejo mayor de histocompatibilidad clase 1, C (HLA-C) y su posible correlación con el estado nutricional de madres e infantes Kichwa en Ecuador

RESUMEN: Las alteraciones epigenéticas han demostrado tener un alto impacto en la salud y el desarrollo de un individuo, en este artículo analizamos por primera vez los niveles y patrones de metilación del exón 1 de HLA-C en población Kichwa de Ecuador, mediante muestras de saliva obtenidas en 2 tiempos en un intervalo de 8 meses y secuenciadas con tecnología nanopore. Encontramos que no existe diferencia significativa en los porcentajes de metilación en el exón 1 de HLA-C de madres e hijos tras 18 meses de lactancia y vida respectivamente, sin embargo, encontramos que los infantes tienden a aumentar su nivel de metilación en los 2 primeros años de vida mientras que las madres tienden a disminuirlo tras los 2 primeros años de lactancia. Al comparar los niveles de metilación entre madres e infantes encontramos que en T1 existe diferencia significativa (p-value: 0,0148) pues las madres tienen en promedio $\bar{X}= 2,06\%$ y los infantes $\bar{X}=1,57\%$ mientras para T2 no se mantiene esta diferencia. También identificamos que a lo largo de los 122pb que comprenden el exón 1 de HLA-C, las citosinas 32-33, 43-44 & 96-97 conservan los patrones de metilación en tiempo y herencia. Por último, encontramos que existe una correlación entre la deficiencia de vitamina D y el aumento de metilación en infantes, para las demás variables no se encontró correlación entre el estado nutricional y los niveles de metilación del exón 1 de HLA-C.

Palabras clave: HLA-C, epigenética, nutrición, metilación, herencia genética

Evaluation of the methylation status of the major histocompatibility complex class 1, C (HLA-C) and its possible correlation with the nutritional status of Kichwa mothers and infants in Ecuador

ABSTRACT: Epigenetic alterations have been shown to have a high impact on the health and development of an individual, in this article we analyze for the first time the levels and patterns of methylation of exon 1 of HLA-C in Kichwa population of Ecuador, using saliva samples obtained at 2 times in an interval of 8 months and sequenced with nanopore technology. We found that there is no significant difference in the percentages of methylation in exon 1 of HLA-C of mothers and children after 18 months of lactation and life respectively, however, we found that infants tend to increase their methylation level in the first 2 years of life while mothers tend to decrease it after the first 2 years of lactation. When comparing methylation levels between mothers and infants we found that at T1 there is significant difference (p-value: 0.0148) as mothers have on average $\bar{X}= 2.06\%$ and infants $\bar{X}=1.57\%$ while for T2 this difference is not maintained. We also identified that along the 122bp comprising exon 1 of HLA-C, cytosines 32-33, 43-44 & 96-97 retain methylation patterns in time and inheritance. Finally, we found that there is a correlation between vitamin D deficiency and increased methylation in infants, for the other variables no correlation was found between nutritional status and HLA-C exon 1 methylation levels.

Keywords: HLA-C, epigenetic, nutrition, methylation, inheritance

1. INTRODUCCIÓN

“El estudio de todos los eventos que llevan al desenvolvimiento y desarrollo genético” fue el primer concepto de epigenética acuñado por Conrad Hal Waddington hace más de 80 años, allí identifica la correlación entre la naturaleza cambiante de los genes y el medio ambiente en el que se desarrolla un individuo y cómo estos conducen a cambios en el fenotipo de las especies (1). Curiosamente el objetivo de Waddington era encontrar el vínculo entre tres ramas de la ciencia: Genética, Embriología y Evolución, aún sin conocer las propiedades moleculares del DNA pues sólo teorizó que las “fuerzas ambientales” deben influenciar la herencia; con el tiempo los estudios fueron concluyentes respecto a la plasticidad del genoma y cómo este responde a estímulos ambientales que desembocan en la evolución de un organismo a lo largo de la historia (2). Encontrar el vínculo entre el estilo de vida de un individuo, las alteraciones epigenéticas que esto desencadena y cómo se pueden transmitir a la descendencia estas alteraciones, es una tarea desafiante pero crucial para entender posibles patologías hereditarias causadas por fenómenos epigenéticos como la metilación.

En este estudio presentamos por primera vez el estado de metilación del exón 1 del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, C (HLA-C) en madres y sus infantes analizando el comportamiento del porcentaje de citosinas metiladas a lo largo de 8 meses de crecimiento y envejecimiento celular a partir de muestras de saliva tomadas en T1: niños de 6 a 8 meses y madres entre 16 a 41 años de la cultura Kichwa en la Amazonía de Ecuador y T2: 8 meses después a los mismos individuos, contrastando estos datos genéticos con el estado nutricional de los sujetos de estudio.

Epigenética, Nutrición y Herencia:

Hoy en día denominamos “Epigenética” a las alteraciones de origen extranuclear, extracelular, psicológico o social que afectan la actividad genética sin modificar la secuencia estructural de ADN de un individuo, condicionando el nivel de expresión de una región específica del genoma debido a estructuras químicas con la capacidad de compactar el ADN (histonas de cromatina o la remodelación de la cromatina), y moléculas con afinidad al ADN como micro-ARN, acetilación o metilación, que pueden estar tanto en regiones promotoras como estructurales de un gen (3–5).

El epigenoma es el conjunto de todas las modificaciones epigenéticas que posee un individuo y que afectan la forma y nivel en que se expresan los genes, pero a diferencia del genoma cuyas variantes pueden generar alteraciones ampliamente conocidas para la ciencia actual, el panorama de influencia del epigenoma tiene una variedad de efectos en los organismos aún desconocida, pero se estima que su influencia es tal que condiciona el desarrollo, envejecimiento (reloj epigenético), comportamiento y susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, infecciosas y cáncer (6–12).

La amplia evidencia reciente sugiere que las modificaciones epigenéticas podrían ser igual o incluso más relevantes que las variaciones estructurales del ADN (13). Uno de los

fenómenos epigenéticos más estudiados por su relevancia e impacto en patologías de interés en la salud pública global es la metilación del ADN, que ha sido vinculadas como principal detonante, causal o generador de susceptibilidad de: Alzheimer, psoriasis, Parkinson, diabetes, cáncer, etc. (5,14). Estos grupos metilo que se unen covalentemente a la citosina del ADN generan patrones de silenciamiento que pueden ser heredados a través de mitosis y meiosis celular (15). Los estudios en herencia de patrones de metilación por línea materna son particularmente escasos, pues durante la fecundación el genoma de células reproductivas paternas se desmetila en gran medida antes de la primera división celular y sólo el genoma materno conserva la mayoría de citosinas metiladas que se transfieren por acción de la metiltransferasa (DNMT1) con ayuda de DNMT3A & DNMT3B (16). Aún así, durante la embriogénesis se borra una gran parte de la metilación del ADN del feto por acción de: diez-once translocasas (TET), glicosilasa ADN-timina (TDG) y enzimas que modifican las histonas, pero existen regiones donde la metilación se mantiene estable nuevamente por la acción de la metiltransferasa (DNMT1) (15,17), tal como se observa en la **figura 1**. Esta particularidad a mantener y heredar ciertas regiones del ADN metiladas entre generaciones de línea materna, ha sido estudiada en eventos históricos como el que ocurrió en 1944 en el conocido "Hungerwinter" en Europa, particularmente en los Países Bajos, en el que se privó de alimentos a gran parte de la población causando miles de muertes, pero aquellas madres gestantes que sobrevivieron a este evento alteraron el epigenoma de su descendencia, generando tendencias patológicas como síndrome metabólico y obesidad en sus hijos y nietos, pues los niveles de metilación en un feto condicionarán su metabolismo y desarrollo temprano (18). También se identificó un alto índice de cáncer de mama en los descendientes de los sobrevivientes del "Hungerwinter" (19).

En la actualidad, es ampliamente conocido que el desarrollo humano y las distintas enfermedades que se presentan a lo largo de la vida de una persona, están estrechamente ligadas e influenciadas por aspectos genéticos y ambientales (19). Factores como el tabaquismo, consumo desmedido de bebidas alcohólicas, inactividad física, el clima, la contaminación y sobre todo la nutrición pueden determinar la aparición de enfermedades crónicas a través de mecanismos epigenéticos (20). Dentro de todos los factores mencionados, la nutrición podría ser el más representativo e importante, pues es al que estamos constantemente expuestos y puede variar continuamente dependiendo de las necesidades, preferencias o disponibilidad alimenticia de cada región (21). Los cambios nutricionales temporales pueden dejar marcas epigenéticas en las células, esto ocasionará consecuencias y determinará la expresión de genes como respuesta a factores o señales ambientales futuras condicionando la salud del individuo al añadir grupos metilo al genoma (22) (19).

La relación entre la nutrición y el desarrollo de enfermedades ha sido reportada a lo largo de la historia. Algunos factores pueden influir en el desarrollo humano por la exposición a condiciones adversas desde el útero; la escasez de alimentos o la hambruna episódica de la madre durante el embarazo han sido asociadas a cambios epigenéticos intergeneracionales

(23). El desarrollo del feto y los primeros años de vida son etapas cruciales que se caracterizan por un crecimiento acelerado y el desarrollo de todos los órganos y sistemas (22), es por eso que la correcta ingesta de alimentos y una nutrición adecuada pueden ser factores críticos durante el periodo gestacional y posnatal; si los hábitos alimenticios son saludables se evitan cambios epigenéticos y por ende enfermedades crónicas futuras para la madre y el infante (24).

Se han realizado varias investigaciones que señalan la importancia de una nutrición adecuada de las madres durante el embarazo para evitar efectos desfavorables en la salud de los infantes en un futuro, (25) estos estudios señalan que los carbohidratos son indispensables en la dieta de la madre y una disminución de estos puede provocar sobrepeso en la infancia de los hijos. Además, algunas deficiencias metabólicas en la infancia pueden estar originadas por una exposición prolongada del feto a abundancia de lípidos, esto ocasionará un crecimiento excesivo del feto y posterior obesidad infantil (25). También, se ha reportado que en el periodo neonatal temprano, el zinc como nutriente dietético es indispensable en la leche materna y su deficiencia puede ocasionar problemas importantes de salud, alterando específicamente la función inmunológica y extendiendo su influencia al provocar efectos epigenéticos que alteran la expresión de los genes a lo largo de varias generaciones (26). La desnutrición materna puede tener una influencia directa sobre el epigenoma fetal por la ingesta carente de otros nutrientes indispensables como el folato, la betaína, metionina, y otros elementos antioxidantes y bioactivos (27). Un vínculo directo entre las particularidades ambientales, herencia epigenética y la tendencia patológica de la descendencia se observó en un estudio en Gambia- África, en mujeres que durante la época de lluvias poseían un déficit nutricional significativo que afectaba al epigenoma de su descendencia aumentando los niveles de metilación (19,28). Algunos componentes nutritivos ricos en fibra, antioxidantes, vitaminas B y D, ácidos grasos ω -3 y polifenoles, consumidos durante la nutrición materna y el desarrollo temprano, están asociados con un envejecimiento epigenético más lento, por el contrario, el envejecimiento epigenético prematuro está asociado directamente con dietas alimenticias basadas en grasas, grasas saturadas y ácidos grasos ω -6 (27).

Además de todo lo mencionado, existen otras enfermedades que pueden generar complicaciones tanto para la madre como para su descendencia por la nutrición y calidad de alimentación; una de ellas es la “Diabetes Mellitus Gestacional”, una condición metabólica muy frecuente durante el embarazo y se ha reportado evidencia sobre las modificaciones epigenéticas como respuesta a componentes nutricionales y factores ambientales que pueden conducir a la hiperglucemia materna durante el embarazo (29). Por otro lado, varios nutrientes tienen especial relación con el desarrollo del Alzheimer por la función que cumplen en el desarrollo y funcionamiento del cerebro, algunos elementos nutritivos están asociados con la síntesis de neurotransmisores, la modulación de mecanismos epigenéticos y su participación como antioxidantes (30). La hipertensión en una edad adulta puede ser atribuida entre otros factores a la desnutrición proteica materna durante las etapas fundamentales del desarrollo humano como son el embarazo,

la lactancia y la primera infancia (31). Varios estudios han reportado que las disfunciones cardiovasculares y renales podrían estar vinculadas a la desnutrición proteica materna (31). Se ha demostrado que esta desnutrición materna altera la presión arterial a través de mecanismos que incluyen modificaciones epigenéticas que pueden conducir a la hipertensión en una etapa adulta de la vida (31).

Es conocido que el desequilibrio nutricional puede conducir eventualmente a enfermedades en la edad adulta como hígado graso: patología ligada a la acumulación de varios factores epigenéticos como la metilación del ADN, la modificación covalente de las histonas y la expresión del ARN no codificante; sin embargo recientemente se ha ligado estos problemas con nutrición materna deficiente durante el proceso de gestación afectando directamente cómo se metaboliza la glucosa y lípidos en la descendencia (32).

Se estima que la memoria epigenética de un individuo condiciona el fenotipo de su descendencia, esto por motivos evolutivos que se transmitirán de una generación a otra de manera directa y en muchos casos se mantendrán durante varias generaciones (33). Sin duda el estilo de vida, nutrición y estrés que tenga una madre afectará su epigenoma, pero aún existe un desconocimiento sobre las regiones que se mantienen metiladas durante el proceso de embriogénesis y que conservan estos patrones o niveles de metilación intergeneracional. Regiones del ADN con genes que poseen una alta cantidad de islas CpG susceptibles a metilación, a la vez que tengan relevancia en un amplio espectro de patologías son interesantes candidatos para estas investigaciones que buscan profundizar el conocimiento en base a la herencia epigenética, aquí consideramos al complejo mayor de histocompatibilidad clase I, C (HLA-C) un modelo de investigación para contribuir al entendimiento de la herencia del epigenoma.

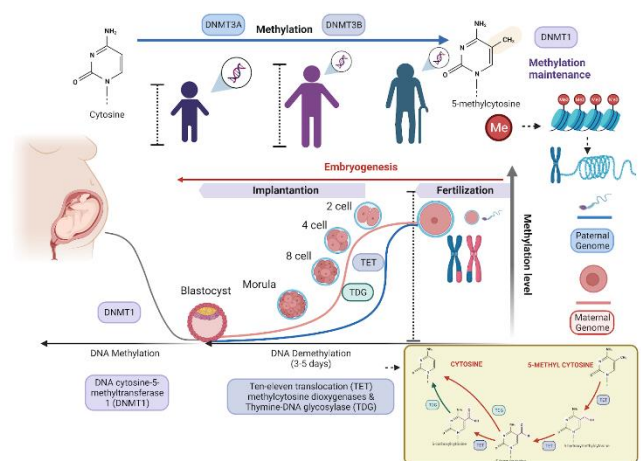


Figura 1. Proceso de herencia de los patrones de metilación por línea materna.

HLA-C, función y herencia:

El complejo mayor de histocompatibilidad clase I, C es miembro del complejo de antígeno leucocitario humano (HLA) y participa en el mecanismo de respuesta inmunitaria

innata interactuando con células NK (“Natural killers”) con sus receptores KIR y T CD8 + e indirectamente con células T CD4+ (34). HLA-C codifica una glicoproteína que se localiza en la membrana de la mayoría de grupos celulares del organismo, incluyendo plaquetas y eritrocitos maduros(35) y es clave en la respuesta inmunitaria contra patógenos bacterianos y virales, en patologías como cáncer, enfermedades autoinmunes como lupus, psoriasis, artritis, osteoartritis, colangitis esclerosante, desórdenes inflamatorios como miopatía inflamatoria, en el rechazo o aceptación de órganos y tejidos, preeclampsia en mujeres embarazadas, enfermedades reumáticas e inclusive en alopecia areata (36). HLA-C se expresa menos a lo largo de la vida de un humano en comparación a los demás miembros de la clase I (HLA-A y HLA-B) (37), posee 8 exones y un 18,3% de islas CpG y 66,1% de Guanina-Citosina por lo que se estima que es susceptible a fenómenos epigenéticos de silenciamiento como la metilación especialmente en los exones 1, 2 y 3 (36).

Recientemente se ha encontrado que existe una expresión genética diferencial de HLA-C, entre madres e infantes con diagnóstico de enfermedades mentales e intelectuales infantiles, presuntamente causados por estrés oxidativo inducido por autofagia o enfermedades virales durante el embarazo (38). Esto plantea la importancia del ambiente prenatal para la estabilidad genética de HLA-C y sus niveles de expresión en la descendencia, aun así este tipo de estudios respecto a la herencia de HLA-C son muy limitados, por otro lado en cuanto a funcionalidad en la etapa de gestación, se considera a HLA-C como el único gen del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que se expresa en la matriz entre el feto y la madre y participa activamente en el ciclo celular desencadenando el crecimiento placentario, sin embargo, para que este crecimiento sea el correcto debe existir una adecuada disponibilidad nutricional (39). Además, HLA-C es el único miembro del complejo mayor de histocompatibilidad que actúa como un inmunoregulator durante la migración de trofoblastos del recubrimiento uterino en dirección al endometrio, proceso crucial en la gestación (39) (40). HLA-C y sus niveles de expresión son de gran relevancia inmunitaria, patológica y hereditaria, aun así es el miembro principal menos estudiado dentro del complejo de antígeno leucocitario humano HLA, y no existen estudios previos respecto a si HLA-C es desmetilado durante la embriogénesis del feto o si por el contrario sus patrones de metilación son heredados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio planteamos el primer acercamiento sobre la herencia del epigenoma en el complejo mayor de histocompatibilidad clase I, C en una región de alto contenido de GC (exón 1). Presentamos el primer estudio epigenético en población ecuatoriana.

Muestras y consideraciones éticas

Este estudio forma parte el proyecto: “Estudio longitudinal antropológico sobre Patrones Alimentarios, Estado Nutricional y Estado de Salud de Madres Lactantes y sus infantes de comunidades Kichwa de Ecuador, utilizando

secuenciación de saliva y mucosa” de la Escuela Politécnica del Litoral (ESPOL), proyecto que fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos CEISH (2021-159E) de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) de Ecuador. Particularmente para este estudio se obtuvieron muestras de saliva con el kit DNA y RNA Oragene kit OG-500 a un total de 6 mujeres de la comunidad Kichwa y sus 6 neonatos a finales de 2019 (T1) y 15 meses después a comienzos de 2021 (T2).

Los individuos no comieron, bebieron, fumaron o se cepillaron los dientes 30 minutos previo a la toma de muestras tal como recomienda el fabricante Oragene, se obtuvo un mínimo de 2 ml de saliva y en el caso de los niños se estimuló la producción de ésta masajando suavemente el exterior de las mejillas, protocolo descrito y aprobado por el CEISH (2021-159E).

Sujetos

Las mujeres participantes tenían entre 16 y 41 años de edad, y los infantes entre 1 y 6 meses en el primer muestreo, considerado en adelante como T1, y 8 meses después en el segundo muestreo, considerado en adelante como T2. Todos los individuos eran miembros de la comunidad indígena Kichwa desde dos o más generaciones, situada en la Amazonía de Ecuador, en la provincia de Napo, en el perímetro de la ciudad de Tena. Los datos antropométricos fueron registrados por personal de ESPOL. Durante la toma de muestras en T1 y T2, registraron la edad, el peso, la talla, el índice de masa corporal, el porcentaje y diagnóstico de grasa, el porcentaje de músculo, el riesgo cardiovascular, la ferritina, la vitamina D y el hematocrito de las madres, y la edad, la talla, el peso, la ferritina, la vitamina D y el hematocrito de los lactantes, estos datos se encuentran detallados en el **Anexo 1**.

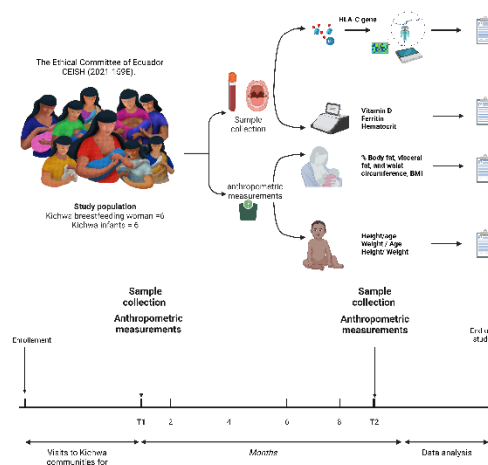


Figura 2. Metodología de obtención y secuenciación de muestras de población Kichwa.

Diseño de primers y protocolo de amplificación HLA-C:

Se buscó y descargó la secuencia completa de HLA-C desde el “UCSC Genome Browser” (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) con genoma humano de referencia GRCh38/hg38. Se observó que la mayor concentración de G-C se encontraba en los 3 primeros exones del gen. Posteriormente se diseñaron los primers con la herramienta EpiDesigner utilizando los ajustes: Primer Tm (Min 56°C, Opt

62°C, Max 64°C); Primer Size (Min 20b, Opt 25b, Max 30b); Product Size (Min 100b, Opt 300b, Max 500b); Product CPGs (4); Primers non-CPG “C” (4), para la secuencia de los exones 1, 2 y 3 de HLA-C. Los primers seleccionados fueron aquellos que comprendía el exón 1 de HLA-C y se describen en la Tabla 1.

Primers de HLA-C	Secuencia
A: Forward	TTGGGTGTCGGGTTTATAGAG
A: Reverse	ACTCCCCGAATCCTACGC
B: Forward	TTGGGTGTTGGGTTTATAGAG
B: Reverse	AACTCCCCAAATCCTACAC
C: Forward	TTTGGATTTATTTAAGGTGGATTTG
C: Reverse	TCTAAAAAATATAAACCCCTAACCCC
D: Forward	GGGGTTAGGGTTTATATTTTTTATAGA
D: Reverse	CCTCCAAATAAACTCTCAACTACTCC

Tabla 1. Primer diseñados para estandarizar el protocolo de extracción, conversión con bisulfito y amplificación de HLA-C

La efectividad de los primers fue evaluada en 5 líneas celulares HaCat, HeLa, HeK-293 y 2 líneas adicionales de limfoblastos L1 (TRI399) y L2 (TRI548). El ADN fue extraído con el kit DNeasy Blood & Tissue Kits. El ADN obtenido fue convertido con bisulfito con Ez DNA methylation kit de Zymo Research y la PCR realizada con PyroMark PCR Kit de QIAGEN en las siguientes condiciones:

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo (segundos)
Iniciación	1	95 °C	15
Desnaturalización	45	94 °C	30
Alineamiento		56 °C	30
Elongación		72 °C	10.5

Tabla 2. Condiciones de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

Fueron seleccionados los primers D: Forward y Reverse con las secuencias GGGGTTAGGGTTTATATTTTTTATAGA y CCTCCAAATAAACTCTCAACTACTCC respectivamente que se acoplaron de mejor manera al exón 1 de HLA-C descritos en la **tabla 1** bajo las condiciones de la **tabla 2**.

Procesamiento de muestras HLA-C de madres e infantes:

El ADN de las 12 muestras: de madres e infantes de T1 y las 12 muestras tomadas a las mismas madres e infantes en T2 fueron extraídos con el kit PrepIT de los tubos Oragene kit OG-500 con muestras de saliva. Las concentraciones de ADN extraído de cada individuo fueron medidas con Qbit y se calculó el volumen necesario hasta obtener 300 ng de ADN de cada muestra para la conversión con bisulfito con el Kit QIAGEN EpiTect Bisulfite para transformar las citosinas no metiladas en uracilo, manteniendo solamente las citosinas que

tenían un grupo metilo en el ADN. Tras este proceso se volvió a medir las concentraciones de ADN con Nanodrop y se calculó el volumen para obtener 25 ng de ADN para la reacción en cadena de la polimerasa que se hizo con PyroMark PCR Kit de QIAGEN según las especificaciones del fabricante. En este punto los uracilos obtenidos de la conversión con bisulfito son reemplazados por timinas durante la elongación de la PCR. Se corroboró por electroforesis la amplificación de la región del exón 1 de HLA-C. Los cálculos y diluciones de la extracción, PCR y electroforesis de HLA-C exón 1 para cada una de las 24 muestras están descritos en el **Anexo 2**.

Tras corroborar la amplificación de HLA-C en cada una de las 24 muestras se preparó la librería para la secuenciación con tecnología nanopore en equipo MinION Mk1C con el kit de Barcode 96. Para la preparación de esta librería se calculó el volumen necesario para obtener 50 ng de ADN de cada muestra (4,66 µl en promedio), se completó hasta 9 µl con agua ultrapura, se añadió 1 µl de barcode diferente para cada una de las muestras y se preparó las librerías según las especificaciones del kit barcode 96. Los cálculos y el barcode utilizado en cada muestra se pueden ver en el **Anexo 4**. Una vez preparada la librería se secuenciaron por triplicado las 24 muestras, las especificaciones de las secuenciaciones se muestran a continuación.

Secuenciación #	Tiempo de Secuenciación	Ajuste de Calidad Nanopore	Lecturas generadas	Promedio de amplificación HLA-C secuenciado
SEC # 1	4 HORAS	Normal	634,84 k	247 pb
SEC # 2	2 HORAS	Normal	251,52 k	246 pb
SEC # 3	35 MIN	Alta calidad	45,54 k	249 pb

Tabla 3. Especificaciones de las 3 secuenciaciones realizadas a las 24 muestras de HLA-C en madres e infantes; número de lecturas obtenidas y tamaño promedio de la secuenciación.

Los datos fueron descargados del equipo nanopore y procesados en la plataforma Galaxy (<https://usegalaxy.org>) con las herramientas “FastQC”, Porechop”, “Fitlong” y Bismark para obtener los %GC de cada una de las 24 muestras. Los datos tabulados de porcentajes de GC metilado para cada individuo en cada una de las tres secuenciaciones se encuentran descritos en el **Anexo 1**, los datos de los patrones de metilación detallados se encuentran en el **Anexo 3**.

Procesamiento de Datos de Secuenciación Nanopore de HLA-C con kit Barcode 96:

El control de calidad de los datos brutos se realizó con la herramienta FastQC (41). Los adaptadores se eliminaron mediante recorte con el software Porechop (42). A continuación, las secuencias se filtraron por calidad y tamaño

mínimo de 44 pb y máximo de 220 pb, con el software NanoFilt (43), utilizando las opciones -q 14 y -l 44 --maxlength 220. El amplicón del cebador diseñado para la secuenciación utilizado como nuestra referencia se indexó con el software Bismark-0.24.0(44), con la herramienta bismark_genome_preparation. Las lecturas se mapearon a nuestra secuencia de referencia con la herramienta minimap2(45), utilizando la opción --non_directional. También y complementariamente se mapearon con Bismark usando las opciones --minimap2 para obtener resultados en formato BAM. A continuación, se extrajeron los patrones de metilación con la herramienta bismark_methylation_extractor, con las opciones --bedGraph --buffer_size 10G --cytosine_report. Los informes de metilación se generaron con las herramientas bismark2report y bismark2summary. Los resultados de bismark también permitieron generar visualizaciones de las secuencias mapeadas con el software IGV(44).

Análisis estadístico:

Los datos nutricionales/antropométricos cualitativos fueron analizados con una prueba de Kruskal-Wallis y los datos cuantitativos con ANOVA usando el software GraphPad9. Los porcentajes de GC metilados y los patrones de metilación fueron analizados mediante ANOVA con una prueba post-hoc tukey al 0,05 y 0,01 de significancia, esto se realizó en los programas estadísticos Infostat versión 2020 y R versión 4.2.1 (2022-06-23), incluyendo los gráficos. Por último, se realizó un análisis de correlación entre los porcentajes de GC metilado y los datos antropométricos con coeficiente de Spearman y Pearson usando el software GraphPad9.

3. RESULTADOS

Características antropométricas de madres e infantes Kichwa del Tena

Analizando los resultados de la **Tabla 4**, según el indicador antropométrico IMC, podemos observar que el 66% de las madres lactantes Kichwas presentan sobrepeso y el 0% obesidad en el T1. Este estado nutricional ha sido progresivo en el tiempo, debido a que en T2 ya se evidencia un aumento del 0% al 16,7% de madres que presentan obesidad. Consecuentemente, según el porcentaje de grasa corporal, el 100% de las mujeres evaluadas en T1 y T2 muestran un diagnóstico de obesidad. Con respecto al riesgo cardiovascular, el cual es directamente proporcional al aumento del tejido adiposo, se exhiben tasas de mediano riesgo del 33,3% y del 16,7% en T1 y T2 respectivamente. Predominando el alto riesgo cardiovascular, identificado en el 50% de la población en ambos tiempos. Además, existe diferencia significativa en el tiempo para los niveles séricos de ferritina (p-value: 0,0043) y hematocrito (p-value: 0,0173) que muestran una mediana mayor en el T2, lo que puede significar en las mujeres lactantes presencia de anemia ferropénica.

	T1 N = 6		T2 N = 6		P value
BMI Diagnosis, N (%)					
Norm weight	2	33,3	2	33,3	0,6276
overweight	4	66,7	3	33,3	
Obesity	0	0	1	16,7	
Fat Percentage, N (%)					
Average	0	0	0	0	0
Obesity	6	100	6	100	
Cardiovascular Risk, N (%)					
Low	1	16,7	2	33,3	0,7277
Moderate	2	33,3	1	16,7	
High	3	50	3	50	
Ferritin, median (IQR)	10,57	(10 - 10,86)	37,90	(10,16 - 68,55)	0,0043
Vitamin D, median (IQR)	60,68	(35,14 - 64,29)	27,76	(20,19 - 47,07)	0,132
Hematocrit, median (IQR)	47	(43,25- 48,25)	39	(36,75 - 41,25)	0,0173
Muscle %, median (IQR)	27,70	(25,80- 30,25)	27,80	(25,40 - 28,85)	0,7922
H/w %, median (IQR)	0,88	(0,82 - 0,92)	0,84	(0,8 - 0,95)	0,2987

Tabla 4. Características nutricionales de mujeres lactantes Kichwa con Kruskal-Wallis

Por otra parte, la mayoría de los infantes lactantes Kichwas en el T1 muestran un IMC adecuado a su edad, a excepción de un 16,7% que se encontró emaciado; sin embargo, en el T2 existe un aumento de los resultados obtenidos previamente, pues se obtuvo que el 33,3% presentaron un peso adecuado, mientras que el 66,7% de la población evidencia tasas altas de riesgo de sobrepeso. Adicional, se aprecia deficiencia de Vitamina D en infantes para T2, debido a que los niveles séricos de Vit D y ferritina son significativamente diferentes en el tiempo, tal como se muestra en la **Tabla 5**.

	T1 N = 6		T2 N = 6		P value
Age, weeks	10,25	(2,025- 13,08)	117,3	(98,40 - 119,9)	0,0022
Weight/age interpretation					
Adequate	6	100	6	100	0
Overweight risk	0	0	0	0	
Emaciated	0	0	0	0	
Height/age interpretation					
Adequate	5	83,3	6,0	100,0	0,4
High	1	16,7	0,0	0,0	
BMI / age interpretation					
Adequate	5	83,3	2,0	33,3	0,0
Overweight risk	0	0,0	4,0	66,7	
Emaciated	1	16,7	0,0	0,0	
Ferritin, median (IQR)	50,76	(30,05- 90,66)	14,47	(10 - 42,87)	0,0476
Vitamine D, median (IQR)	70,00	(67,57-70)	24,09	(15,64-45,78)	0,0152
Hematocrit, median (IQR)	34,50	(32,75-39,25)	34,50	(33,75-38,25)	0,80

Tabla 5. Características nutricionales de infantes lactantes Kichwa con Kruskal-wallis

Porcentajes de metilación en el exón 1 de HLA-C de madres e infantes

Al analizar la tendencia total de los individuos en T1 y T2, encontramos que el promedio de metilación de la población Kichwa es menor al 3%. Cuando analizamos los datos del porcentaje de % GC metilado encontramos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre T1 y T2 tanto para madres como infantes. Esto se realizó con un análisis de varianza y una prueba post-hoc tukey ajustado a un 0.05 y 0.01 de nivel de significancia. Sin embargo, encontramos una tendencia de los infantes a aumentar su nivel de metilación en los 2 primeros años de vida mientras que las madres tienden a disminuirlo en los 2 primeros años de lactancia en lo que parece ser un “nivel de estabilidad epigenética” de HLA-C no reportado previamente en la literatura como se aprecia en la **figura 3**.

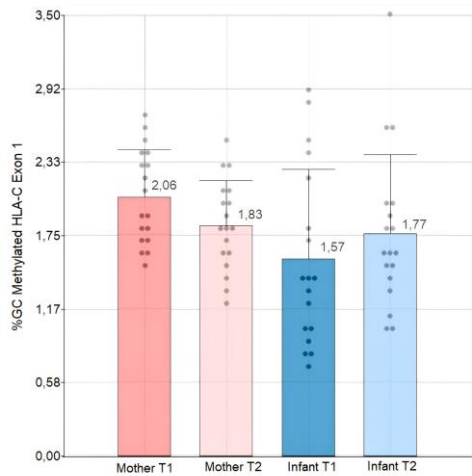


Figura 3. Diagrama de barras con desviación estándar y dispersión de datos de los niveles de metilación de HLA-C Exón 1 en madres e infantes Kichwa en T1 y T2.

Cuando comparamos los niveles de metilación del exón 1 del HLA-C en cada uno de los 12 individuos entre T1 y T2, observamos algunos cambios. El lactante 2 mostró un aumento del 0,90% al 1,90%, y el lactante 6 tuvo el mayor aumento de metilación, pasando del 0,83% al 2,90%. Por el contrario, el lactante 5 presentó un descenso significativo de la metilación, pasando del 2,73% al 1,37%.

En cuanto a las madres, la madre 1 y la madre 5 aumentaron sus niveles de metilación del 1,67% al 2,00% y del 1,7% al 2,37%, respectivamente. Sin embargo, las madres 2 y 6 redujeron sus niveles de metilación del 2,37% al 1,30% y del 2,57% al 1,70%, respectivamente. Todas estas diferencias puntuales de cada individuo se pueden apreciar en la **figura 4**.

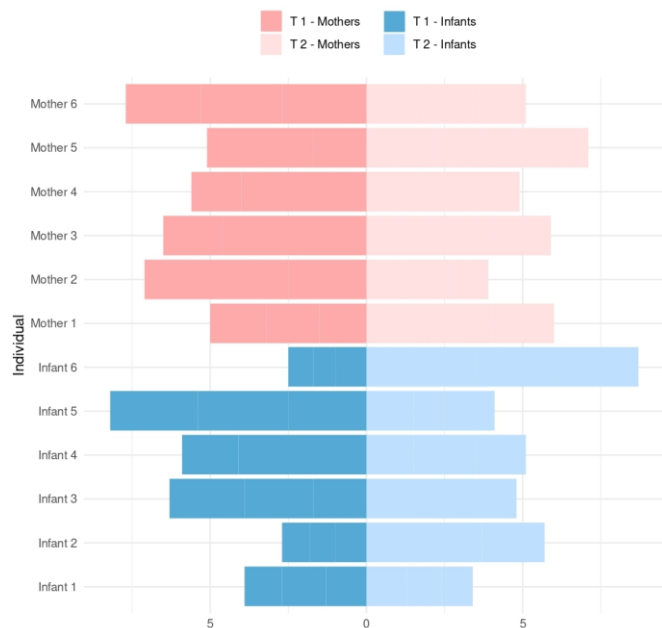


Figura 4. Diagrama bilateral de los niveles de metilación en HLA-C exón 1 de madres e infantes Kichwa en los tiempos T1 y T2.

Analizamos un segmento de 122 pb del exón 1 del HLA-C e identificamos 25 sitios CpG. Entre ellos, 3 resultaron estar hipermetilados, particularmente las citosinas: 32-33, 43-44, y

96-97. Al comparar los datos de madres y lactantes en T1 y T2, observamos que los niveles de metilación permanecían estables a lo largo del tiempo y se heredaban por línea materna, como se muestra en las **figuras 5 y 6**.

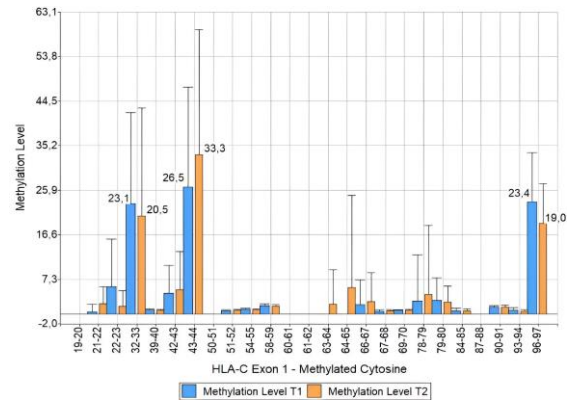


Figura 5. Diagrama de barras de los patrones de metilación del exón 1 de HLA-C promediando T1 Y T2

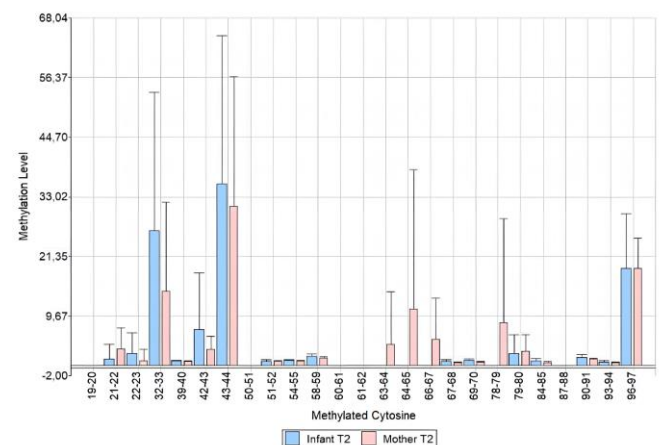
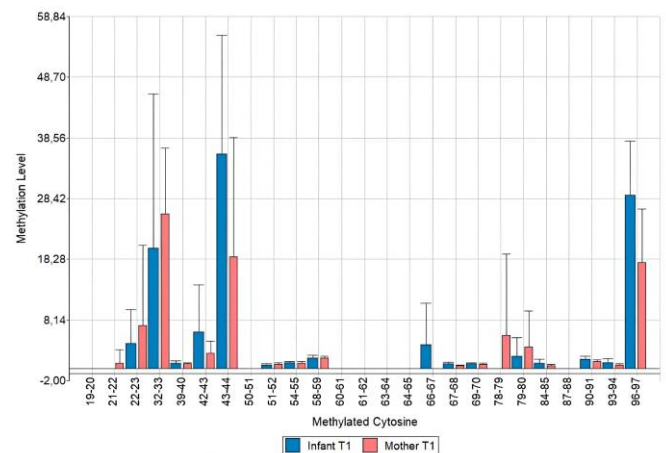


Figura 6. Diagrama de barras de los patrones de metilación del exón 1 de HLA-C en madres e infantes Kichwa contrastando T1 Y T2

Correlación de patrones de metilación con nutrición

Durante el estudio, se observó que 1 de cada 6 madres kichwa presentaba un riesgo cardiovascular moderado en T1, que volvió a disminuir en T2, lo que se correspondió con un porcentaje de metilación reducido del 2% (valor de p: 0,0001), **Tabla 6**. Mientras tanto, el IMC mostró una tendencia

ascendente significativa, con cuatro madres con sobrepeso en T1 y sólo una madre obesa en T2, con un porcentaje de metilación del 1,8% (valor de p : 0,0065).

Tres de seis lactantes kichwa mantuvieron un peso adecuado en T1, con un porcentaje de metilación de 1,55 (valor de $p < 0,0001$). El lactante con bajo peso en T1 pasó a tener un peso medio en T2, con un porcentaje de metilación de 1,8%.

	T1		T2		P value
	N	Media (IQR)	N	Media (IQR)	
Kichwa Mothers	Cardiovascular Risk, N (%)				
	Low	1, 7 (1, 5- 1, 8)	2	2 (1, 8- 2, 1)	ns
	Moderate	2, 3 (2, 123- 2, 425)	1	1, 3 (1, 2- 1, 4)	0,0001
	High	3, 1, 9 (1, 650- 2, 7)	3	1, 8 (1, 6- 2, 5)	ns
Kichwa infants	BMI Diagnosis, N (%)				
	Normoweight	2, 1, 7 (1, 5- 1, 8)	2	2 (1, 875- 2, 1)	0,0078
	Overweight	4, 2, 3 (1, 950- 2, 475)	3	1, 8 (1, 350- 2, 3)	0,0065
	Obesity	0, NS	1	1, 6 (1, 6- 1, 7)	ns
Kichwa infants	Height interpretation				
	Adequate	5, 1, 3 (1, 2- 1, 4)	5, 0	1, 8 (1, 5- 2)	ns
	Low	0, NS	1, 0	1, 1 (1- 1, 3)	
	High	1, 1, 4 (0, 9- 2, 4)	0, 0	NS	
Kichwa infants	BMI / age Interpretation				
	Adequate	5, 1, 4 (0, 9- 2, 4)	2, 0	1, 8 (1, 625- 1, 925)	ns
	Overweight risk	0, NS	4, 0	1, 55 (1, 150- 2, 450)	<0,0001
	Emaciated	1, 1, 3 (1, 2- 1, 4)	0, 0	NS	ns

Tabla 6. Correlación de porcentaje de metilación respecto a características nutricionales relevantes en madres e infantes Kichwa a través del tiempo. Modelo estadístico Kruskal-Wallis

Se analizó si existe alguna relación o correlación entre el porcentaje de metilación y tres variables específicas: ferritina, vitamina D y hematocrito. Se comprobó que no existe correlación entre el porcentaje de metilación, la ferritina, la vitamina D y el hematocrito en las madres a lo largo del tiempo como se observa en la **figura 7**.

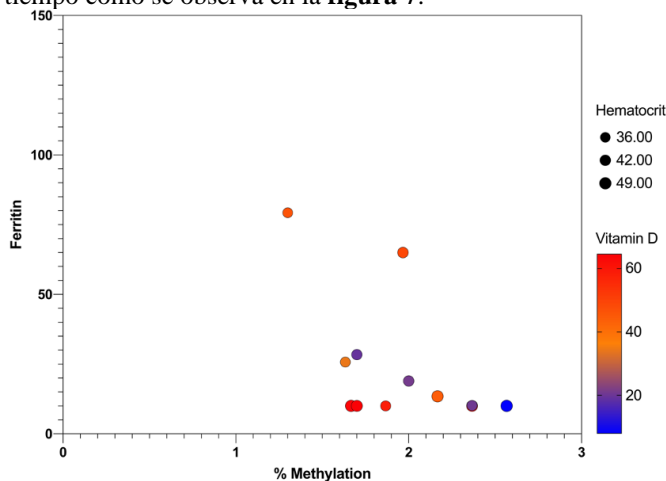


Figura 7. Gráfico multicompone de variables nutricionales/ antropométricas y porcentaje de metilación en madres

En cambio, en los infantes se observó una correlación inversa entre el porcentaje de metilación y la vitamina D a lo largo del tiempo, con un valor $p=0,0039$. En T1, hay un bajo porcentaje de metilación con valores de vitamina D cercanos a 60 mg/dL, mientras que en T2, hay hipermetilación con valores bajos de vitamina D. Esta correlación entre altos niveles de metilación con bajos niveles de expresión de vitamina D en lactantes, es una de las primeras aproximaciones a la herencia epigenética en HLA-C, pero hay que tener en cuenta que se realizó en una población de sólo 6 lactantes por lo que los resultados son sugerentes, no concluyentes (**Figura 8**).

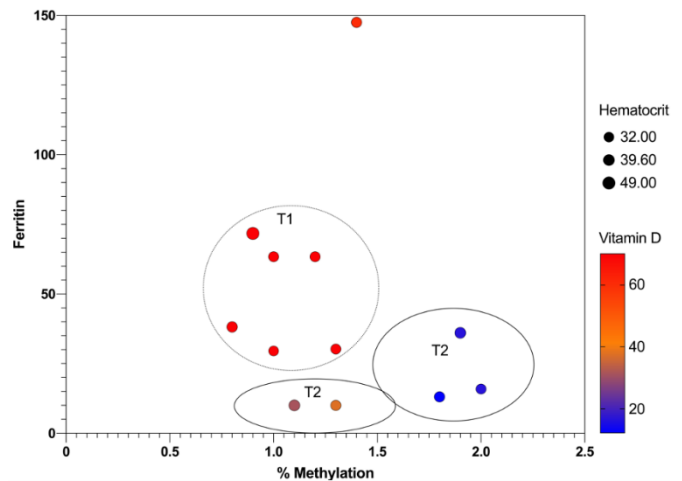


Figura 8. Gráfico multicompone de variables nutricionales/ antropométricas y porcentaje de metilación en infantes

4. DISCUSIÓN

Características antropométricas de madres e infantes Kichwa del Tena

Se reporta la primera caracterización antropométrica de una población de madres kichwa en Tena, en la que se analizó el Índice de Masa Corporal (IMC), el porcentaje de grasa corporal y el riesgo cardiovascular, además de la medición de parámetros micronutricionales como los niveles de ferritina, vitamina D y hematocrito. Se observó una mayor tasa de madres obesas y con sobrepeso, que pueden tener un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares a largo plazo. Además, las deficiencias de nutrientes esenciales pueden predisponerlas aún más a patologías específicas como la anemia ferropénica o los trastornos metabólicos (51,52).

El sobrepeso y estado nutricional deficiente presentado en madres y evidenciado en la **tabla 4** de resultados podría afectar al desarrollo de los infantes, pues durante el periodo de lactancia una cantidad considerable de nutrientes se transfieren desde la madre al infante, por lo que la ingesta de alimentos en la madre debe equilibrarse para no generar una deficiencia nutricional o energética; no obstante, esta alimentación debe ser diversa, de lo contrario la mujer podría experimentar un aumento de peso acompañado de deficiencias nutricionales (53). Se estima que hasta el 25% de las mujeres embarazadas pueden presentar algún tipo de enfermedad metabólica y en poblaciones como la India hasta el 33% de las mujeres tienen diabetes materna, en su mayoría por factores nutricionales (54). Este panorama puede ser similar al del oriente ecuatoriano que es la región que evidencia la tasa más alta de malnutrición del país y en este estudio evidenciamos que los factores antropométricos de madres indican una tendencia a adquirir enfermedades metabólicas, patologías que podrían ser heredadas a su descendencia afectando a largo plazo su calidad de vida del infante (55,56).

En base a los resultados nutricionales obtenidos de madres lactantes kichwa se debe mencionar que la presencia de anemia ferropénica en mujeres lactantes se relaciona con la pérdida de importantes reservas de hierro y esto puede vincularse a la falta

de suplementación con ácido fólico durante el periodo que abarca desde la gestación hasta la lactancia (57). También es importante mencionar que la ingesta inadecuada de micronutrientes por parte de la madre impacta directamente en el estado nutricional del bebé a través de la leche materna, esta situación se refleja en los niveles deficientes de ferritina y vitamina D en los infantes, lo que los predispone a padecer afecciones como bajo peso, baja talla, anemia, raquitismo y otras (58).

Por último, es importante considerar que los infantes no presentaron niveles nutricionales deficientes de manera general, a excepción de la vitamina D, aspecto que se profundizará a continuación al relacionarlo con factores epigenéticos.

Niveles de metilación en el exón 1 de HLA-C de madres e infantes

Aunque no se detectaron diferencias significativas en los niveles de metilación de madres e infantes, identificamos una tendencia de los lactantes a aumentar sus niveles de metilación en los dos primeros años de vida. Esta tendencia está respaldada por la evidencia de la deriva epigenética, que sugiere que la metilación del ADN tiende a aumentar con el tiempo en correlación con la edad y diversos estilos de vida (59). Además, un estudio que examinó bebés de entre 6 y 52 semanas reveló una diferencia significativa en el transcurso del tiempo, evidenciando un aumento en la metilación del ADN en estos infantes (60). Estos hallazgos indican que, durante los primeros meses de vida, los patrones de metilación del ADN pueden experimentar cambios notables, posiblemente relacionados con factores ambientales y el proceso de desarrollo en esta etapa temprana. En este estudio sugerimos que podría existir una tendencia al “equilibrio” de metilación en el exón 1 de HLA-C no reportado previamente.

Adicionalmente, es importante destacar que las madres también contribuyen al cambio en la metilación de los infantes, la dieta materna, tanto la alimentación diaria como los suplementos, puede influir en la metilación del ADN del infante, particularmente en genes relacionados con el metabolismo, el desarrollo, la regulación del apetito y el mantenimiento de la metilación del ADN (61). Aun así, el entendimiento de la herencia del epigenoma es en gran medida desconocido, pero este tipo de estudios centrados en genes con alta relevancia inmunitaria y patológica como HLA-C, demuestran las implicaciones epigenéticas de una maternidad sana y cómo pequeñas alteraciones en los niveles de metilación podrían condicionar la calidad de vida de los infantes, además de ser el primer reporte de patrones de metilación heredados en HLA-C.

Por otro lado, en madres encontramos una tendencia a la disminución de los niveles de metilación del exón 1 de HLA-C, nuevamente lo que sugiere que podría existir una tendencia al “equilibrio” de metilación en esta región del gen. Es importante considerar que no existe un consenso en la comunidad científica sobre si existe un nivel “adecuado” de metilación, solo se estima que la tendencia a aumentar los niveles de metilación de HLA-C tiene implicaciones directas

en la salud y respuesta inmune de un individuo, recientes estudios encontraron que pacientes con síntomas de infección pos-Covid-19 presentaban niveles más altos de hipermetilación en HLA-C en comparación con pacientes asintomáticos o sin infección, los resultados señalaron que existía una reducción de la expresión de HLA-C en los pacientes con COVID-19, en especial aquellos con casos graves (46). Tras el proceso infeccioso los niveles de hipermetilación de HLA-C parecían volver a la normalidad (46). Esta particularidad de HLA-C a ser metilado tras eventos ambientales puntuales como una infección viral es una cualidad reportada recientemente (47) y nuestros resultados sugieren que estos cambios epigenéticos de aumento y disminución de metilación no se limitan únicamente a procesos infecciosos sino también a procesos fisiológicos como la maternidad, en donde tras el primer año de lactancia se observa una tendencia a disminuir el nivel de metilación del exón 1 de HLA-C, de 2,06% a 1,83%, mientras que en los infantes tras el primer año de vida se evidencia un aumento de 1,57% a 1,77% de GC metilado lo que sugiere un comportamiento de los niveles de metilación que tiende a la estabilidad, una conducta que no ha sido reportado previamente.

Patrones de metilación en el exón 1 de HLA-C de madres e infantes

Nuestros resultados sugieren que existen puntos específicos donde las citosinas se mantienen metiladas tanto en madres como infantes y son estables en el tiempo, pues aun cuando las madres tienen tendencia a disminuir el % de citosinas metiladas y los infantes a aumentarlas, 3 puntos de citosinas metiladas se mantienen estables e hipermetilados, las citosinas: 32-33, 43-44 y 96-97. La herencia de estos patrones de metilación podría ser la clave para el entendimiento en la transmisión de un conjunto de enfermedades autoinmunes como alopecia areata, Graves, esclerosis, psoriasis, osteoartritis y susceptibilidad a enfermedades virales como HTLV, HCV, HIV o Epstein-Barr, todas ligadas de alguna manera a la expresión de HLA-C (36).

Si bien en este estudio existe una población de tan solo 12 individuos es interesante identificar cuan predominantes son estos puntos de metilación, pues a nivel fisiológico, aunque HLA-C se expresa a un nivel más bajo en la superficie celular que el resto de las moléculas HLA de clase I (46), la metilación del gen puede alterar la estructura y la función de la proteína, lo que puede afectar su capacidad para presentar antígenos a los linfocitos T (48). Esta disfunción de HLA-C en la membrana puede afectar en la respuesta inmunitaria o generar alteraciones autoinmunes como es el caso de pacientes con psoriasis en donde HLA-C suele estar hipermetilado en comparación con individuos sanos (49) especialmente en las regiones promotoras del gen (50), regiones cercanas al exón 1 de HLA-C como reportamos en este estudio.

El entendimiento actual de la herencia de los patrones de metilación es aún limitado y es fundamental generar investigación que forme un mejor entendimiento de cómo funciona este mecanismo de estabilidad o equilibrio de los niveles de metilación en regiones del genoma con alta

relevancia patológica y susceptibilidad estructural a fenómenos de metilación como HLA-C para dilucidar de mejor manera los fenómenos epigenéticos y como estos se heredan.

Correlación de patrones de metilación con nutrición

El aspecto nutricional más destacable que identificamos fue una correlación inversa entre el nivel de metilación y la deficiencia de vitamina D, esta deficiencia se asocia con una mayor autoinmunidad y susceptibilidad a las infecciones (62), la relevancia del HLA-C en las enfermedades autoinmunes como alopecia areata, Graves, esclerosis, psoriasis, osteoartritis ha sido ampliamente reportada (36). Se ha demostrado que la vitamina D promueve una respuesta inmunitaria tolerogénica y puede tener un efecto protector ante enfermedades autoinmunes que se desencadenan a lo largo de la vida (63). Se ha descubierto que la vitamina D regula la expresión de HLA-C y otros genes MHC de clase I, lo que sugiere que la vitamina D puede influir en la respuesta inmunitaria modulando la presentación de antígenos a las células T (64). Además, se ha demostrado que la vitamina D regula positivamente los genes relacionados con el sistema inmunitario, al tiempo que regula negativamente los genes implicados en el metabolismo celular (64). Sin embargo, no hay muchas investigaciones que informen sobre el vínculo entre los niveles de metilación y la vitamina D en lactantes, a pesar de que la vitamina D es esencial para el desarrollo del esqueleto y del sistema inmunitario en los primeros años de vida. Por lo tanto, en este estudio, proponemos una posible correlación entre la metilación HLA-C y la deficiencia de vitamina D; sin embargo, es esencial evaluar en el futuro todo el conjunto de genes del complejo mayor de histocompatibilidad MHC o un análisis de todo el epigenoma en madres y lactantes para comprender mejor este fenómeno de herencia epigenética y deficiencia de vitamina D. Una vez más, es importante mencionar que estos resultados son estimaciones debido al número de la población estudiada.

Secuenciación Nanopore y epigenética

La tecnología de secuenciación nanopore disminuye considerablemente el tiempo y costos de secuenciación por muestra, especialmente en estudios epigenéticos cuyos costos de procesamiento por muestra suelen ser elevados, siendo una alternativa interesante para este tipo de investigaciones, sin embargo se debe considerar las herramientas bioinformáticas necesarias para el procesamiento y depuración de datos pues puede existir una baja calidad en las secuencias obtenidas. En este estudio generamos el primer workflow para la identificación de % de GC y patrones de metilación con secuenciación nanopore con kit Barcode 96 en epigenética, detallado en metodología.

5. CONCLUSIONES

Se ha realizado un innovador estudio que analiza los atributos nutricionales y epigenéticos de una cohorte de madres kichwa residentes en Tena y sus infantes. El estudio profundizó en diversos parámetros, como el índice de masa corporal (IMC), el porcentaje de grasa corporal, el riesgo cardiovascular y los niveles de nutrientes vitales como la ferritina, la vitamina D y

el hematocrito. El estudio descubrió que un mayor porcentaje de madres del grupo tenían sobrepeso o eran obesas, lo que eleva su riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares a largo plazo. Además, el estudio reveló que las deficiencias de nutrientes esenciales, en particular de vitamina D, podrían hacerlas más propensas a sufrir trastornos autoinmunitarios.

Además, se identificó una posible correlación entre la metilación del gen HLA-C y la deficiencia de vitamina D, lo que subraya la necesidad de realizar análisis exhaustivos de todo el epigenoma. El estudio destaca el papel crucial de la nutrición materna, ya que las deficiencias, especialmente de hierro y ácido fólico, pueden repercutir en la salud materna y en el estado nutricional de los lactantes durante la lactancia. Presentamos la primera evidencia de patrones de metilación heredados por línea materna y estables en el tiempo en el exón 1 de HLA-C. Aun así, estadísticamente los niveles de metilación no difieren entre T1 y T2 para madres o infantes, pero presentan una tendencia a disminuir y aumentar respectivamente los niveles de metilación en búsqueda de lo que parece ser un nivel de estabilidad del epigenoma no reportado previamente.

También encontramos que existe una correlación inversa entre el porcentaje de metilación y vitamina D en infantes. En última instancia, este estudio pionero sienta las bases para comprender la intrincada interacción de la genética, la nutrición y la epigenética en la comunidad kichwa, además de marcar el camino para la realización de estudios más amplios y exhaustivos sobre el impacto transgeneracional de la lactancia materna en los resultados de salud.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda el análisis epigenético de todos los genes completos de complejo mayor de histocompatibilidad clase 1: HLA-A, B & C con el mismo kit barcode 96 de Nanopore adaptado para este estudio, sin limitarse únicamente a un exón, es decir analizar la longitud completa del gen incluyendo regiones promotoras.

Aumentar la cantidad de población de estudio puede generar una investigación más robusta y el kit barcode 96 de Nanopore adaptado para este estudio puede ser una alternativa para no elevar demasiado los costos por procesamiento de cada muestra, que suelen ser sumamente altos en estudios epigenéticos.

7. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es parte del proyecto VLIR-UOS: EC2019SIN246A102, financiado por la Escuela Politécnica del Litoral y la Universidad de Antwerp-Bélgica. Se agradece el apoyo de la Escuela Politécnica Nacional y el proyecto VLIR-Network en el desarrollo de este trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Tronick, E., & Hunter, R. G. (2016). Waddington, dynamic systems, and epigenetics. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 107. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00107>
2. Bedregal, P., Shand, B., Santos, M. J., & Ventura-Juncá, P. (2010). Aportes de la epigenética en la comprensión del desarrollo del ser humano. *Revista Médica de Chile*, 138(3). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872010000300018>
3. Iurato, G., & Igamberdiev, A. U. (2022). The reversibility of cellular determination: An evolutive pattern of epigenetic plasticity. *Bio Systems*, 221, 104774. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2022.104774>
4. Zannas, A. S. (2019). Epigenetics as a key link between psychosocial stress and aging: concepts, evidence, mechanisms^[P]. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 21(4), 389–396. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2019.21.4/azannas>
5. Laffita-Mesa, J. M., & Bauer, P. (2014). [Epigenetic heredity (deoxyribonucleic acid methylation): Clinical context in neurodegenerative disorders and ATXN2 gene]. *Medicina Clínica*, 143(8), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.11.025>
6. Krause, B. J., Castro-Rodríguez, J. A., Uauy, R., & Casanello, P. (2016). [General concepts of epigenetics: Projections in paediatrics]. *Revista Chilena de Pediatría*, 87(1), 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.12.002>
7. Yu, M., Hazelton, W. D., Luebeck, G. E., & Grady, W. M. (2020). Epigenetic aging: more than just a clock when it comes to cancer. *Cancer Research*, 80(3), 367–374. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0924>
8. Phillips, N. L. H., & Roth, T. L. (2019). Animal models and their contribution to our understanding of the relationship between environments, epigenetic modifications, and behavior. *Genes*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/genes10010047>
9. Tops, S., Habel, U., & Radke, S. (2019). Genetic and epigenetic regulatory mechanisms of the oxytocin receptor gene (OXTR) and the (clinical) implications for social behavior. *Hormones and Behavior*, 108, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.03.002>
10. Wu, H., Chen, Y., Zhu, H., Zhao, M., & Lu, Q. (2019). The pathogenic role of dysregulated epigenetic modifications in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 2305. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02305>
11. Mantovani, A., & Netea, M. G. (2020). Trained Innate Immunity, Epigenetics, and Covid-19. *The New England Journal of Medicine*, 383(11), 1078–1080. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr2011679>
12. Jones, P. A., Ohtani, H., Chakravarthy, A., & De Carvalho, D. D. (2019). Epigenetic therapy in immunoncology. *Nature Reviews. Cancer*, 19(3), 151–161. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0109-9>
13. Peña, C. de la, & Loyola, V. M. (2017). De la genética a la epigenética: La herencia que no está en los genes (1st ed.).
14. Dopytalska, K., Ciechanowicz, P., Wiszniewski, K., Szymańska, E., & Walecka, I. (2021). The role of epigenetic factors in psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179294>
15. Sen, A., Heredia, N., Senut, M.-C., Land, S., Hollocher, K., Lu, X., Dereski, M. O., & Ruden, D. M. (2015). Multigenerational epigenetic inheritance in humans: DNA methylation changes associated with maternal exposure to lead can be transmitted to the grandchildren. *Scientific Reports*, 5, 14466. <https://doi.org/10.1038/srep14466>
16. Wang, J., Wu, Z., Li, D., Li, N., Dindot, S. V., Satterfield, M. C., Bazer, F. W., & Wu, G. (2012). Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(2), 282–301. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4381>
17. Smallwood, S. A., & Kelsey, G. (2012). De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends in Genetics*, 28(1), 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004>
18. Samblas, M., Milagro, F. I., & Martínez, A. (2019). DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. *Epigenetics*, 14(5), 421–444. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1595297>
19. Stevens, A. J., Rucklidge, J. J., & Kennedy, M. A. (2018). Epigenetics, nutrition and mental health. Is there a relationship? *Nutritional Neuroscience*, 21(9), 602–613. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1331524>
20. Ramos-Lopez, O., Milagro, F. I., Riezu-Boj, J. I., & Martinez, J. A. (2021). Epigenetic signatures underlying inflammation: an interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. *Inflammation Research*, 70(1), 29–49. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01425-y>
21. Peña-Romero, A. C., Navas-Carrillo, D., Marín, F., & Orenes-Piñero, E. (2018). The future of nutrition: Nutrigenomics and nutrigenetics in obesity and cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(17), 3030–3041. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1349731>
22. Langley-Evans, S. C. (2015). Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics: The Official Journal of the British Dietetic Association*, 28 Suppl 1, 1–14. <https://doi.org/10.1111/jhn.12212>
23. Sapienza, C., & Issa, J.-P. (2016). Diet, nutrition, and cancer epigenetics. *Annual Review of Nutrition*, 36, 665–681. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-121415-112634>
24. Meroni, M., Longo, M., Rustichelli, A., & Dongiovanni, P. (2020). Nutrition and genetics in NAFLD: the perfect binomium. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082986>
25. Marshall, N. E., Abrams, B., Barbour, L. A., Catalano, P., Christian, P., Friedman, J. E., Hay, W. W., Hernandez, T. L., Krebs, N. F., Oken, E., Purnell, J. Q., Roberts, J. M., Soltani, H., Wallace, J., & Thornburg, K. L. (2022). The importance of nutrition in pregnancy and lactation: lifelong consequences. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 226(5), 607–632. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.12.035>
26. Ackland, M. L., & Michalczyk, A. A. (2016). Zinc and infant nutrition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 611, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.06.011>
27. Koemel, N. A., & Skilton, M. R. (2022). Epigenetic aging in early life: role of maternal and early childhood nutrition. *Current Nutrition Reports*, 11(2), 318–328. <https://doi.org/10.1007/s13668-022-00402-7>
28. Waterland, R. A., Kellermayer, R., Laritsky, E.,

- Rayco-Solon, P., Harris, R. A., Travisano, M., Zhang, W., Torskaya, M. S., Zhang, J., Shen, L., Manary, M. J., & Prentice, A. M. (2010). Season of conception in rural gambia affects DNA methylation at putative human metastable epialleles. *PLoS Genetics*, 6(12), e1001252. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001252>
29. Franzago, M., Fraticelli, F., Stuppia, L., & Vitacolonna, E. (2019). Nutrigenetics, epigenetics and gestational diabetes: consequences in mother and child. *Epigenetics*, 14(3), 215–235. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1582277>
30. Muñoz Fernández, S. S., & Lima Ribeiro, S. M. (2018). Nutrition and alzheimer disease. *Clinics in Geriatric Medicine*, 34(4), 677–697. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2018.06.012>
31. de Brito Alves, J. L., & Costa-Silva, J. H. (2018). Maternal protein malnutrition induced-hypertension: New evidence about the autonomic and respiratory dysfunctions and epigenetic mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 45(5), 422–429. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12892>
32. Campisano, S., La Colla, A., Echarte, S. M., & Chisari, A. N. (2019). Interplay between early-life malnutrition, epigenetic modulation of the immune function and liver diseases. *Nutrition Research Reviews*, 32(1), 128–145. <https://doi.org/10.1017/S0954422418000239>
33. D’Urso, A., & Brickner, J. H. (2014). Mechanisms of epigenetic memory. *Trends in Genetics*, 30(6), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.004>
34. Aguiar, V. R. C., César, J., Delaneau, O., Dermitzakis, E. T., & Meyer, D. (2019). Expression estimation and eQTL mapping for HLA genes with a personalized pipeline. *PLoS Genetics*, 15(4), e1008091. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008091>
35. Barzuna, L. (2003). Determinación de HLA en estudios de poblaciones y migraciones humanas. *Revista Médica Del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*.
36. Velastegui, E., Vera, E., Vanden Berghe, W., Muñoz, M. S., & Orellana-Manzano, A. (2023). “HLA-C: evolution, epigenetics, and pathological implications in the major histocompatibility complex”. *Frontiers in Genetics*, 14, 1206034. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1206034>
37. Johnson, J. K., Wright, P. W., Li, H., & Anderson, S. K. (2018). Identification of trophoblast-specific elements in the HLA-C core promoter. *HLA : Immune Response Genetics*, 92(5), 288–297. <https://doi.org/10.1111/tan.13404>
38. Zhu, Y., Mordaunt, C. E., Durbin-Johnson, B. P., Caudill, M. A., Malysheva, O. V., Miller, J. W., Green, R., James, S. J., Melnyk, S. B., Fallin, M. D., Hertz-Picciotto, I., Schmidt, R. J., & LaSalle, J. M. (2021). Expression Changes in Epigenetic Gene Pathways Associated With One-Carbon Nutritional Metabolites in Maternal Blood From Pregnancies Resulting in Autism and Non-Typical Neurodevelopment. *Autism Research : Official Journal of the International Society for Autism Research*, 14(1), 11–28. <https://doi.org/10.1002/aur.2428xd>
39. Lv, H., Zhou, Q., Li, L., & Wang, S. (2021). HLA-C promotes proliferation and cell cycle progression in trophoblast cells. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 34(4), 512–518. <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1611772>
40. Kennedy, P. R., Chazara, O., Gardner, L., Ivarsson, M. A., Farrell, L. E., Xiong, S., Hiby, S. E., Colucci, F., Sharkey, A. M., & Moffett, A. (2016). Activating KIR2DS4 is expressed by uterine NK cells and contributes to successful pregnancy. *Journal of Immunology*, 197(11), 4292–4300. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601279>
41. Brown, J., Pirrung, M., & McCue, L. A. (2017). FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*, 33(19), 3137–3139. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx373>
42. Tyson, J. R., James, P., Stoddart, D., Sparks, N., Wickenhagen, A., Hall, G., Choi, J. H., Lapointe, H., Kamelian, K., Smith, A. D., Prystajeky, N., Goodfellow, I., Wilson, S. J., Harrigan, R., Snutch, T. P., Loman, N. J., & Quick, J. (2020). Improvements to the ARTIC multiplex PCR method for SARS-CoV-2 genome sequencing using nanopore. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.04.283077>
43. Truong, L., Ayora, F., D’Orsogna, L., Martinez, P., & De Santis, D. (2022). Nanopore sequencing data analysis using Microsoft Azure cloud computing service. *Plos One*, 17(12), e0278609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278609>
44. Ni, P., Huang, N., Nie, F., Zhang, J., Zhang, Z., Wu, B., Bai, L., Liu, W., Xiao, C.-L., Luo, F., & Wang, J. (2021). Genome-wide detection of cytosine methylations in plant from Nanopore data using deep learning. *Nature Communications*, 12(1), 5976. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26278-9>
45. Lee, Y. G., Choi, S. C., Kang, Y., Kim, K. M., Kang, C.-S., & Kim, C. (2019). Constructing a reference genome in a single lab: the possibility to use oxford nanopore technology. *Plants*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/plants8080270>
46. Loi, E., Moi, L., Cabras, P., Arduino, G., Costanzo, G., Del Giacco, S., Erlich, H. A., Firinu, D., Caddori, A., & Zavattari, P. (2022). HLA-C dysregulation as a possible mechanism of immune evasion in SARS-CoV-2 and other RNA-virus infections. *Frontiers in Immunology*, 13, 1011829. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1011829>
47. Rakyán, V. K., Hildmann, T., Novik, K. L., Lewin, J., Tost, J., Cox, A. V., Andrews, T. D., Howe, K. L., Otto, T., Olek, A., Fischer, J., Gut, I. G., Berlin, K., & Beck, S. (2004). DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biology*, 2(12), e405. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020405>
48. Ramsuran, V., Kulkarni, S., O’huigin, C., Yuki, Y., Augusto, D. G., Gao, X., & Carrington, M. (2015). Epigenetic regulation of differential HLA-A allelic expression levels. *Human Molecular Genetics*, 24(15), 4268–4275. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv158>
49. Mervis, J. S., & McGee, J. S. (2020). DNA methylation and inflammatory skin diseases. *Archives of Dermatological Research*, 312(7), 461–466. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-02005-9>
50. Chen, M., Wang, Y., Yao, X., Li, C., Jiang, M., Cui, P., & Wang, B. (2016). Hypermethylation of HLA-C may be an epigenetic marker in psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 83(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.04.003>
51. Konieczna, J., Romaguera, D., Pereira, V., Fiol, M.,

- Razquin, C., Estruch, R., Asensio, E. M., Babio, N., Fitó, M., Gómez-Gracia, E., Ros, E., Lapetra, J., Arós, F., Serra-Majem, L., Pintó, X., Toledo, E., Sorlí, J. V., Bulló, M., Schröder, H., & Martínez-González, M. A. (2019). Longitudinal association of changes in diet with changes in body weight and waist circumference in subjects at high cardiovascular risk: the PREDIMED trial. *The International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 16(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12966-019-0893-3>
52. Corrales, P., Vidal-Puig, A., & Medina-Gómez, G. (2021). Obesity and pregnancy, the perfect metabolic storm. *European Journal of Clinical Nutrition*, 75(12), 1723–1734. <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00914-5>
53. Kominiarek, M. A., & Rajan, P. (2016). Nutrition recommendations in pregnancy and lactation. *The Medical Clinics of North America*, 100(6), 1199–1215. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.06.004>
54. Choudhury, A. A., & Devi Rajeswari, V. (2021). Gestational diabetes mellitus - A metabolic and reproductive disorder. *Biomedicine & Pharmacotherapy (Biomedicine & Pharmacotherapie)*, 143, 112183. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112183>
55. Sanderson, S., Green, A., Preece, M. A., & Burton, H. (2006). The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Archives of Disease in Childhood*, 91(11), 896–899. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.091637>
56. Ferreira, C. R., Rahman, S., Keller, M., Zschocke, J., & ICIMD Advisory Group. (2021). An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44(1), 164–177. <https://doi.org/10.1002/jimd.12348>
57. Chandyo, R. K., Henjum, S., Ulak, M., Thorne-Lyman, A. L., Ulvik, R. J., Shrestha, P. S., Locks, L., Fawzi, W., & Strand, T. A. (2016). The prevalence of anemia and iron deficiency is more common in breastfed infants than their mothers in Bhaktapur, Nepal. *European Journal of Clinical Nutrition*, 70(4), 456–462. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.199>
58. Stiller, C. K., Golembiewski, S. K. E., Golembiewski, M., Mondal, S., Biesalski, H. K., & Scherbaum, V. (2020). Maternal nutritional status and child feeding practices: a retrospective study in Santal communities, Birbhum District, West Bengal, India. *International Breastfeeding Journal*, 15(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13006-020-00262-3>
59. Teschendorff, A. E., West, J., & Beck, S. (2013). Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Human Molecular Genetics*, 22(R1), R7–R15. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt375>
60. Wikenius, E., Moe, V., Smith, L., Heiervang, E. R., & Berglund, A. (2019). DNA methylation changes in infants between 6 and 52 weeks. *Scientific Reports*, 9(1), 17587. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54355-z>
61. Pauwels, S., Ghosh, M., Duca, R. C., Bekaert, B., Freson, K., Huybrechts, I., Langie, S. A. S., Koppen, G., Devlieger, R., & Godderis, L. (2017). Maternal intake of methyl-group donors affects DNA methylation of metabolic genes in infants. *Clinical Epigenetics*, 9, 16. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0321-y>
62. Aranow, C. (2011). Vitamin D and the immune system. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 59(6), 881–886. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31821b8755>
63. Ghaseminejad-Raeini, A., Ghaderi, A., Sharafi, A., Nematollahi-Sani, B., Moossavi, M., Derakhshani, A., & Sarab, G. A. (2023). Immunomodulatory actions of vitamin D in various immune-related disorders: a comprehensive review. *Frontiers in Immunology*, 14, 950465. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.950465>
64. Carlberg, C. (2019). Vitamin D signaling in the context of innate immunity: focus on human monocytes. *Frontiers in Immunology*, 10, 2211. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02211>

ANEXOS

ANEXO 1

Descripción: Datos antropométricos tomados en T1 y T2 CON porcentajes de GC metilado en el exón 1 de HLA-C de madres e infantes Kichwa.

Año de Muestreo	MADRES/IFANTES	Individuo	Código de muestra	% CpG AVARAGE	%CpG methylation 1	%CpG methylation 2	%CpG methylation 3	Longitud HLA-C (bp)	DIAGNOSTICO O IMC	DIAGNOSTICO % GRASA	% MUSCULO	RIESGO CARDIOVASCULAR	Ferritina ng/ml	Vitamina D	Hematocrito
2019	Madre	Madre 1	M22	1.73	1.8	1.7	1.5	240	NORMOPESO	OBESIDAD	27.9	MODERADO	10	64.23	48
2019	Madre	Madre 2	M23	2.3	2.3	2.3	2.5	241	SOBREPESO	OBESIDAD	30.7	MODERADO	10	62.85	45
2019	Madre	Madre 3	M18	2.08	1.9	2.4	2.2	239	SOBREPESO	OBESIDAD	25.5	MODERADO	13.43	44.19	48
2019	Madre	Madre 4	M30	1.74	1.6	1.9	2.1	244	SOBREPESO	OBESIDAD	30.1	ALTO	10	58.51	38
2019	Madre	Madre 5	M29	1.69	1.6	1.8	1.7	243	NORMOPESO	OBESIDAD	25.6	ALTO	10	64.48	46
2019	Madre	Madre 6	M32	2.48	2.4	2.6	2.7	239	SOBREPESO	OBESIDAD	27.5	ALTO	10	8	49
2021	Madre	Madre 1	M60	1.96	2	1.9	2.1	244	NORMOPESO	OBESIDAD	28.8	BAJO	18.93	21.1	41
2021	Madre	Madre 2	M68	1.29	1.2	1.4	1.3	245	SOBREPESO	OBESIDAD	27.8	MODERADO	79.25	46.44	36
2021	Madre	Madre 3	M53	1.85	1.8	2	2.1	242	NORMOPESO	OBESIDAD	28.9	BAJO	64.98	48.95	42
2021	Madre	Madre 4	M63	1.63	1.6	1.7	1.6	249	OBESIDAD 1	OBESIDAD	24.1	ALTO	25.71	34.41	37
2021	Madre	Madre 5	M52	2.35	2.3	2.5	2.3	243	SOBREPESO	EMBARAZO	EMBARAZO	ALTO	10.16	20.59	38
2021	Madre	Madre 6	M38	1.66	1.5	1.8	1.8	241	SOBREPESO	OBESIDAD	26.7	ALTO	28.38	19.4	40
Número	BARCODE	Año de Muestreo	MADRES/IFANTES	Individuo	Código de muestra	GC ULTIMO	%CpG methylation 1	%CpG methylation 2	%CpG methylation 3	Longitud HLA-C (bp)	INTERPRETACIÓN Peso	INTERPRETACIÓN talla	Ferritina ng/ml	Vitamina D	Hematocrito
13	7	2019	Infante	Infante 1	I22	1.25	1.2	1.4	1.3	242	PESO ADECUADO	TALLA ALTA	63.36	70	34
14	8	2019	Infante	Infante 2	I23	0.86	0.9	0.8	1	241	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	147.48	60.26	35
15	9	2019	Infante	Infante 3	I18	2.27	2.4	2.2	1.7	243	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	30.22	70	33
16	10	2019	Infante	Infante 4	I30	1.44	1.4	1.4	1.8	244	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	71.72	70	49
17	11	2019	Infante	Infante 5	I29	2.78	2.8	2.9	2.5	246	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	38.16	70	36
18	12	2019	Infante	Infante 6	I32	0.81	0.8	0.7	1	247	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	29.54	70	72
19	19	2021	Infante	Infante 1	I60	1.07	1	1.1	1.3	244	PESO ADECUADO	BAJA TALLA	63.41	68.38	43.17
20	20	2021	Infante	Infante 2	I68	1.92	2	1.8	1.9	242	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	10	31.4	58
21	21	2021	Infante	Infante 3	I53	1.42	1.4	1.6	1.8	240	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	10	37.71	34
22	22	2021	Infante	Infante 4	I63	1.68	1.6	2	1.5	244	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	15.87	16.75	33
23	23	2021	Infante	Infante 5	I52	1.37	1.6	1	1.5	240	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	13.06	12.29	35
24	24	2021	Infante	Infante 6	I38	2.66	2.6	2.6	3.5	240	PESO ADECUADO	TALLA ADECUADA	36.04	16.77	39

ANEXO II

Descripción: Datos de cálculos y diluciones para la extracción, procesamiento con bisulfito, PCR y preparación de librerías para secuenciación de exón 1 de HLA-C en 24 muestras (6 madres T1, 6 infantes T1, 6 madres T2, 6 infantes T2).

DNA ng/ul							BISULFITO		
Individuos	codigo	Cantidad en ul		Solución Bisulfito	DNA PROTECT	AGUA	TOTAL:	de 1 a 10 ng/ul	
		DNA AJUSTADA A 300 ng						DNA ng/ul	NANODROF
1	M22	82	3,66	85,00	35,00	16,34		140,00	28,4
2	M23	120	2,50	85,00	35,00	17,50		140,00	45,9
3	M18	8,5	35,29	85,00	15,00	4,71		140,00	19,4
4	M30	107	2,80	85,00	35,00	17,20		140,00	47,2
5	M29	71	4,23	85,00	35,00	15,77		140,00	40,2
6	M32	96	3,13	85,00	35,00	16,88		140,00	42,2
7	I22	72	4,17	85,00	35,00	15,83		140,00	33,4
8	I23	18	16,67	85,00	35,00	3,33		140,00	47,1
9	I18	12	25,00	85,00	15,00	15,00		140,00	42,2
10	I30	33	9,09	85,00	35,00	10,91		140,00	51,6
11	I29	40	7,50	85,00	35,00	12,50		140,00	24,3
12	I32	29	10,34	85,00	35,00	9,66		140,00	40,7
13	M57	100	3,00	85,00	35,00	17,00		140,00	54
14	M60	35	8,57	85,00	35,00	11,43		140,00	28,2
15	M53	108	2,78	85,00	35,00	17,22		140,00	31,1
16	M63	69	4,35	85,00	35,00	15,65		140,00	35,3
17	M68	103	2,91	85,00	35,00	17,09		140,00	41,2
18	M38	108	2,78	85,00	35,00	17,22		140,00	35,8
19	I57	47	6,38	85,00	35,00	13,62		140,00	25
20	I60	66	4,55	85,00	35,00	15,45		140,00	22,5
21	I53	108	2,78	85,00	35,00	17,22		140,00	34,5
22	I63	105	2,86	85,00	35,00	17,14		140,00	33,8
23	I68	89	3,37	85,00	35,00	16,63		140,00	30,7
24	I38	120	2,50	85,00	35,00	17,50		140,00	26,4
		72,770833							

PCR

Caantidad de muestra para llegar a 25 ng	Muestra a tomar	10xPCR BUFFER	10nM DNTPs	50nM MgCl2	Primer F	Primer R	Plat Tag Poly	H2O	volumen final
0,88	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,54	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
1,29	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,53	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,62	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,59	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,75	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,53	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,59	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,48	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
1,03	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,61	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,46	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,89	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,80	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,71	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,61	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,70	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
1,00	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
1,11	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,72	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,74	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,81	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
0,95	2,00	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	17,05	25 ul
	BLANCO	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	19,05	25 ul
	EXTRA	2,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,20	19,05	25 ul
pron	0,75	60,00	12,00	18,00	24,00	24,00	4,80	409,20	650,00

SEC								
Electroforesis	volumen para secuenciar	DNA ng/ul	Volumen de muestra para 5	Volumen rec H2O	Barcode	BARCODE	TOTAL	
3 ul	20	8,3	6,02	6	3 BARCODE 1	1 ul	10 ul	
3 ul	20	11	4,55	5	4 BARCODE 2	1 ul	10 ul	
3 ul	20	13	3,85	4	5 BARCODE 3	1 ul	10 ul	
3 ul	20	17	2,94	3	6 BARCODE 4	1 ul	10 ul	
3 ul	20	9,9	5,05	5	4 BARCODE 5	1 ul	10 ul	
3 ul	20	19	2,63	3	6 BARCODE 6	1 ul	10 ul	
3 ul	20	6,1	8,20	8	1 BARCODE 7	1 ul	10 ul	
3 ul	20	12	4,17	4	5 BARCODE 8	1 ul	10 ul	
3 ul	20	17	2,94	3	6 BARCODE 9	1 ul	10 ul	
3 ul	20	14	3,57	4	5 BARCODE 10	1 ul	10 ul	
3 ul	20	4,98	10,04	9	0 BARCODE 11	1 ul	10 ul	
3 ul	20	7,4	6,76	7	2 BARCODE 12	1 ul	10 ul	
3 ul	20	14	3,57	4	5 BARCODE 13	1 ul	10 ul	
3 ul	20	15	3,33	3	6 BARCODE 14	1 ul	10 ul	
3 ul	20	8,9	5,62	6	3 BARCODE 15	1 ul	10 ul	
3 ul	20	14	3,57	4	5 BARCODE 16	1 ul	10 ul	
3 ul	20	11	4,55	5	4 BARCODE 17	1 ul	10 ul	
3 ul	20	12	4,17	4	5 BARCODE 18	1 ul	10 ul	
3 ul	20	12	4,17	4	5 BARCODE 19	1 ul	10 ul	
3 ul	20	9,6	5,21	5	4 BARCODE 20	1 ul	10 ul	
3 ul	20	20	2,50	3	7 BARCODE 21	1 ul	10 ul	
3 ul	20	14	3,57	4	5 BARCODE 22	1 ul	10 ul	
3 ul	20	7,9	6,33	6	3 BARCODE 23	1 ul	10 ul	
3 ul	20	8,9	5,62	6	3 BARCODE 24	1 ul	10 ul	
			4,70	4,66				

ANEXO III

Descripción: Datos de patrones/niveles de metilación en citosinas del exón 1 de HLA-C 24 muestras ((6 madres T1, 6 infantes T1, 6 madres T2, 6 infantes T2).

Muestra	19-20	21-22	22-23	32-33	39-40	42-43	43-44	50-51	51-52	54-55	58-59	60-61	61-62	63-64	64-65	66-67	67-68	69-70	78-79	79-80	84-85	87-88	90-91	93-94	96-97	
M01		0	0	44.4444	0.9932	1.8519	33.3333	0	0.6749	0.8956	2.3226			0	0	0	0.5912	0.9264	33.3333	7.6923	0.5727		1.4982	0.7426	30.7692	
M02		0	33.3333	16.6667	0.798	2.6549	20		0.9982	1.0402	1.7405		100	0	0	0	0.4792	0.5473		0	0.3092		0.8325	0.4322	15	
M03		0	0	22.2222	0.7094	0	50	0	0.8109	0.5805	1.3075		0	0		0	0.3094	0.641		14.2857	0.3652		1.1374	0.3818	6.25	
M04		0	10	22.2222	0.8906	1.0309	0	0	1.0215	0.8962	1.577		0	0		0	0.504	0.8181	0	0	0.421		1.1138	0.3766	25	
M05		5.5556	0	16.6667	0.5906	4.4118	0	0	0.4813	0.9936	1.7488			0		0	0.5562	0.7589	0	0	0.7205		1.247	0.7475	17.6471	
M06		0	0	33.3333	0.9179	5.4348	9.0909	0	0.5941	1.257	1.9038			0	0	0	0.5423	0.7808		0	0.6924		1.5256	0.7922	12	
I01	0	0	5.5556	0	0.6558	4.4444	17.6471	0	0.577	0.8814	1.7433			0	0		0.4664	0.5688		6.6667	0.4535		1.3801	0.5256	41.6667	
I02		0	0	16.6667	1.0718	21.4286	60	0	0.9217	0.8807	1.371			0	0	0	16.6667	0.7752	0.6366	0	0	0.4693		1.1308	0.3896	28.5714
I03		0	14.2857	0	1.3954	2.1277	14.2857		0.5202	1.2873	2.4467			0	0		7.6923	1.2944	0.9806	0	0	1.7414		2.3868	1.9504	25
I04		0	5.5556	54.5455	0.888	6.8182	50		0.6336	1.2063	1.877					0	0.8622	1.0068		0	0.7579		1.6242	1.2452	17.8571	
I05		0	0	0	1.0896	0			0.6996	1.0984	2.229	0		0	0	0	0.8333	0.7722		5.5556	1.756		1.7371	1.5053	23.5294	
I06		0	0	50	0.3377	2.1739	37.5	0	0.447	0.8453	1.2917			0	0	0	0.405	0.8952		0	0.4155		1.2492	0.2242	37.5	
M01		5.2632	0	0	0.8914	7.2727	22.2222	0	0.9883	0.7393	1.6451			0	0	0	0.58	0.5611	0	0	0.5903		1.3555	0.5679	29.4118	
M02	0	4.3478	0	0	0.7098	3.4483	12.5	0	0.751	0.9834	1.3316			0	0	0	0.6215	0.604		0	0.5235		1.2267	0.4281	18.1818	
M03	0	0	0	0	0.6579	3.0075	71.4286	0	0.7069	0.8544	1.4277	0		0	25	0	0.4439	0.6764	50	4.7619	0.3711		0.7753	0.5555	14.8148	
M04		0	5.5556	16.6667	0.6879	4.0816	44.4444	0	0.3506	0.8413	1.5563			0		14.2857	0.4031	0.6199	0	5	0.3676		1.2737	0.2765	22.2222	
M05		0	0	33.3333	1.0281	0	36.3636	0	0.7859	0.6963	1.4747			0	66.6667	16.6667	0.5827	0.7559		7.1429	0.5347		1.1775	0.5569	14.8148	
M06		10	0	37.5	0.6923	1.2579	0	0	0.8825	1.0297	1.6479			0	0	0	0.834	0.8569	0	0	0.9482		1.3532	0.8374	14.2857	
I01		0	4	50	0.692	1.5504	44.4444	0	1.4667	0.9431	1.3412					0	0.2993	0.6806		8.3333	0.3652		0.9794	0.3431	0	
I02		7.1429	10	16.6667	0.9899	4.3478	75		0.7717	1.2862	2.2642					0	1.1038	1.3916		0	1.7731		2.4192	1.1436	22.7273	
I03		0	0	0	0.8736	0	0	0	0.4785	0.9449	2.2501					0	0.9336	0.9804	0	0	0.9528		1.8948	0.7089	30	
I04		0	0	66.6667	0.9874	3.7037	60		0.667	0.9598	1.7846			0	0	0	0.7958	0.8217		0	0.7576	0	1.6075	0.8748	13.5135	
I05	0	0	0	25	1.0654	29.4118	21.0526	0	0.6966	1.0443	1.6565			0		0	0.9954	1.0236		0	0.7371		1.6812	0.641	25	
I06		0	0	0	0.8151	3.5461	12.5	0	0.7382	0.9088	1.7401			0	0	0	0.6453	0.8784	0	5.5556	0.8389		1.1852	0.5045	22.5806	

ANEXO IV

Descripción: “Barcodes” o cebadores de secuenciación de cada muestra secuenciada de HLA-C 24 muestras (6 madres T1, 6 infantes T1, 6 madres T2, 6 infantes T2).

# Barcode	Secuencia adaptadora de Barcode	Muestra de Saliva	Año de toma de muestra
1	AAGAAAGTTGTCGGTGTCTTTGTG	Madre # 1	T1
2	TCGATTCCGTTTGTAGTCGTCTGT	Madre # 2	
3	GAGTCTTGTGTCCAGTTACCAGG	Madre # 3	
4	TTCGGATTCTATCGTGTTCCCTA	Madre # 4	
5	CTTGTCAGGGTTTGTGTAACCTT	Madre # 5	
6	TTCTCGCAAAGGCAGAAAGTAGTC	Madre # 6	
7	GTGTTACCGTGGGAATGAATCCTT	Infante # 1	
8	TTCAGGGAACAAACCAAGTTACGT	Infante # 2	
9	AACTAGGCACAGCGAGTCTTGTT	Infante # 3	
10	AAGCGTTGAAACCTTTGTCCTCTC	Infante # 4	
11	GTTTCATCTATCGGAGGGAATGGA	Infante # 5	
12	CAGGTAGAAAGAAGCAGAATCGG A	Infante # 6	
13	AGAACGACTTCCATACTCGTGTGA	Madre # 1	T2
14	AACGAGTCTCTTGGGACCCATAGA	Madre # 2	
15	AGGTCTACCTCGCTAACACCACTG	Madre # 3	
16	CGTCAACTGACAGTGGTTCGTA	Madre # 4	
17	ACCCTCCAGGAAAGTACCTCTGAT	Madre # 5	

18	CCAAACCCAACAACCTAGATAGG C	Madre # 6
19	G TTCCTCGTGCAGTGTCAAGAGAT	Infante # 1
20	TTGCGTCCTGTTACGAGAACTCAT	Infante # 2
21	GAGCCTCTCATTTGTCCGTTCTCTA	Infante # 3
22	ACCACTGCCATGTATCAAAGTACG	Infante # 4
23	CTTACTACCCAGTGAACCTCCTCG	Infante # 5
24	GCATAGTTCTGCATGATGGGTTAG	Infante # 6

ANEXO V

Descripción: Especificaciones de las 3 secuenciaciones realizadas a las 24 muestras de HLA-C en madres e infantes; número de lecturas obtenidas y tamaño promedio de la secuenciación.

Secuenciación #	Tiempo de Secuenciación	Ajuste de Calidad Nanopore	Lecturas generadas	Promedio de amplicón HLA-C secuenciado
SEC # 1	4 HORAS	Normal	634.84 k	247 pb
SEC # 2	2 HORAS	Normal	251.52 k	246 pb
SEC # 3	35 MIN	Alta calidad	45.54 k	249 pb

ANEXO VI

Descripción: Características nutricionales de madres e infantes lactantes Kichwa.

MADRES:

	T1 N = 6		T2 N = 6		P value
BMI Diagnosis, N (%)					
Normoweight	2	33.3	2	33.3	0.6276
overweight	4	66.7	3	33.3	
Obesity	0	0	1	16.7	
Fat Percentage, N (%)					
Average	0	0	0	0	0
Obesity	6	100	6	100	
Cardiovascular Risk, N (%)					
Low	1	16.7	2	33.3	0.7277
Moderate	2	33.3	1	16.7	
High	3	50	3	50	
Ferritine, median (IQR)	10.57	(10 - 10,86)	37.90	(10,16 - 68,55)	0.0043
Vitamin D, median (IQR)	60.68	(35,14 - 64,29)	27.76	(20,19 - 47,07)	0.132
Hematocrit, median (IQR)	47	(43,25- 48,25)	39	(36,75 - 41,25)	0.0173
Muscle %, median (IQR)	27.70	(25,80- 30,25)	27.80	(25,40 - 28,85)	0.7922
H/w %, median (IQR)	0.88	(0,82 - 0,92)	0.84	(0,8 - 0,95)	0.2987

INFANTES / LACTANTES

	T1 N = 6		T2 N = 6		P value
Age, weeks	10.25	(2,025- 13, 08)	117.3	(98,40 - 119,9)	0.0022
Weight interpretation					
Adequate	6	100	6	100	0
Overweight risk	0	0	0	0	
Emaciated	0	0	0	0	
Height interpretation					
Adequate	5	83.3	5.0	83.3	0.4
Low	0	0.0	1.0	16.7	
High	1		0.0	0.0	
BMI / age Interpretation					
Adequate	5	83.3	2.0	33.3	0.0
Overweight risk	0	0.0	4.0	66.7	
Emaciated	1	16.7	0.0	0.0	
Ferritine, median (IQR)	50.76	(30,05- 90,66)	14.47	(10 - 42,87)	0.0476
Vitamin D, median (IQR)	70.00	(67,57-70)	24.09	(15,64-45,78)	0.0152
Hematocrit, median (IQR)	34.50	(32,75-39,25)	34.50	(33,75-38,25)	0.80

ANEXO VII

Descripción: Correlación de porcentaje de metilación respecto a características nutricionales relevantes en madres e infantes Kichwa a través del tiempo

		T1		T2		P value
		N	Media (IQR)	N	Media (IQR)	
Kichwa Mothers	Cardiovascular Risk, N (%)					
	Low	1	1, 7 (1, 5- 1, 8)	2	2 (1,8 - 2,1)	ns
	Moderate	2	2, 3 (2,123- 2, 425)	1	1,3 (1,2 - 1, 4)	0.0001
	High	3	1, 9 (1, 650- 2, 7)	3	1,8 (1, 6 - 2, 5)	ns
	BMI Diagnosis, N (%)					
	Normoweight	2	1, 7 (1, 5- 1, 8)	2	2 (1, 875- 2, 1)	0.0078
Overweight	4	2, 3 (1, 950 - 2, 475)	3	1, 8 (1, 350- 2, 3)	0.0065	
Obesity	0	NS	1	1, 6 (1, 6- 1, 7)	ns	
Kichwa infants	Height interpretation					
	Adequate	5	1, 3 (1, 2- 1, 4)	5.0	1,8 (1, 5- 2)	ns
	Low	0	NS	1.0	1, 1 (1 - 1, 3)	
	High	1	1, 4 (0,9- 2,4)	0.0	NS	
	BMI / age Interpretation					
	Adequate	5	1, 4 (0,9 - 2, 4)	2.0	1, 8 (1, 625 - 1, 925)	ns
Overweight risk	0	NS	4.0	1, 55 (1, 150 - 2, 450)	<0,0001	
Emaciated	1	1, 3 (1,2- 1, 4)	0.0	NS	ns	

ANEXO VIII

Descripción: Reporte de resultados de la primera secuenciación del exón 1 de HLA-C en las 24 muestras de HLA-C en madres e infantes. Generado en la plataforma Nanopore Tech con los resultados de la secuenciación 1.



Run Info

Host Name	MC-110410 (localhost)
Position	MC-110410_0
Experiment Name	HLA_C_Final
Sample ID	no_sample
Run ID	3f04290b-3d8d-48a9-a81e-158279d772f2
Acquisition ID(s)	50efbfe0d9cd73f7fe048dce8dbcee48c1adb3c6, d8ebeca6e8635a47e09bc7283df833a641fd2581
Flow Cell Id	FAO49264
Start Time	October 9, 22:34
Run Length	3h 59m

Run Summary

Reads Generated	634.84 k
Passed Bases	72.98 Mb
Failed Bases	92.24 Mb
Estimated Bases	181.11 Mb

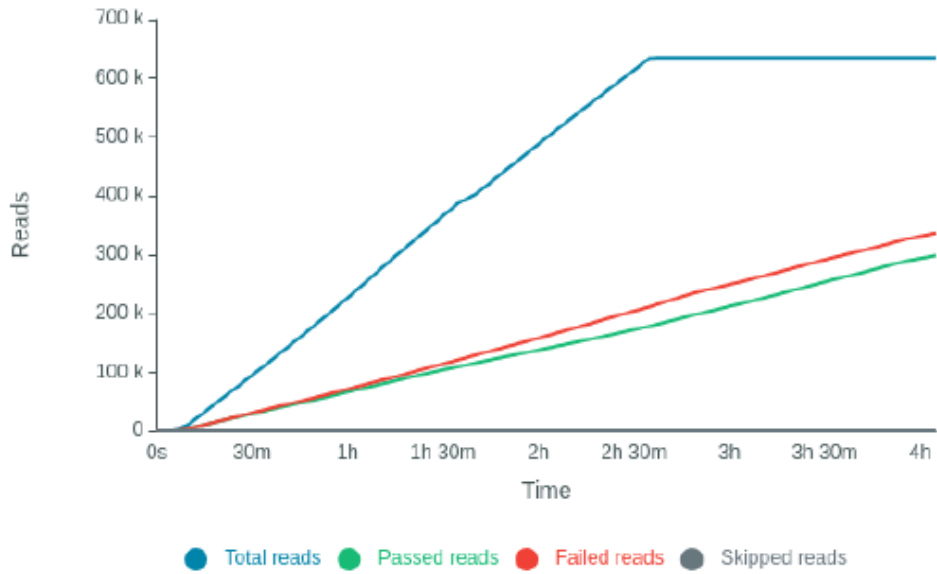
Run Parameters

Flow Cell Type	FLO-MIN106
Kit	SQK-RBK110-96
Initial bias voltage	-180 mV
FAST5 output	Enabled
FASTQ output	Enabled
BAM output	Disabled
Bulk file output	Disabled
Active channel selection	Enabled
Basecalling	Enabled
Specified run length	2 hours 30 minutes
FAST5 reads per file	4000
FAST5 output options	vbz_compress,fastq.raw
FASTQ reads per file	4000
FASTQ output options	compress
Mux scan period	1 hour 30 minutes
Reserved pores	0 %
Basecall model	High-accuracy basecalling
Barcoding	barcoding_kits=["SQK-RBK110-96"],trim_barcodes="off",require_barcodes_both_ends="off",detect_mid_strand_barcodes="off",min_score=60
Read filtering	min_qscore=9

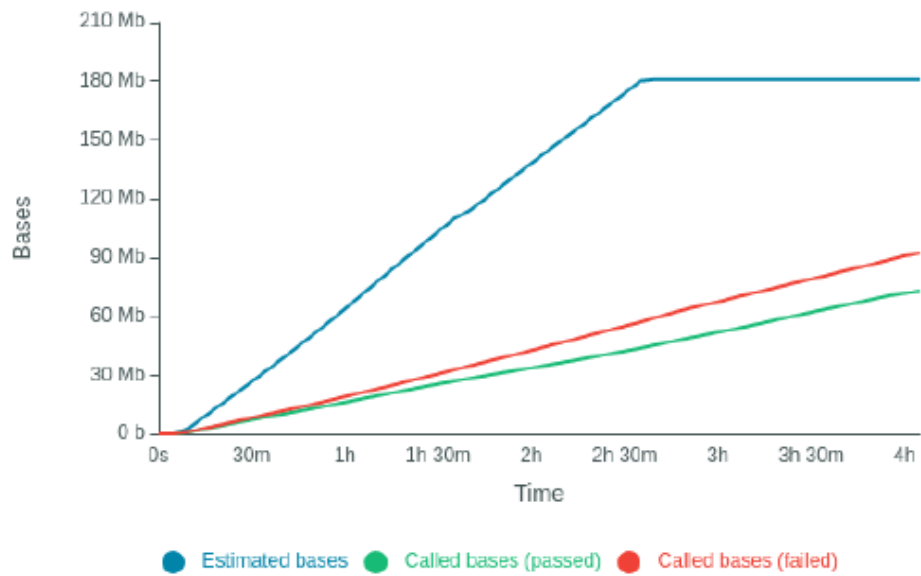
Versions

MinKNOW	21.05.21
MinKNOW Core	4.3.12
Bream	6.2.6
Guppy	5.0.13

Cumulative Output Reads

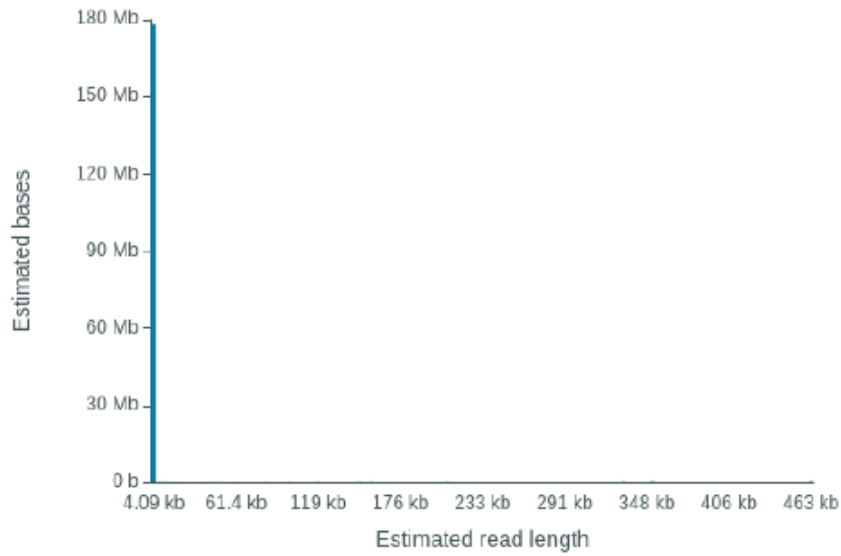


Cumulative Output Bases



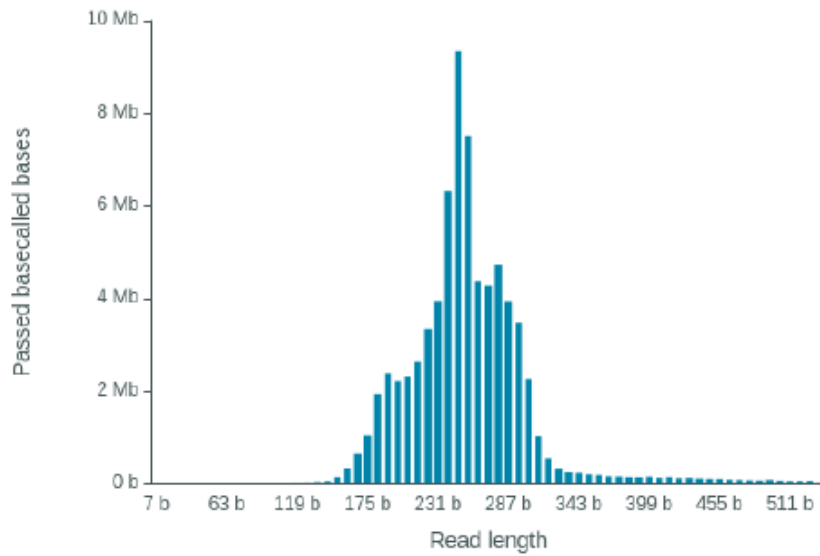
Read Length Histogram Estimated Bases - Outliers Discarded

Estimated N50: 270 b



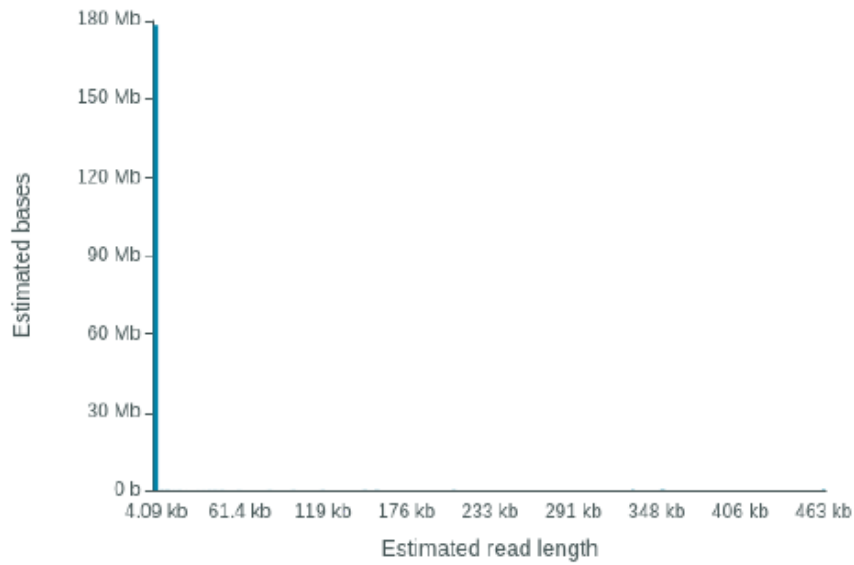
Read Length Histogram Basecalled Bases - Outliers Discarded

Estimated N50: 247 b



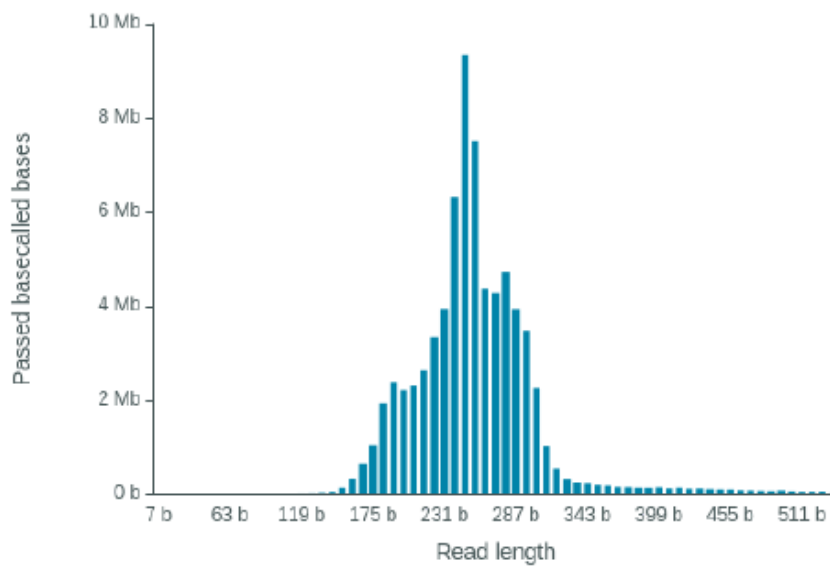
Read Length Histogram Estimated Bases

Estimated N50: 270 b

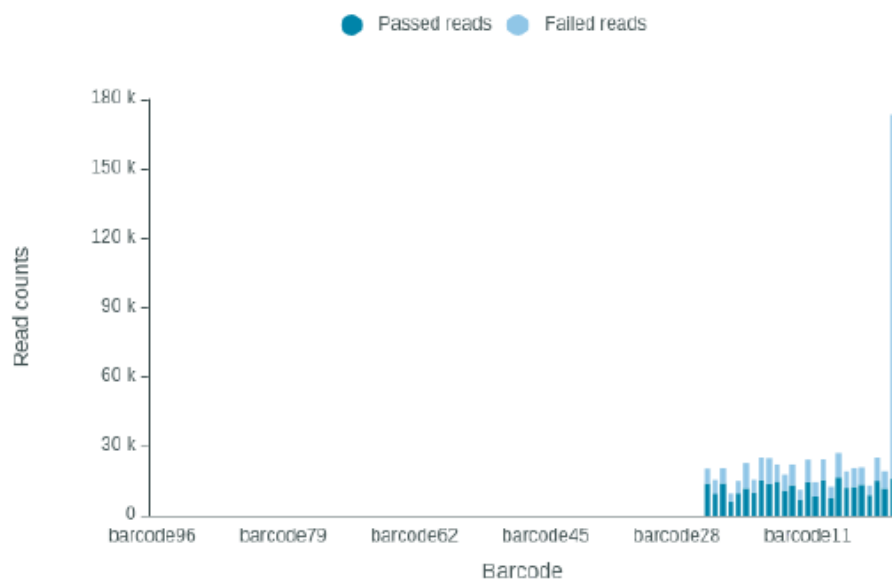


Read Length Histogram Basecalled Bases

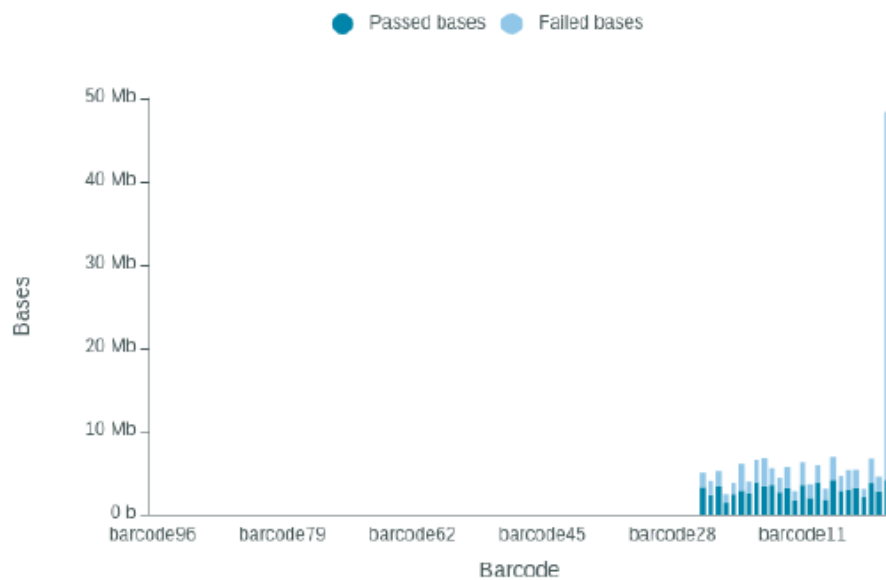
Estimated N50: 247 b



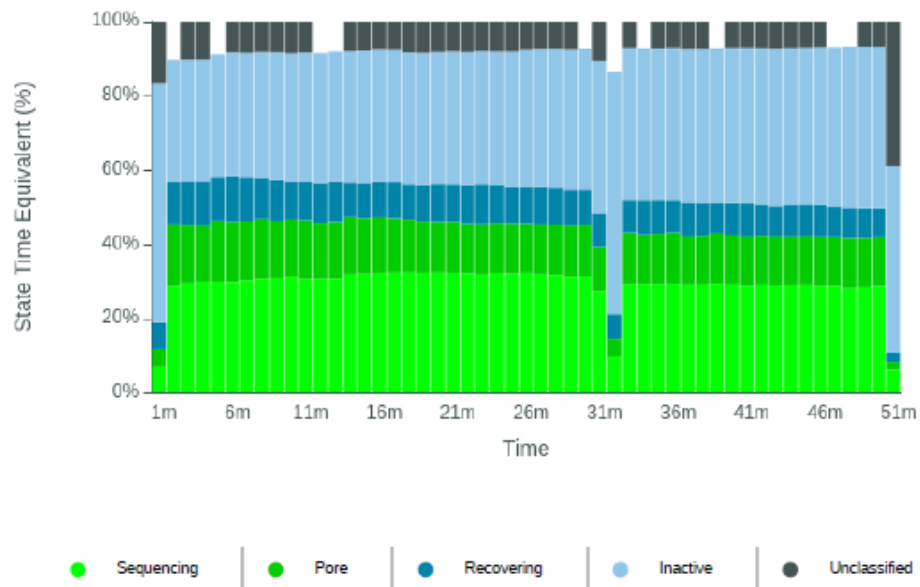
Barcode Read Counts (reads)



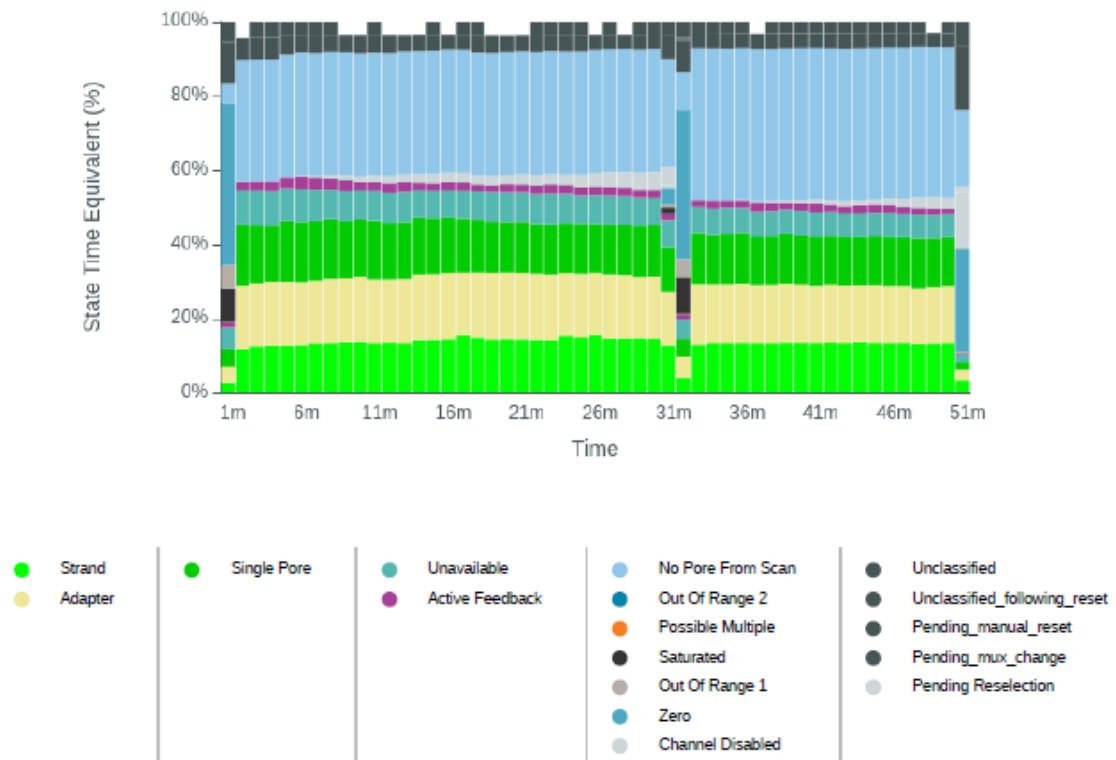
Barcode Read Counts (bases)



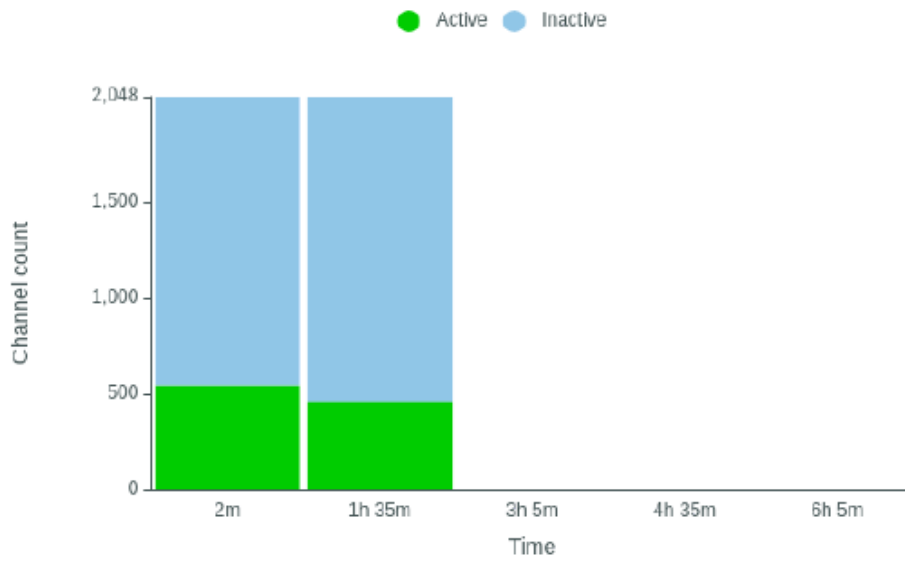
Duty Time Grouped



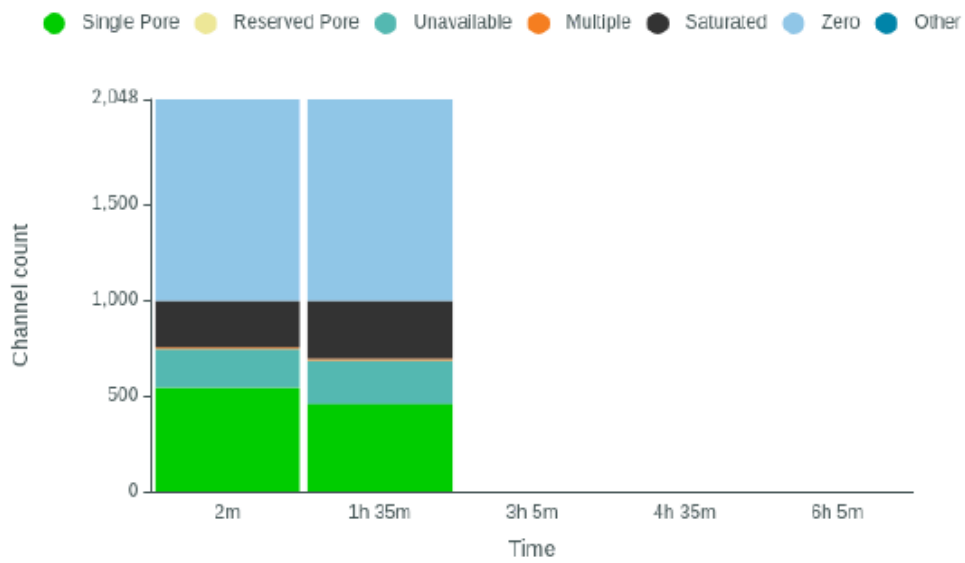
Duty time Categorized



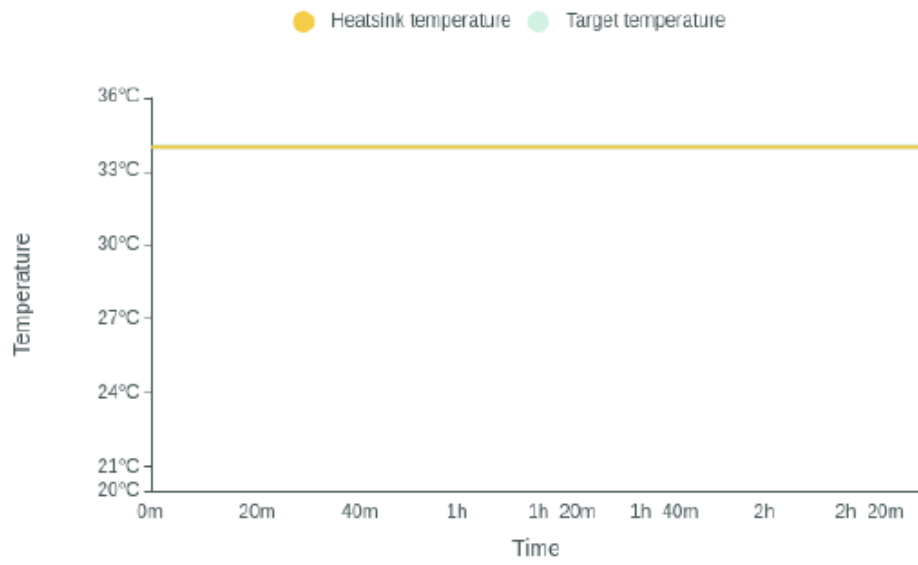
Mux Scan Grouped



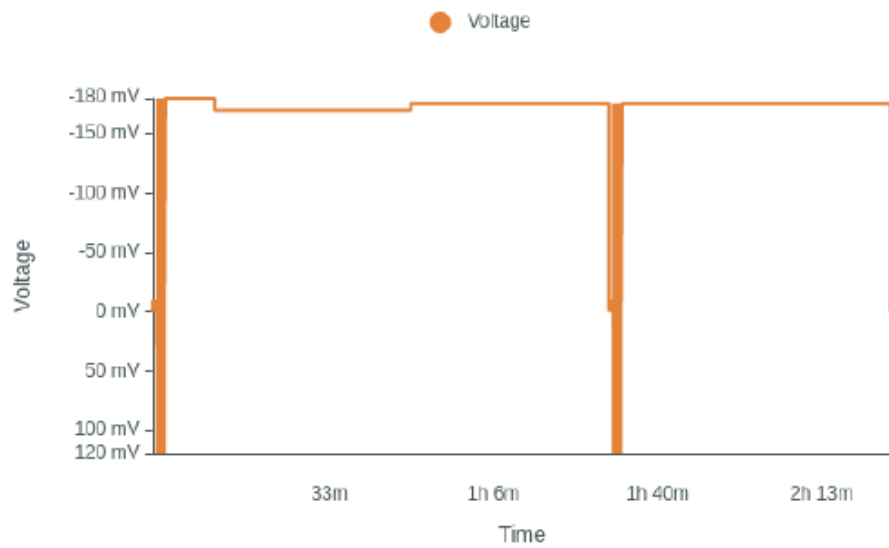
Mux Scan Categorized



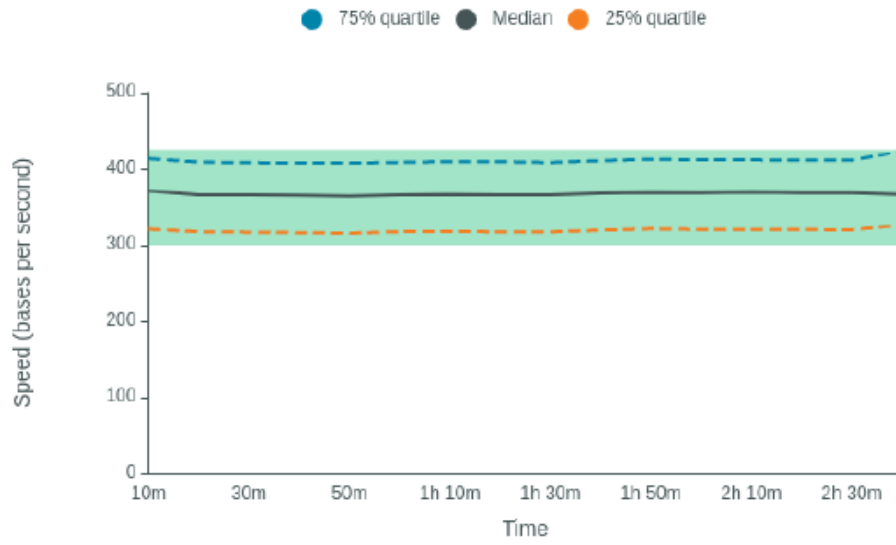
Temperature History



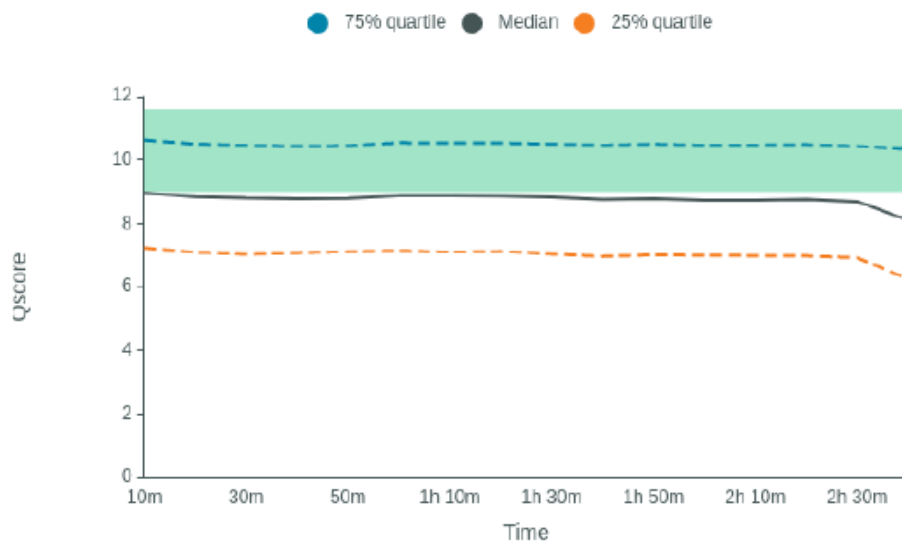
Bias Voltage History



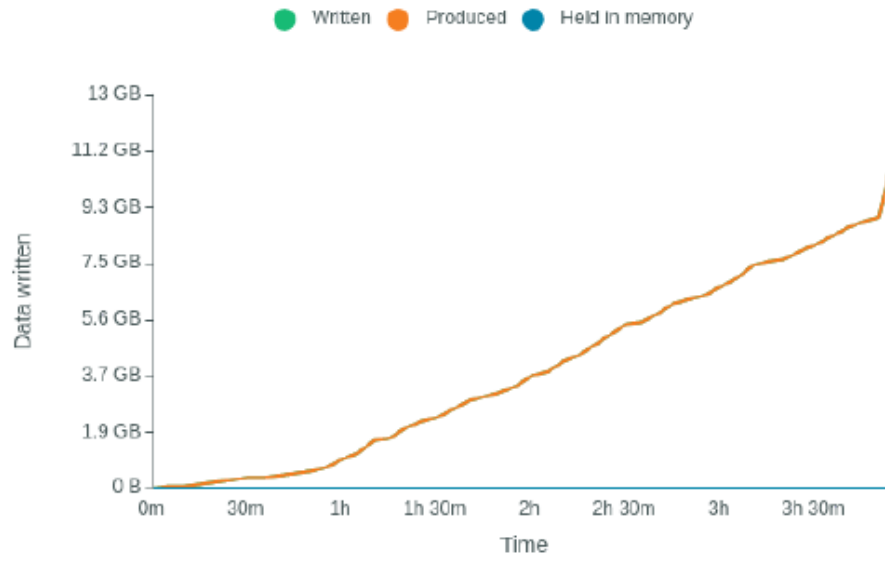
Translocation Speed



QScore



Disk Write Performance



ANEXO IX

Descripción: Reporte de resultados de la primera secuenciación del exón 1 de HLA-C en las 24 muestras de HLA-C en madres e infantes. Generado en la plataforma Nanopore Tech con los resultados de la secuenciación 3.



Run Info

Host Name	MC-112770 (localhost)
Position	MC-112770
Experiment Name	prueba_celda
Sample ID	no_sample
Run ID	38870cf5-372f-4c3c-a5b9-b1ca65b218d4
Acquisition ID(s)	a03c264e415bf68180316b003c96269b6e14675e, c5cfd4ab2808db6878b5c4b2c2270fbb4a486a35
Flow Cell Id	FAR96086
Start Time	October 13, 15:32
Run Length	35m

Run Summary

Reads Generated	45.54 k
Passed Bases	8.48 Mb
Failed Bases	3.17 Mb
Estimated Bases	13.05 Mb

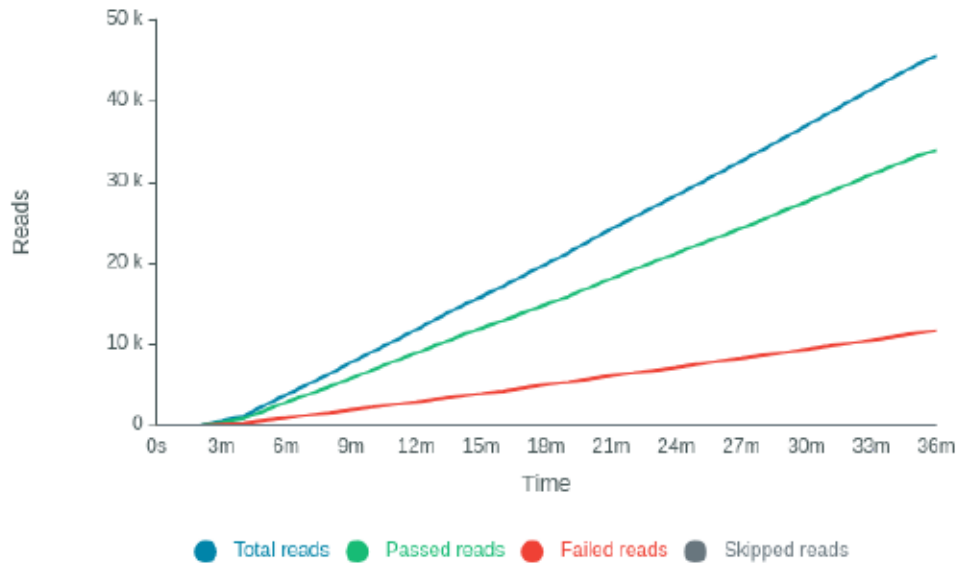
Run Parameters

Flow Cell Type	FLO-MIN106
Kit	SQK-RBK110-96
Initial bias voltage	-180 mV
FAST5 output	Enabled
FASTQ output	Enabled
BAM output	Enabled
Bulk file output	Disabled
Active channel selection	Enabled
Basecalling	Enabled
Specified run length	1 hour
FAST5 reads per file	4000
FAST5 output options	vbz_compress,fastq.raw
FASTQ reads per file	4000
FASTQ output options	compress
Mux scan period	1 hour 30 minutes
Reserved pores	0 %
Basecall model	Fast basecalling
Barcoding	barcoding_kits=["SQK-RBK110-96"],trim_barcodes="off",require_barcodes_both_ends="off",detect_mid_strand_barcodes="off"
Read filtering	min_qscore=8
Read splitting	enable=off

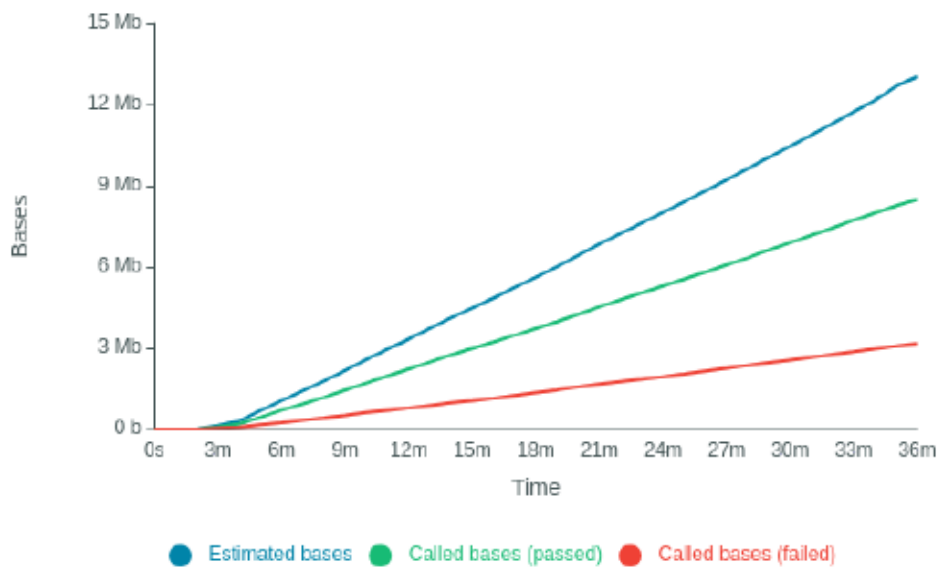
Versions

MinKNOW	21.11.6
MinKNOW Core	4.5.4
Bream	6.3.5
Guppy	5.1.12

Cumulative Output Reads

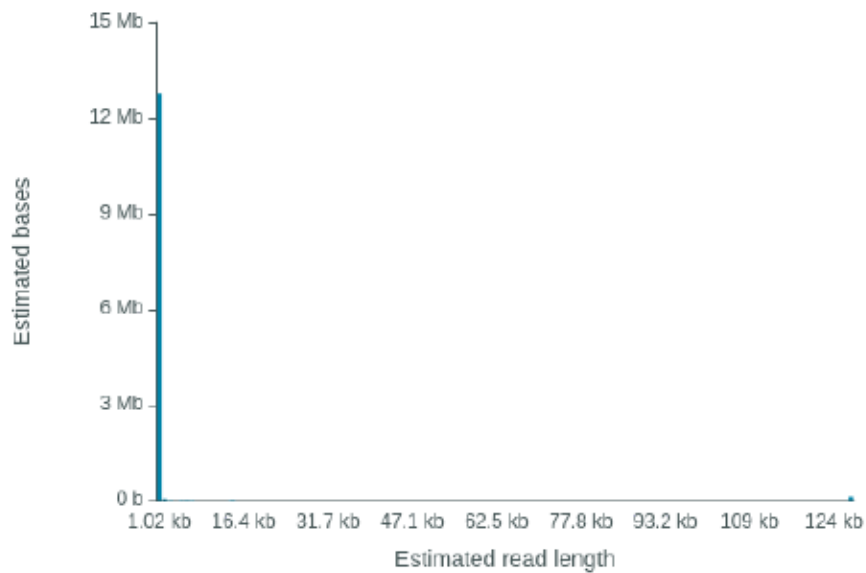


Cumulative Output Bases



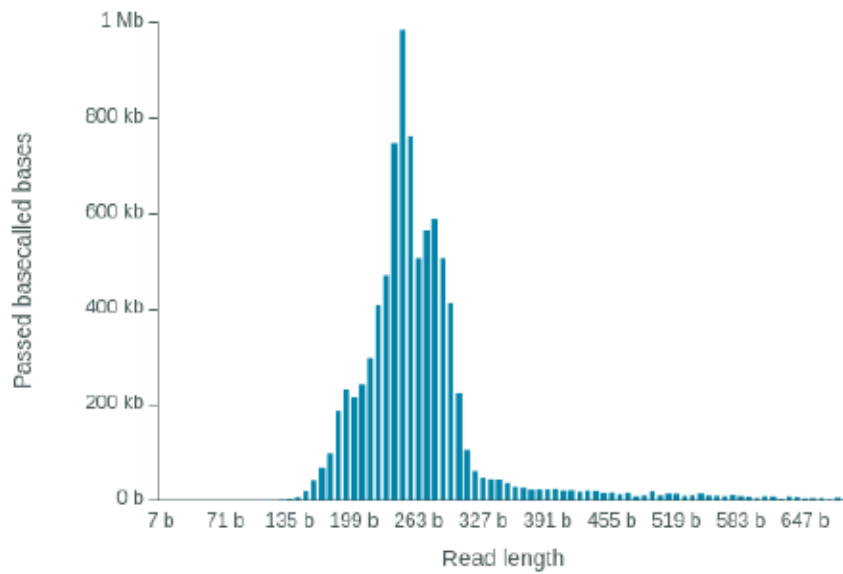
Read Length Histogram Estimated Bases - Outliers Discarded

Estimated N50: 273 b



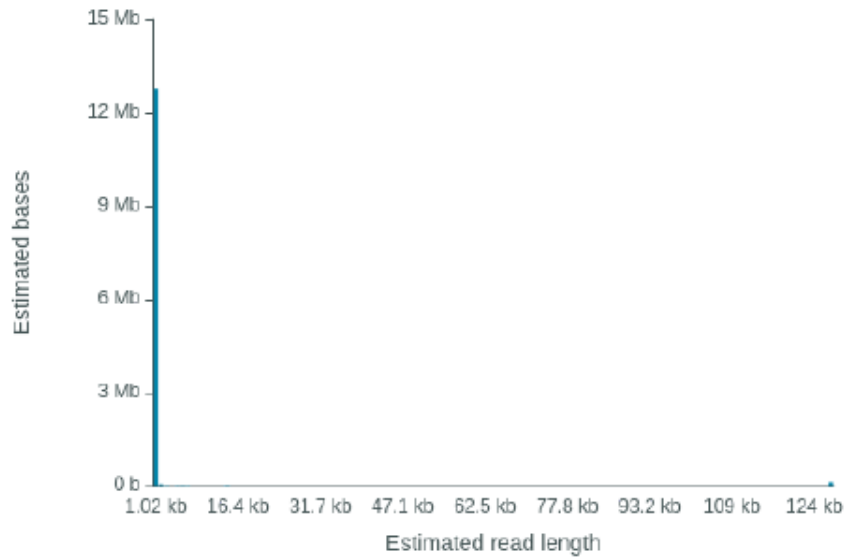
Read Length Histogram Basecalled Bases - Outliers Discarded

Estimated N50: 249 b



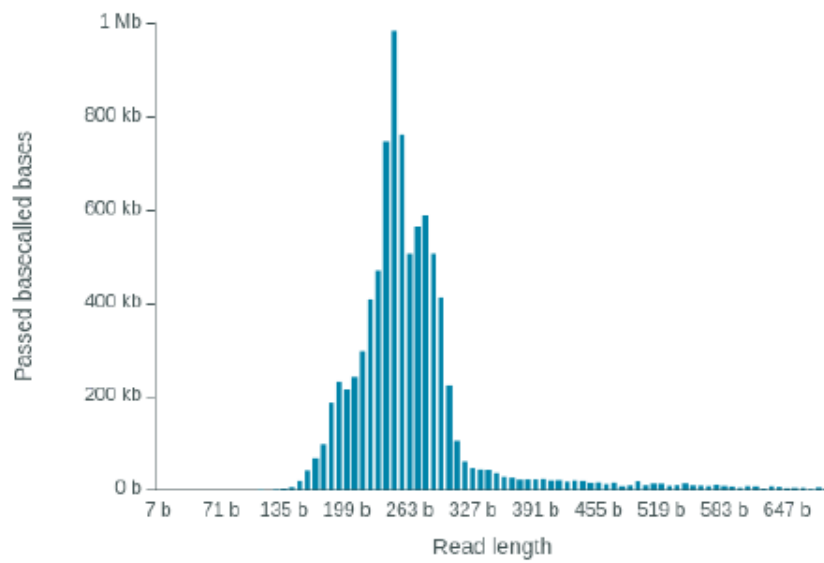
Read Length Histogram Estimated Bases

Estimated N50: 273 b

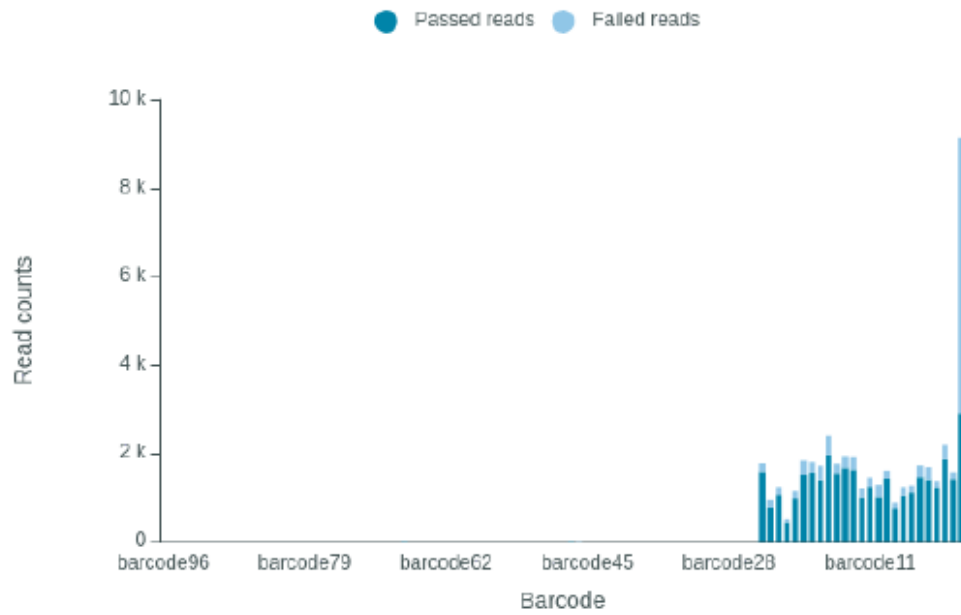


Read Length Histogram Basecalled Bases

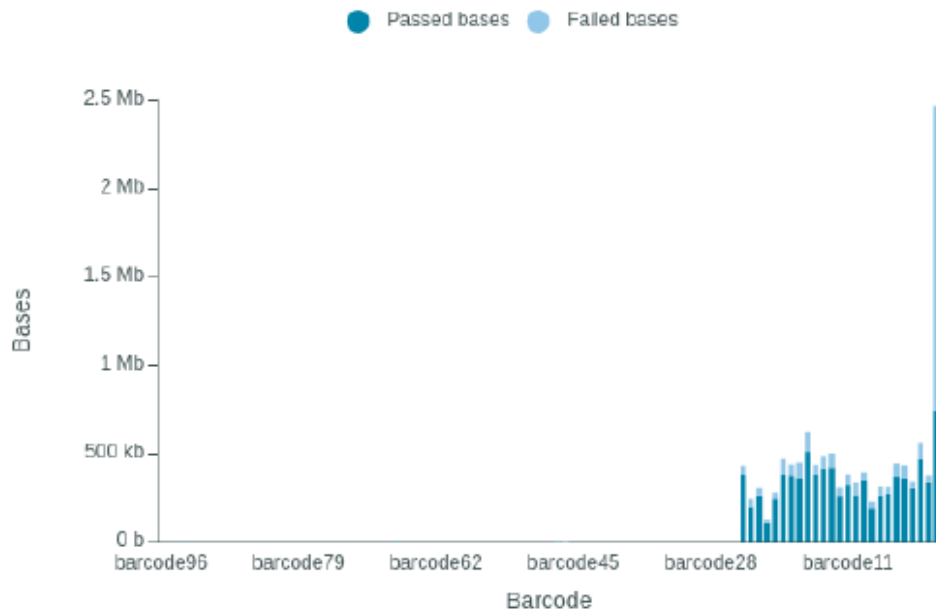
Estimated N50: 249 b



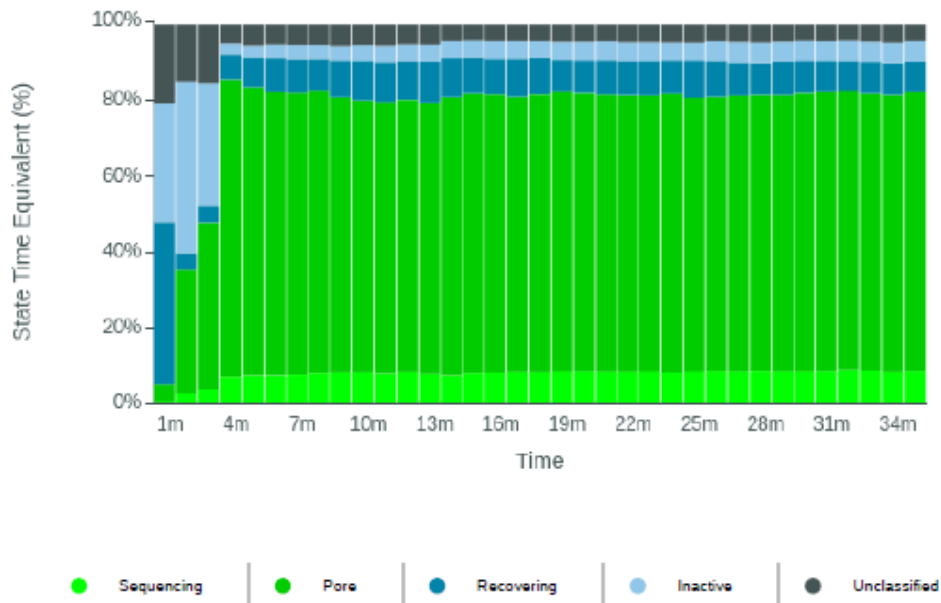
Barcode Read Counts (reads)



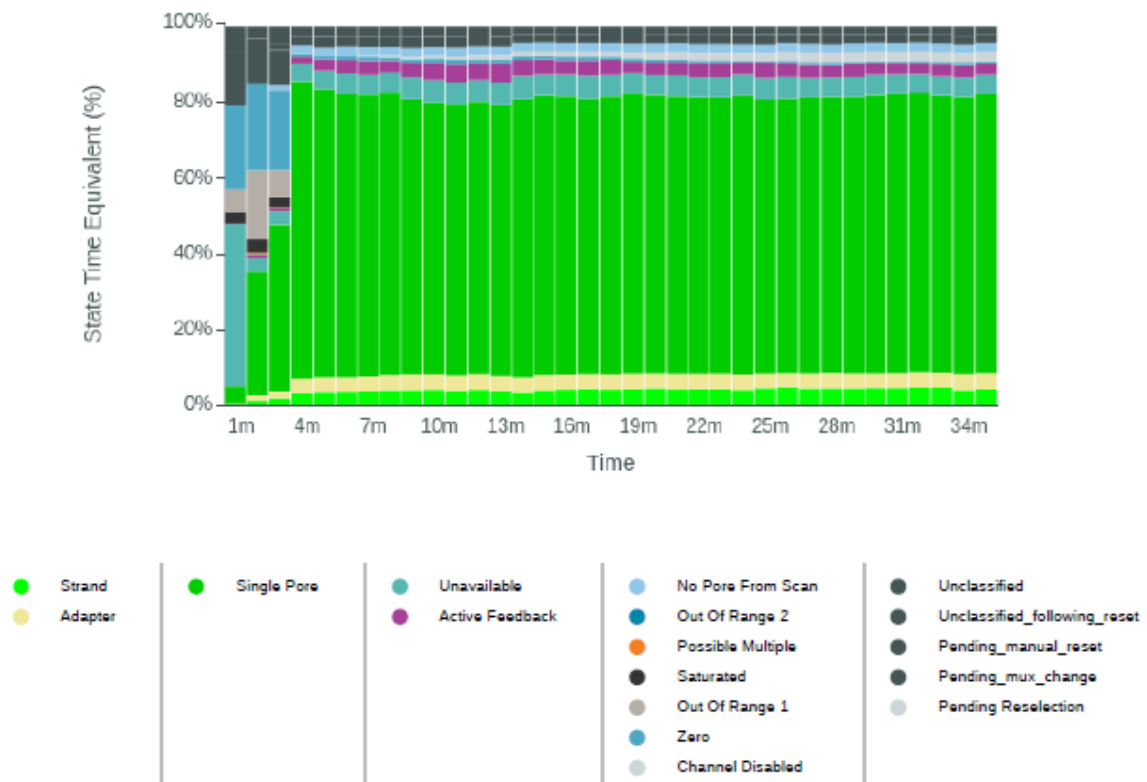
Barcode Read Counts (bases)



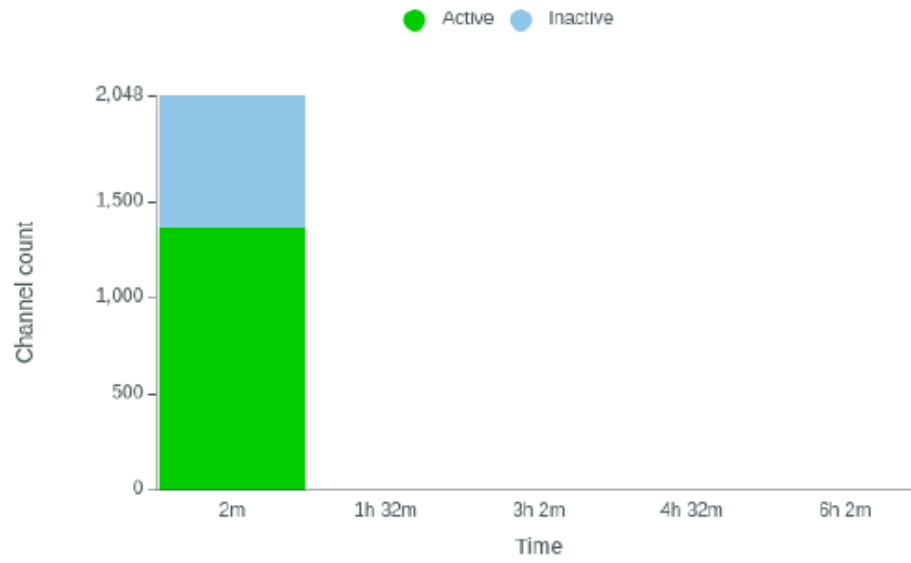
Duty Time Grouped



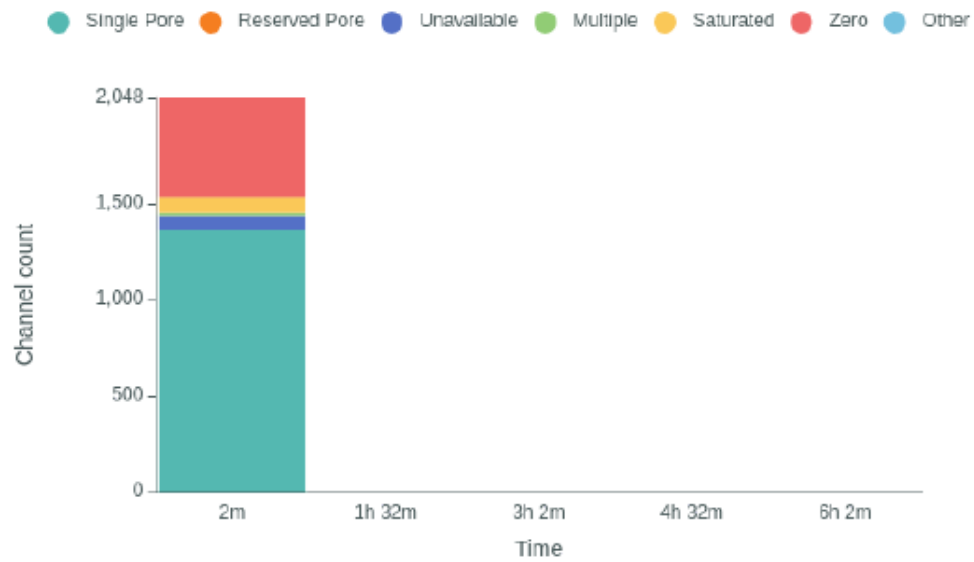
Duty time Categorized



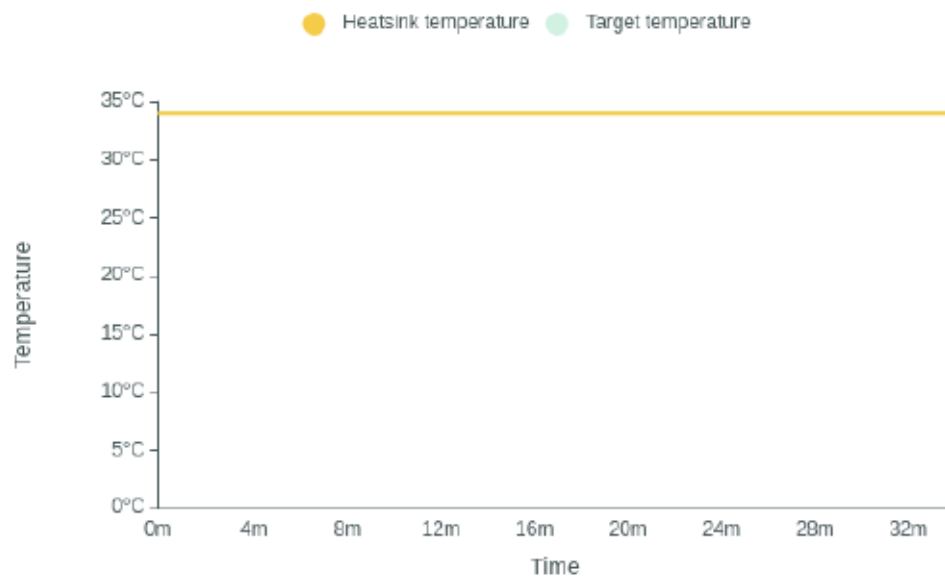
Mux Scan Grouped



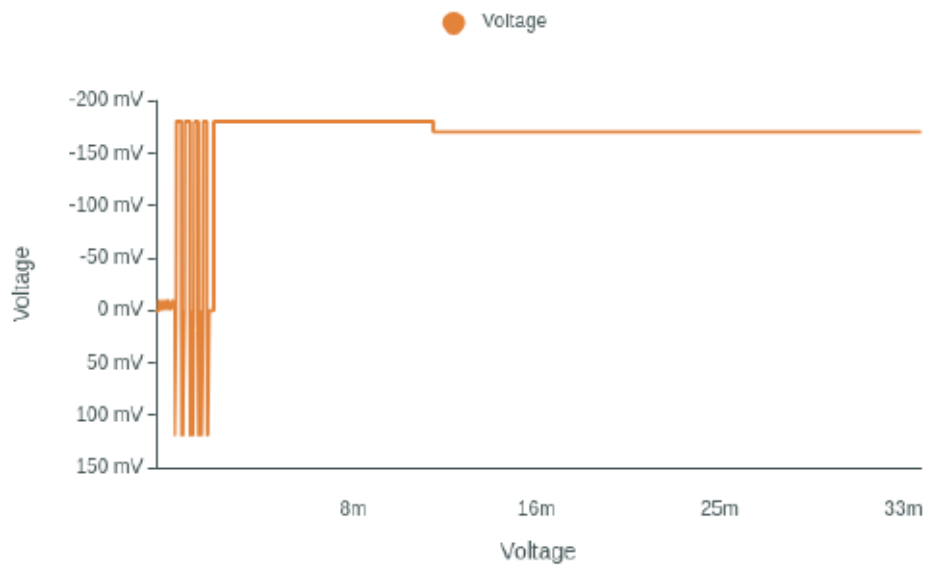
Mux Scan Categorized



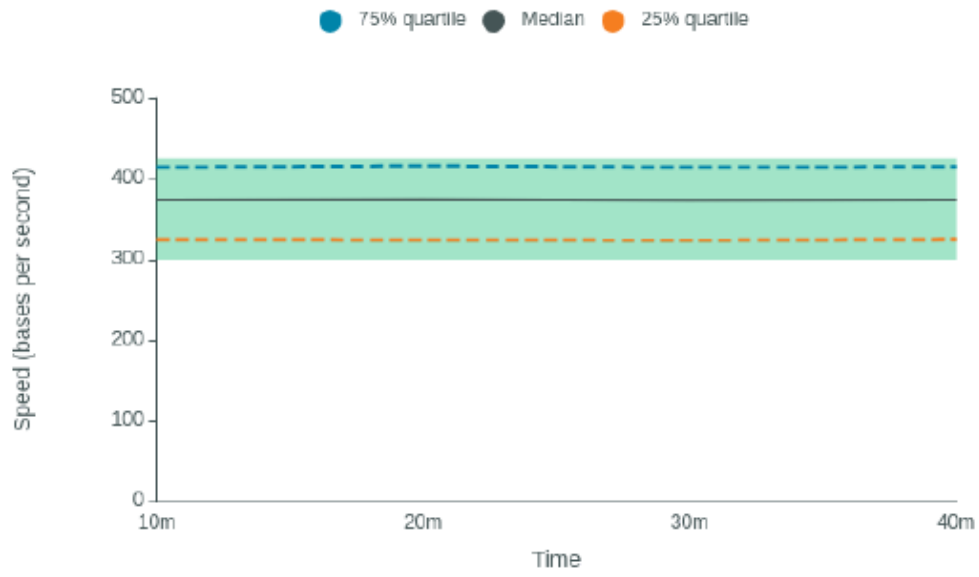
Temperature History



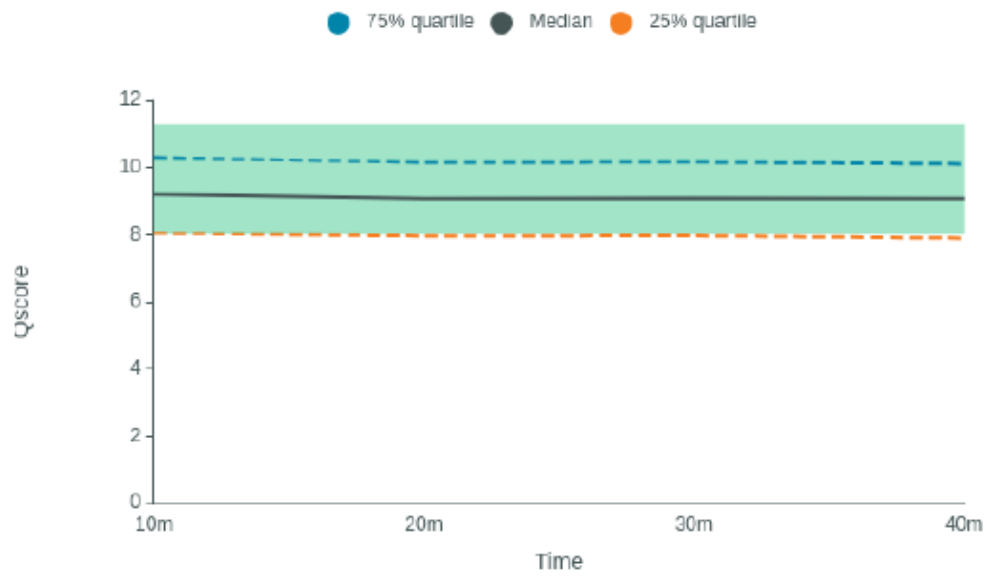
Bias Voltage History



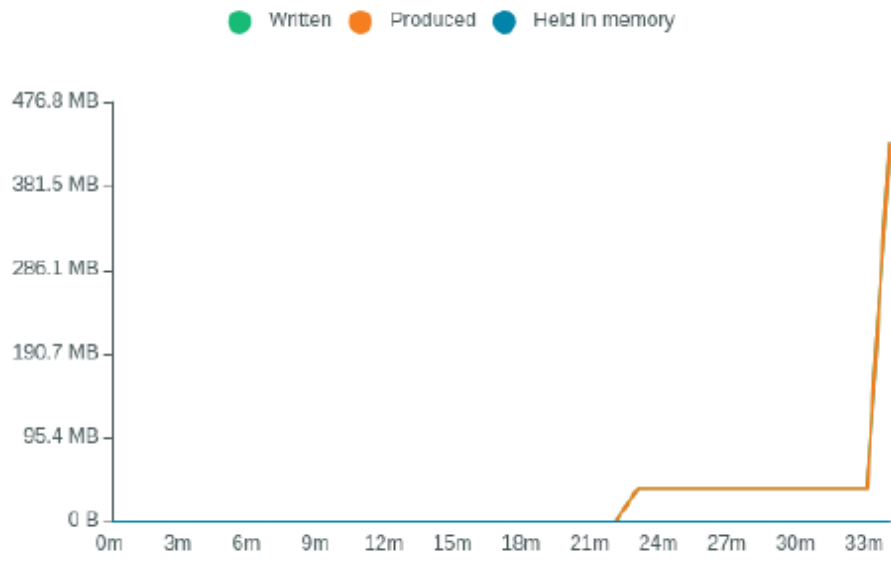
Translocation Speed



QScore

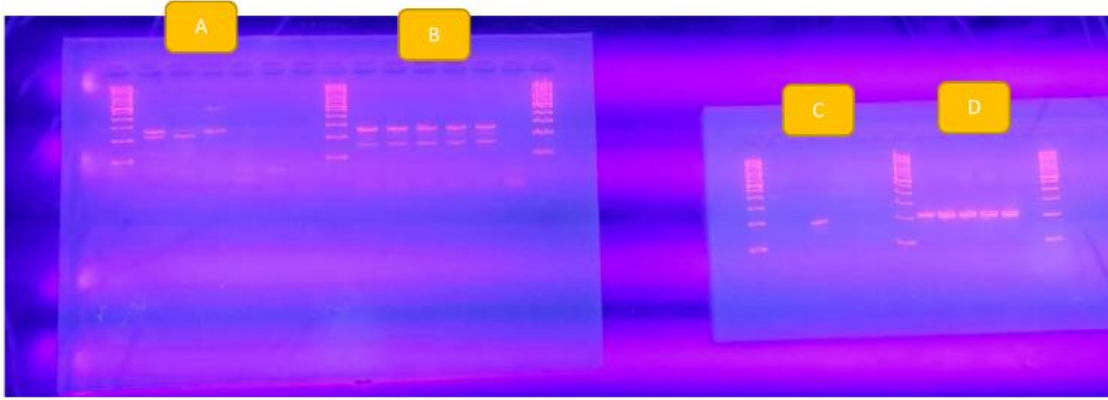


Disk Write Performance



ANEXO X

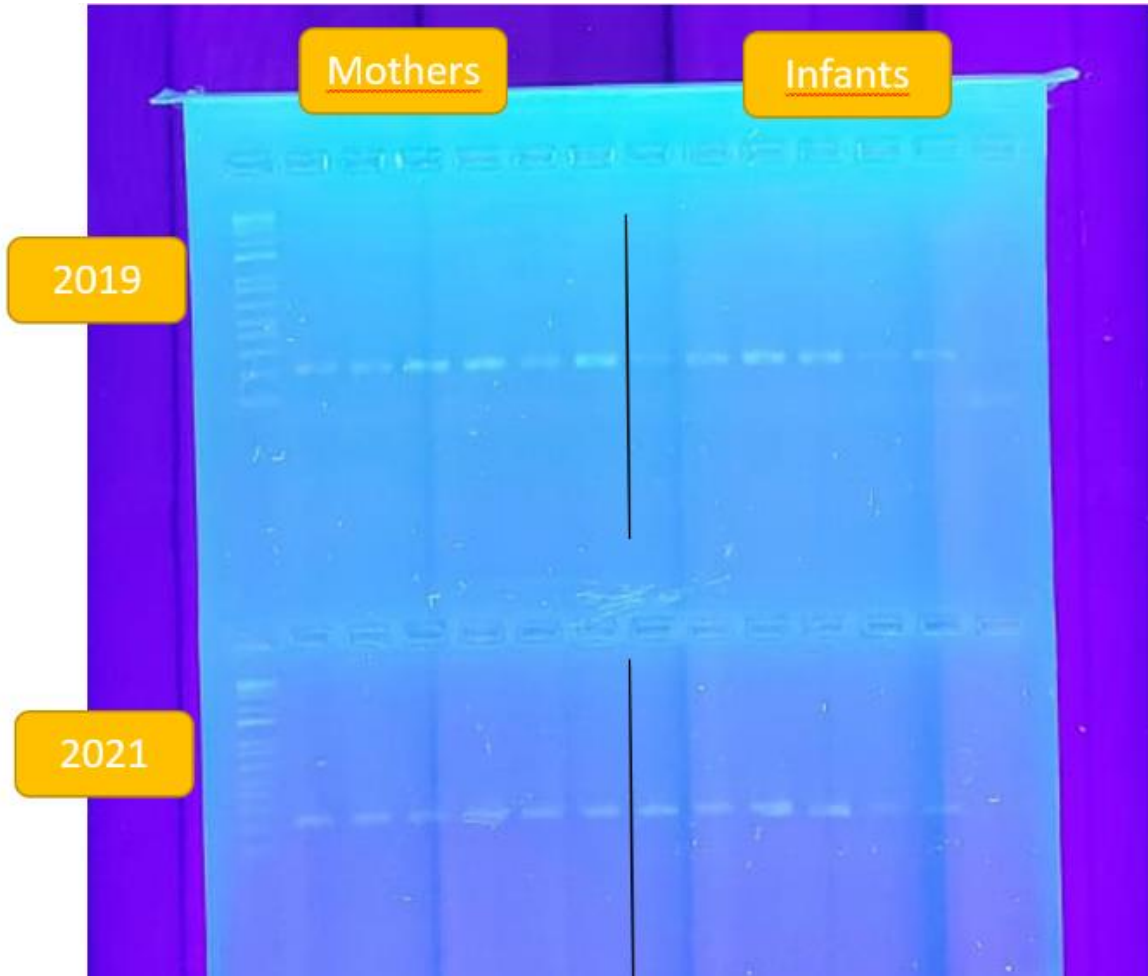
Descripción: Resultados de la electroforesis de 5 líneas celulares (HaCat, HeLa, Hek, L1 & L2) con los 4 pares de primers HLA-C



NOTA: Fueron seleccionados los primers D: Forward y Reverse con las secuencias GGGGTTAGGGTTTTATATTTTTTAGA y CCTCCAAATAAACTCTCAACTACTCC respectivamente que se acoplaron de mejor manera al exón 1 de HLA-C.

ANEXO XI

Descripción: Electroforesis del producto de PCR de HLA-C exón 1 de las 12 muestras de DNA de madres e infantes de T1 y T2 (24 muestras en total).





FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN BIOCENCIAS APLICADA CON MENCIÓN EN
BIODESCUBRIMIENTO**

ORDEN DE EMPASTADO

De acuerdo con lo estipulado en el Art. 101 del Reglamento de Régimen Académico de la Escuela Politécnica Nacional (EPN), aprobado por el Consejo Politécnico el 19 de octubre del 2017, y una vez comprobado el cumplimiento del formato de presentación establecido para la tesis escrita presentada por el Señor:

ING. ERICK GONZALO VELASTEGUÍ PEÑAFIEL

Se emite la presente orden de empastado con fecha: 2024/03/04



Firmado electrónicamente por:
EDWIN RAFAEL VERA
CALLE

Dr. Edwin Vera Calle
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA