

Hipometilação do Promotor de Interleucina-6 Associada com Risco de Doença Arterial Coronariana

Hypomethylation of Interleukin-6 Promoter is Associated with the Risk of Coronary Heart Disease

Hong-Peng Zuo^{1*}, Ying-Yu Guo^{2*}, Lin Che³, Xian-Zheng Wu¹

Department of Emergency, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai¹; Department of Computed Tomography, Jilin Oilfield General Hospital, Songyuan, Jilin Province²; Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai³, China

* Os autores Hong-Peng Zuo and Ying-Yu Guo contribuíram igualmente para o manuscrito.

Resumo

Fundamento: Interleucina-6 (IL-6) está implicada na patogênese de doença arterial coronariana (DAC), sendo sua expressão associada com redução da metilação de DNA do promotor do seu gene. Entretanto, não há dados sobre metilação do promotor de IL-6 e risco de DAC.

Objetivo: Verificar se a metilação do promotor de IL-6 medida no DNA de leucócitos sanguíneos acha-se associada com risco de DAC.

Métodos: este estudo arrolou 212 casos com DAC e 218 controles. Metilação em dois sítios de CpG no promotor de IL-6 foi medida por pirosequenciamento de bissulfito, sendo a metilação média de IL-6 calculada pela média das medidas de metilação dos dois CpGs.

Resultados: A média do nível de metilação no promotor de IL-6 nos casos de DAC foi significativamente mais baixa do que nos controles ($p = 0,023$). Análise de regressão logística mostrou associação inversa entre metilação de IL-6 e risco de DAC. As razões de chance (OR) de DAC para indivíduos no segundo e no primeiro (mais baixo) tercis de metilação de IL-6 foram 1,87 (IC 95%: 1,10-3,20) e 2,01 (IC 95%: 1,19-3,38) ($p_{\text{trend}} = 0,013$), respectivamente, comparadas à de indivíduos no terceiro (mais alto) tercil. As estimativas de risco relacionado à hipometilação de IL-6 tenderam a ser mais fortes para infarto agudo do miocárdio ($p_{\text{trend}} = 0,006$). Análise com especificidade de posição de CpG mostrou que hipometilação na posição 1 conferiu maior elevação no risco de DAC do que na posição 2.

Conclusão: Tais achados sugerem que a hipometilação de DNA do promotor de IL-6 está associada com elevado risco de DAC, especialmente para infarto agudo do miocárdio. Os dois CpGs distintos no promotor de IL-6 podem contribuir de modo diferente para o desenvolvimento de DAC. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(2):131-136)

Palavras-chave: Doença Arterial Coronariana; Interleucina-6; Metilação de DNA; Repressão Epigenética.

Abstract

Background: Interleukin-6 (IL-6) is implicated in the pathogenesis of coronary heart disease (CHD), and IL-6 expression has associated with reduced DNA methylation of its gene promoter. However, there are no data on IL-6 promoter methylation and the risk of CHD.

Objective: To examine whether IL-6 promoter methylation measured in blood leukocyte DNA is associated with CHD risk.

Methods: A total of 212 cases with CHD and 218 controls were enrolled. Methylation at two CpG sites in IL-6 promoter was measured by bisulfite pyrosequencing, and the mean IL-6 methylation was calculated by averaging the methylation measures of the two CpGs.

Results: Mean methylation level in IL-6 promoter in CHD cases was significantly lower than that in controls ($p = 0.023$). Logistic regression analysis showed that IL-6 methylation was inversely associated with the risk of CHD. The odds ratios (ORs) of CHD for subjects in the second and first (lowest) tertile of IL-6 methylation were 1.87 (95% CI = 1.10-3.20) and 2.01 (95% CI = 1.19-3.38) ($p_{\text{trend}} = 0.013$), respectively, compared to subjects in the third (highest) tertile. The IL-6 hypomethylation-related risk estimates tended to be stronger for acute myocardial infarction ($p_{\text{trend}} = 0.006$). CpG position-specific analysis showed that hypomethylation of position 1 conferred a more pronounced increase in CHD risk than that of position 2.

Conclusion: These findings suggest that DNA hypomethylation of IL-6 promoter is associated with the increased risk for CHD, especially for acute myocardial infarction. The two distinct CpGs in IL-6 may contribute differently to the development of CHD. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(2):131-136)

Keywords: Coronary Artery Disease; Interleukin-6; DNA Methylation; Epigenetic Repression.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Xian-Zheng Wu •

No. 389 Xincun Road. Postal Code 200065, Shanghai – China

E-mail: wuxz_tongji@sina.com

Artigo recebido em 01/09/2015; revisado em 07/10/2015; aceito em 29/02/2016.

DOI: 10.5935/abc.20160124

Introdução

Metilação de DNA é uma modificação epigenética que desempenha papel crucial no controle da expressão de genes no genoma.¹ Nos mamíferos, a metilação de DNA envolve a adição de grupos metila à citosina do dinucleotídeo CpG para formar 5-metilcitosina (5 mC). Alterações epigenéticas nos padrões de metilação são cada vez mais implicadas em inúmeras doenças humanas.² Metilação aberrante do promotor de vários genes foi associada com desenvolvimento e progressão de doença arterial coronariana (DAC).³⁻⁸

A principal causa de DAC é aterosclerose, uma doença inflamatória das artérias associada com alterações metabólicas, inclusive lipídicas. Interleucina-6 (IL-6) ocupa posição central nos processos inflamatórios subjacentes de doenças inflamatórias crônicas, incluindo DAC,⁹⁻¹¹ e mostrou induzir a expressão de outros genes que podem contribuir para o fenótipo de DAC.¹² Uma variante genética no promotor do gene IL-6 foi associada com sua expressão anormal^{13,14} e elevado risco de DAC.¹⁵ Modificação da metilação é um mecanismo alternativo que regula a produção de IL-6.^{16,17} Evidência consistente mostrou que a expressão de IL-6 acha-se associada com reduzida metilação de DNA do seu promotor de gene.¹⁸⁻²⁴ Além disso, metilação de DNA no promotor de IL-6 foi associada com fatores de risco para DAC, como exposição à poluição do ar.²⁵ Entretanto, até onde se sabe, não há dados sobre a metilação do promotor de IL-6 e o risco de DAC.

Recentemente, foi sugerido que o silenciamento gênico através de metilação de DNA acha-se associado com metilação não apenas nas ilhas de CpG, mas também nas bordas das ilhas de CpG.^{26,27} No presente estudo sobre a associação entre metilação do promotor de IL-6 e risco de DAC, focamos em dois CpGs individuais em uma borda de CpG localizada na região do promotor de gene IL-6, descritos como associados com função pulmonar e exposição à poluição do ar.^{25,28}

Métodos

Participantes do estudo

Um total de 212 pacientes com DAC, incluindo 120 casos de infarto agudo do miocárdio (IAM), 42 casos de infarto do miocárdio prévio e 50 casos de angina instável, foi recrutado do Hospital Tongji, Universidade Tongji, entre janeiro de 2011 e junho de 2012. O diagnóstico de DAC foi estabelecido por evidência angiográfica de estenose $\geq 70\%$ de uma artéria coronária maior, e/ou $\geq 50\%$ do tronco da coronária esquerda. Como controle, 218 indivíduos sem DAC, determinado por análise da história, exame físico, eletrocardiografia e ecocardiografia, foram recrutados do mesmo hospital e durante o mesmo período. Os controles foram pareados com os casos por idade (± 5 anos) e sexo. Excluíram-se dos grupos DAC e controle os indivíduos com hipertensão, diabetes, doença arterial periférica, doenças autoimunes e cânceres. Informação sobre idade, sexo, altura, peso, tabagismo e história familiar de DAC foi obtida usando-se questionário estruturado em entrevistas pessoais. Índice de massa corporal (IMC) foi calculado através da fórmula: peso corporal em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Definiu-se tabagismo

como o consumo de pelo menos um cigarro por dia por pelo menos seis meses. A informação sobre nível sérico de colesterol total foi obtida dos prontuários médicos. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e informado. Este estudo foi conduzido com a aprovação do Comitê de Ética do Hospital Tongji (E20100401).

Análise da metilação de DNA do promotor de IL-6

Os leucócitos do sangue periférico foram isolados por centrifugação de gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque). O DNA foi extraído dos leucócitos usando-se o *kit QIAamp DNA Blood* (Qiagen, Xangai, China), e então convertidos com bissulfito com o *kit Zymo EZ DNA Methylation* (Zymo, CA, EUA). O pirosequenciamento baseado em PCR foi realizado para quantificar a metilação do promotor de IL-6. Realizou-se PCR para amplificar a região-alvo cobrindo os dois CpGs [Genbank Accession no.M18403, cromossomo 7: 22733847 (posição 1) e cromossomo 7: 22733841 (posição 2)] em um volume de reação de 50 μl contendo 25 μl da mistura *GoTaq Master* (Promega, WI, EUA), 10 pmol de *primer forward* biotilado (biotina-TAT TTT AGT TTT GAG AAA GGA GGT G), 10 pmol de *primer reverse* (CAA TAC TCT AAA ACC CAA CAA AAA C), e 50 ng de DNA genômico tratado com bissulfito. O programa de ciclagem consistiu em 5 min a 95 °C seguidos de 45 ciclos, cada um de 95°C por 1 min, 57 °C por 1 min e 72°C por 1 min, com um alongamento final por 5 min a 72°C. Realizou-se, então, sequenciamento no sistema *PSQ HS 96 Pyrosequencing System* usando 0,3 μM de *primer* de pirosequenciamento (TCC TAA TAC AAA CAA CCC C). Utilizou-se resíduo de citosina não CpG como controle para verificar a conversão de bissulfito. O grau de metilação foi expresso para cada CpG como % mC em relação à soma de citosinas metiladas e não metiladas. Calculou-se a média dos níveis de % mC dos dois CpGs para se obter uma medida média de metilação do promotor de IL-6.

Análise estatística

Diferenças de idade (< 65 , ≥ 65 anos), sexo, IMC (< 24 ; 24-27,9; ≥ 28 kg/m^2), tabagismo (não, sim), nível sérico de colesterol total ($< 4,67$; 4,67-5,47; $> 5,47$ mmol/L) e história familiar de DAC (não, sim) entre os casos de DAC e os controles foram avaliadas usando-se o teste do qui-quadrado. Os tercís dos pontos de corte das medidas de metilação do promotor de IL-6 (média, posição 1 e posição 2) foram baseados em valores dos controles. As associações de metilação de IL-6 com risco de DAC foram estimadas calculando-se as razões de chance (OR) e intervalos de confiança (IC) a 95% das análises de regressão logística multivariada com ajuste para IMC (< 24 ; 24-27,9; ≥ 28 kg/m^2), nível sérico de colesterol total ($< 4,67$; 4,67-5,47; $> 5,47$ mmol/L) e história familiar de DAC (não, sim). Ajuste adicional para idade (< 65 , ≥ 65 anos), sexo e tabagismo (não, sim) não alterou as estimativas de risco e, conseqüentemente, tais variáveis não foram incluídas nos modelos finais. Todos os testes foram bicaudais, sendo um valor de p menor do que 0,05 considerado significativo. Os dados foram analisados com o programa *Stata 10.1* (Stata Corporation, College Station, TX, EUA).

Resultados

Características dos indivíduos do estudo

As características dos casos com DAC e dos controles são mostradas na Tabela 1. Não houve significativa diferença entre os casos e os controles quanto à distribuição de idade, sexo e tabagismo. Os casos com DAC tiveram maior probabilidade de apresentar maior IMC ($p = 0,029$), maior nível sérico de colesterol total ($p < 0,001$) e história familiar de DAC mais frequente ($p < 0,001$) do que os controles.

Associação entre metilação média de IL-6 e risco de DAC

Os casos de DAC apresentaram significativa redução do nível médio de metilação de IL-6 em relação aos controles [média (desvio-padrão, DP): 41,2 (0,7) versus 43,4 (0,6), $p = 0,023$ (Figura 1)]. Análise de regressão logística mostrou associação inversa entre a metilação do promotor de IL-6 e o risco de DAC (Tabela 2). As OR de DAC para indivíduos no segundo e primeiro tercils (mais baixos) da metilação média de IL-6 foram 1,87 (IC 95%: 1,10-3,20) e 2,01 (IC 95%: 1,19-3,38) ($p_{\text{trend}} = 0,013$), respectivamente, em comparação às dos indivíduos do terceiro tercil (mais alto). Quando avaliados quanto aos tipos clínicos de DAC, as estimativas de risco relacionado à hipometilação de IL-6 tenderam a ser mais fortes para IAM, com OR de 2,00 (IC 95%: 3,2-5,2) para o segundo tercil e 2,57 (IC 95%: 1,33-4,95) para o primeiro tercil ($p_{\text{trend}} = 0,006$, Tabela 2).

Associação entre metilação de IL-6 em posição específica de CpG e risco de DAC

Nossa análise principal considerou a metilação média de dois CpGs no promotor de IL-6. Entretanto, metilação em posições específicas dentro de um promotor de gene pode afetar a expressão gênica de forma diferente. Assim, examinamos ainda as associações entre metilação de IL-6 em posição específica e risco de DAC. Como mostra a Tabela 2, embora tenham sido observados significativos valores de p_{trend} para DAC e IAM para as duas posições de CpG, a hipometilação de posição 1 conferiu um risco de DAC mais elevado se comparada à da posição 2.

Discussão

Metilação de promotor é um mecanismo epigenético essencial para a regulação da expressão de IL-6.^{16,17} Foi relatada associação entre a hipometilação do promotor de IL-6 e a patogênese de lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e periodontite crônica.^{18,24,29} No presente estudo, demonstramos pela primeira vez a associação entre hipometilação de DNA no promotor de IL-6 e elevado risco para DAC, especialmente IAM. Tais dados sugerem que a desmetilação do promotor de IL-6 constitua uma base epigenética comum para o desenvolvimento de várias doenças associadas à inflamação. Nesse contexto, a associação entre metilação do promotor de IL-6 e risco de outras doenças inflamatórias merece investigação adicional.

Tabela 1 – Características dos casos com doença arterial coronariana (DAC) e controles

Característica	Controles, n (%)	Casos com DAC, n (%)	Valor de p*
Idade (anos)			
< 65	102 (46,8)	108 (50,9)	
≥ 65	116 (53,2)	104 (49,1)	0,389
Sexo			
Feminino	46 (21,1)	48 (22,6)	
Masculino	172 (78,9)	164 (77,4)	0,699
Índice de massa corporal (kg/m²)			
< 24	125 (57,3)	96 (45,3)	
24-27,9	61 (28,0)	69 (32,5)	
≥ 28	32 (14,7)	47 (22,2)	0,029
Tabagista			
Não	100 (45,9)	79 (37,3)	
Sim	118 (54,1)	133 (62,7)	0,070
Colesterol total sérico (mmol/l)			
< 4,67	73 (33,5)	34 (16,1)	
4,67-5,47	75 (34,4)	52 (24,5)	
> 5,47	70 (32,1)	126 (59,4)	< 0,001
História familiar de DAC			
Não	214 (98,2)	185 (87,3)	
Sim	4 (1,8)	27 (12,7)	< 0,001

*p valor obtido do teste do qui-quadrado comparando casos e controles.

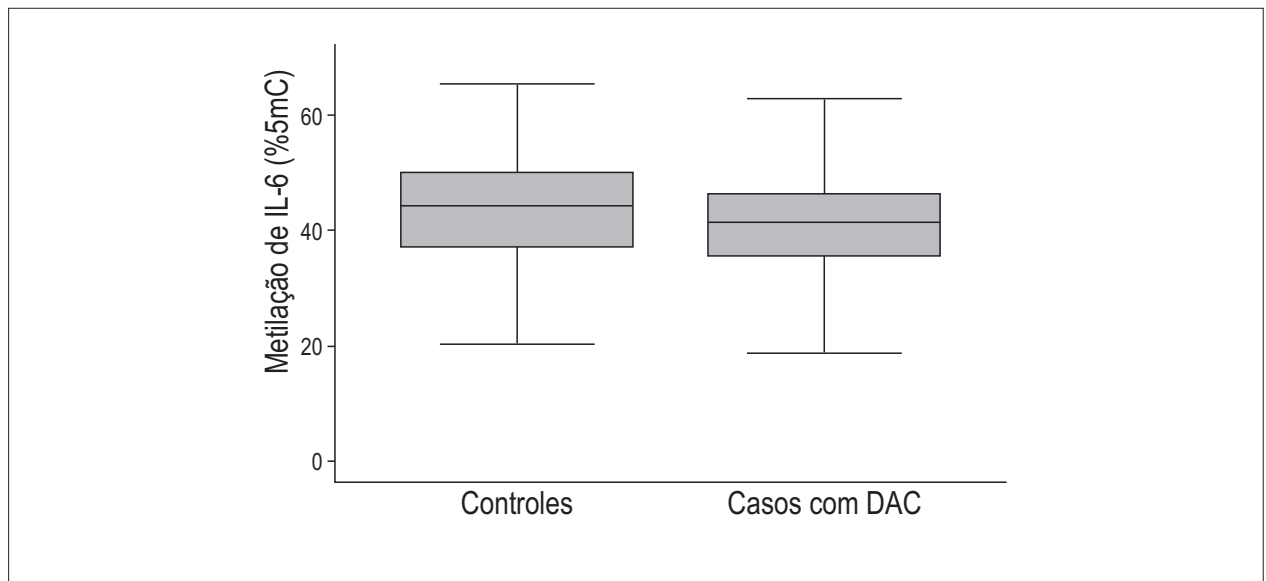


Figura 1 – Comparações dos níveis de metilação de IL-6 medidos em leucócitos sanguíneos em casos com doença arterial coronariana (DAC) e em controles ($p = 0,023$).

Tabela 2 – Associação de metilação no promotor de IL-6 com risco de doença arterial coronariana (DAC)

Metilação (%5mC)	Controles n (%)	Casos com DAC							
		Todos n (%)	IAM n (%)		IM prévio n (%)		Angina n (%)		
			OR (IC 95%)*		OR (IC 95%)*		OR (IC 95%)*		OR (IC 95%)*
Média (Tercil[†])									
T3 (> 47,7)	73 (33,5)	42 (19,8)	1,0 (referência)	21 (17,5)	1,0 (referência)	9 (21,4)	1,0 (referência)	12 (24,0)	1,0 (referência)
T2 (40,1-47,7)	71 (32,6)	77 (36,3)	1,87 (1,10-3,20)	41 (34,2)	2,00 (1,01-3,94)	18 (42,9)	2,02 (0,84-4,86)	18 (36,0)	1,76 (0,73-4,24)
T1 (< 40,1)	74 (33,9)	93 (43,9)	2,01 (1,19-3,38)	58 (48,3)	2,57 (1,33-4,95)	15 (35,7)	1,63 (0,66-4,01)	20 (40,0)	1,83 (0,77-4,33)
			p-trend=0,013		p-trend=0,006		p-trend=0,325		p-trend=0,182
Posição 1 (Tercil[†])									
T3 (> 51,7)	73 (33,5)	44 (20,8)	1,0 (referência)	25 (20,8)	1,0 (referência)	8 (19,1)	1,0 (referência)	11 (22,0)	1,0 (referência)
T2 (43,5-51,7)	73 (33,5)	77 (36,3)	2,04 (1,20-3,49)	38 (31,7)	1,71 (0,88-3,32)	19 (45,2)	2,37 (0,96-5,84)	20 (44,0)	2,50 (1,01-6,17)
T1 (< 43,5)	72 (33,0)	91 (42,9)	2,17 (1,29-3,66)	57 (47,5)	2,44 (1,29-4,62)	15 (35,7)	1,94 (0,77-4,92)	19 (38,0)	2,16 (0,88-5,27)
			p-trend=0,005		p-trend=0,006		p-trend=0,196		p-trend=0,114
Posição 2 (Tercil[†])									
T3 (> 44,0)	73 (33,5)	51 (24,1)	1,0 (referência)	30 (25,0)	1,0 (referência)	9 (21,4)	1,0 (referência)	12 (24,0)	1,0 (referência)
T2 (35,9-44,0)	72 (33,0)	63 (29,7)	1,25 (0,74-2,12)	28 (23,3)	0,93 (0,48-1,81)	17 (40,5)	2,06 (0,84-5,02)	18 (36,0)	1,74 (0,72-4,20)
T1 (< 35,9)	73 (33,5)	98 (46,2)	1,73 (1,05-2,86)	62 (51,7)	1,81 (0,99-3,29)	16 (38,1)	1,82 (0,74-4,47)	20 (40,0)	1,79 (0,76-4,23)
			p-trend=0,030		p-trend=0,038		p-trend=0,220		p-trend=0,197

%5mC: porcentagem de 5-metilcitosina; IAM: infarto agudo do miocárdio; IC: intervalo de confiança; IM: infarto do miocárdio; OR: razão de chance.

*Ajustado para índice de massa corporal (<24; 24-27,9; ≥28 kg/m²), colesterol total sérico (<4,67; 4,67-5,47; >5,47 mmol/l) e história familiar de DAC (não, sim).

† Os tercís das medidas de metilação de IL-6 foram baseados em valores dos controles.

O nível de metilação do promotor de IL-6 foi associado com exposição à poluição do ar,²⁵ conhecida por aumentar a morbimortalidade cardiovascular.³⁰ Além disso, o nível sérico de IL-6 foi associado com elevado risco de mortalidade em pacientes com DAC.³¹ No presente estudo, observamos

que a hipometilação no promotor de IL-6 foi associada com uma estimativa mais forte de risco para IAM, um tipo clínico de DAC que contribui para muitos casos de mortalidade mundo afora.³² Com base nesses resultados preliminares e na literatura atual, somos tentados a especular que a

desmetilação do promotor de IL-6 possa desempenhar papel não apenas no desenvolvimento, mas também no prognóstico da DAC. Em linha com essa hipótese, relatou-se que o nível de metilação do promotor de IL-6 está significativamente correlacionado com o desenvolvimento e a gravidade de lúpus eritematoso sistêmico.^{18,24}

Há evidência crescente de que a metilação em posições específicas dentro do promotor de um gene possa ser mais importante para a expressão gênica do que a metilação média de sítios de CpG na região do promotor.^{33,34} No presente estudo, portanto, examinamos ainda se as associações de DAC observadas na análise principal usando metilação média foram específicas para certas posições no promotor de IL-6. Notamos que hipometilação de CpG na posição 1 no promotor de IL-6 conferiu um aumento mais pronunciado nas estimativas de risco de DAC e de IAM do que aquela na posição 2. Previamente, níveis de metilação desses dois CpGs na IL-6 foram associados de modo diferente com exposição à poluição do ar.²⁵ Tais dados sugerem que hipometilação diferencial de DNA nos dois CpGs distintos na IL-6 possa refletir diferentes efeitos cumulativos de exposição a fatores endógenos e exógenos, contribuindo diferentemente para a suscetibilidade a doenças humanas, incluindo DAC. Sítios de ligação de fatores de transcrição (BAF155, Inil, c-Myc, BAF170, Max, NRSF e Nrf1) estavam presentes para a posição 1, enquanto a posição 2 não apresentava sítios de ligação,²⁸ podendo explicar em parte os diferentes resultados observados por nós e outros autores para essas duas posições. Estudos adicionais são necessários para esclarecer se os diferentes CpGs no promotor de IL-6 têm efeitos diferentes na expressão de IL-6.

Nosso estudo foi baseado em análise quantitativa precisa usando pirosequenciamento, que é adequado para medir alterações sutis na metilação de DNA e pode produzir medidas individuais de metilação em mais de um sítio de CpG, refletindo assim, de maneira mais acurada, a metilação de DNA na região.^{35,36}

Entretanto, várias limitações do presente estudo devem ser apontadas. Primeiro, enquanto nossos dados demonstram que hipometilação do promotor de IL-6 associou-se com DAC, se tal padrão de metilação é causa ou consequência do desenvolvimento de DAC não pôde ser determinado no nosso estudo de *design* caso-controle. Estudos prospectivos são

necessários para elucidar a natureza temporal dessa associação. Entretanto, dada a implicação da IL-6 na patogênese de DAC e a correlação inversa da metilação do promotor de IL-6 com fatores de risco de DAC,^{25,37} nossos resultados sugerem que desmetilação do promotor de IL-6 possa contribuir para o risco de desenvolvimento de DAC. Segundo, o efeito funcional do promotor de hipometilação de IL-6 não foi investigado mais profundamente no presente estudo. Por fim, vários estudos relataram correlações de metilação de DNA no promotor de IL-6 com dieta e exposições ambientais,^{25,38-40} podendo confundir as associações entre hipometilação do promotor de IL-6 e risco de DAC por nós observadas.

Conclusão

Em resumo, embora limitado pelo relativamente pequeno tamanho amostral, o presente estudo sugere que hipometilação de DNA no promotor de IL-6 esteja associada com elevado risco para DAC, em especial IAM. Desmetilação dos dois CpGs na IL-6 pode contribuir de modo diferente para a suscetibilidade para DAC. Devido à natureza exploratória do presente estudo, investigação adicional se faz necessária para verificar seus achados.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Zuo HP, Guo YY, Che L, Wu XZ. Obtenção de dados: Zuo HP, Guo YY, Che L. Análise e interpretação dos dados: Zuo HP, Guo YY, Che L, Wu XZ. Análise estatística: Zuo HP, Wu XZ. Redação do manuscrito: Zuo HP, Guo YY, Che L. Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Wu XZ. Supervisão / como investigador principal: Zuo HP, Guo YY, Wu XZ.

Potencial Conflito de Interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(10):726-34.
2. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):138-62.
3. Guay SP, Brisson D, Munger J, Lamarche B, Gaudet D, Bouchard L. ABCA1 gene promoter DNA methylation is associated with HDL particle profile and coronary artery disease in familial hypercholesterolemia. *Epigenetics*. 2012;7(5):464-72.
4. Zhuang J, Peng W, Li H, Wang W, Wei Y, Li W, et al. Methylation of p15INK4b and expression of ANRIL on chromosome 9p21 are associated with coronary artery disease. *PLoS One*. 2012;7(10):e47193.
5. Jiang D, Zheng D, Wang L, Huang Y, Liu H, Xu L, et al. Elevated PLA2G7 gene promoter methylation as a gender-specific marker of aging increases the risk of coronary heart disease in females. *PLoS One*. 2013;8(3):e59752.
6. Guay SP, Legare C, Houde AA, Mathieu P, Bosse Y, Bouchard L. Acetylsalicylic acid, aging and coronary artery disease are associated with ABCA1 DNA methylation in men. *Clin Epigenetics*. 2014;6(1):14.

7. Sharma P, Garg G, Kumar A, Mohammad F, Kumar SR, Tanwar VS, et al. Genome wide DNA methylation profiling for epigenetic alteration in coronary artery disease patients. *Gene*. 2014; 541(1):31-40.
8. Breton CV, Park C, Siegmund K, Gauderman WJ, Whitfield-Maxwell L, Hodis HN, et al. NOS1 methylation and carotid artery intima-media thickness in children. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014; 7(2):116-22.
9. Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(15):9090-5.
10. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015; 16(5):448-57.
11. Bekkering S, Quintin J, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34(8):1731-8.
12. Wang F, Demura M, Cheng Y, Zhu A, Karashima S, Yoneda T, et al. Dynamic CCAAT/enhancer binding protein-associated changes of DNA methylation in the angiotensinogen gene. *Hypertension*. 2014; 63(2):281-8.
13. Noss EH, Nguyen HN, Chang SK, Watts GF, Brenner MB. Genetic polymorphism directs IL-6 expression in fibroblasts but not selected other cell types. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(48):14948-53.
14. Nokso-Koivisto J, Patel JA, Chonmaitree T. IL-6 -174 c/c genotype is not conclusively a low IL-6 production phenotype. *J Infect Dis*. 2011; 203(12):1876-8.
15. Jin Y, Wang Q, Wang C, Zhang X, Yan B, Hu W. Common polymorphisms in the interleukin-6 gene and myocardial infarction risk: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014; 18(5):330-40.
16. Poplutz MK, Wessels I, Link L, Uciechowski P. Regulation of the Interleukin-6 gene expression during monocytic differentiation of HL-60 cells by chromatin remodeling and methylation. *Immunobiology*. 2014; 219(8):619-26.
17. Tang B, Zhao R, Sun Y, Zhu Y, Zhong J, Zhao G, et al. Interleukin-6 expression was regulated by epigenetic mechanisms in response to influenza virus infection or dsRNA treatment. *Mol Immunol*. 2011; 48(8):1001-8.
18. Mi XB, Zeng FQ. Hypomethylation of interleukin-4 and -6 promoters in T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Acta Pharmacol Sin*. 2008; 29(1):105-12.
19. Tekpli X, Landvik NE, Anmarkud KH, Skaug V, Haugen A, Zienoldddy S. DNA methylation at promoter regions of interleukin 1B, interleukin 6, and interleukin 8 in non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2013; 62(2):337-45.
20. Dandrea M, Donadelli M, Costanzo C, Scarpa A, Palmieri M. MeCP2/H3meK9 are involved in IL-6 gene silencing in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(20):6681-90.
21. Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. *Br J Nutr*. 2008; 100(2):278-82.
22. Uddin M, Koenen KC, Aiello AE, Wildman DE, de los Santos R, Galea S. Epigenetic and inflammatory marker profiles associated with depression in a community-based epidemiologic sample. *Psychol Med*. 2011; 41(5):997-1007.
23. Jung J, Moon JW, Choi JH, Lee YW, Park SH, Kim GJ. Epigenetic alterations of IL-6/STAT3 signaling by placental stem cells promote hepatic regeneration in a rat model with CCl4-induced liver injury. *Int J Stem Cells*. 2015; 8(1):79-89.
24. Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, et al. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2012; 83(7):917-25.
25. Bind MA, Lepeule J, Zanobetti A, Gasparini A, Baccarelli A, Coull BA, et al. Air pollution and gene-specific methylation in the Normative Aging Study: association, effect modification, and mediation analysis. *Epigenetics*. 2014; 9(3):448-58.
26. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*. 2009; 41(2):178-86.
27. Hirabayashi Y, Gotoh Y. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci*. 2010; 11(6):377-88.
28. Lepeule J, Baccarelli A, Motta V, Cantone L, Litonjua AA, Sparrow D, et al. Gene promoter methylation is associated with lung function in the elderly: the Normative Aging Study. *Epigenetics*. 2012; 7(3):261-9. Erratum in: *Epigenetics*. 2012; 7(6):667.
29. Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(9):2686-93.
30. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010; 121(21):2331-78.
31. Su D, Li Z, Li X, Chen Y, Zhang Y, Ding D, et al. Association between serum interleukin-6 concentration and mortality in patients with coronary artery disease. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:726178.
32. Rahim MA, Rahim ZH, Ahmad WA, Hashim OH. Can saliva proteins be used to predict the onset of acute myocardial infarction among high-risk patients? *Int J Med Sci*. 2015; 12(4):329-35.
33. Murayama A, Sakura K, Nakama M, Yasuzawa-Tanaka K, Fujita E, Tateishi Y, et al. A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. *EMBO J*. 2006; 25(5):1081-92.
34. Zou B, Chim CS, Zeng H, Leung SY, Yang Y, Tu SP, et al. Correlation between the single-site CpG methylation and expression silencing of the XAF1 gene in human gastric and colon cancers. *Gastroenterology*. 2006; 131(6):1835-43.
35. Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(3):e38.
36. Tost J, Dunker J, Gut IG. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques*. 2003; 35(1):152-6.
37. Aumueller E, Remely M, Baeck H, Hippe B, Brath H, Haslberger AG. Interleukin-6 CpG methylation and body weight correlate differently in type 2 Diabetes patients compared to obese and lean controls. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2015; 8(1):26-35.
38. Zhang FF, Santella RM, Wolff M, Kappil MA, Markowitz SB, Morabia A. White blood cell global methylation and IL-6 promoter methylation in association with diet and lifestyle risk factors in a cancer-free population. *Epigenetics*. 2012; 7(6):606-14.
39. Kirchner H, Nysten C, Laber S, Barres R, Yan J, Krook A, et al. Altered promoter methylation of PDK4, IL1 B, IL6, and TNF after Roux-en Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis*. 2014; 10(4):671-8. Erratum in: *Surg Obes Relat Dis*. 2015; 11(3):735.
40. Peluso M, Bollati V, Munnia A, Srivatanakul P, Jedpiyawongse A, Sangrajrang S, et al. DNA methylation differences in exposed workers and nearby residents of the Ma Ta Phut industrial estate, Rayong, Thailand. *Int J Epidemiol*. 2012; 41(6):1753-60.