



Universidad Autónoma Metropolitana Cuajimalpa

Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería

Idónea comunicación de resultados para obtener el
grado de maestría

“EVALUACIÓN DE MARCAS EPIGENÉTICAS EN
LINFOCITOS DE PACIENTES CON QUEMADURAS”

Juan Osvaldo Arias Pérez

Biólogo Molecular

Dra. María del Rocío Suárez Sánchez

Directora

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Codirectora

Dr. Oscar Hernández Hernández

Asesor

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. QUEMADURAS.....	5
1.1.1. Clasificación de las quemaduras.....	5
1.1.2. Efectos locales y sistémicos de quemaduras	7
1.2. EPIGENÉTICA	10
1.2.1. Metilación del ADN.....	10
1.2.2. ARN no codificante	11
1.2.3. Histonas	12
1.2.4. Inflamación y epigenética.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1. H3K4ME3	17
2.2. H3K9ME2	17
2.3. H3S28PH	18
2.4. H3K27ME1	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVO GENERAL.....	19
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	20
6.1. PACIENTES Y CONTROLES	20
6.2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS	21
6.3. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA.....	21
6.4. qPCR	23
6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	24
7. RESULTADOS.....	24
7.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CHIP-qPCR.....	25
7.2. CHIP-qPCR.....	26
7.3. H3K4ME3	27
7.3.1. Pacientes y Controles.....	27
7.3.2. Sepsis y no sepsis	27
7.4. H3K9ME2	28
7.4.1. Pacientes y controles	28
7.4.2. Sepsis y no sepsis	29
7.5. H3S28PH	30
7.4.1. Pacientes y controles.....	30
7.5.2. Sepsis y no sepsis	30
7.6. H3K27ME1	31
7.5.1. Pacientes y controles.....	31
7.6.2. Sepsis y no sepsis	32
8. DISCUSIÓN.....	33
9. CONCLUSIONES	37
10. PERSPECTIVAS.....	37

11.	ANEXOS	38
12.	REFERENCIAS	43
13.	FRASE CESION DERECHOS	47

Índice de figuras

FIGURA 1.	ESTIMACIÓN DE LA EXTENSIÓN Y SEVERIDAD DE QUEMADURAS USANDO LA REGLA DE LOS NUEVE.....	6
FIGURA 2.	CLASIFICACIÓN DE LAS QUEMADURAS DE ACUERDO CON LA PROFUNDIDAD DE LA QUEMADURA Y EL TEJIDO AFECTADO...	7
FIGURA 3.	REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA (21).....	11
FIGURA 4.	A) COMPLEJO OCTAMÉRICO DE HISTONA (24). B) COMPOSICIÓN DEL NUCLEOSOMA (16).	12
FIGURA 5.	MODIFICACIONES IDENTIFICADAS RECIENTEMENTE EN LOS RESIDUOS DE LAS HISTONAS.....	14
FIGURA 6.	NIVELES DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONA H3.	16
FIGURA 7.	REVERSIÓN DE ENTRECruzAMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE SONICACIÓN.	25
FIGURA 8.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA ACOPLADA A PCR EN TIEMPO REAL. .	26
FIGURA 9.	NIVELES DE H3K4ME3 EN PACIENTES CON QUEMADURAS GRAVES.	27
FIGURA 10.	NIVELES DE H3K4ME3 EN PACIENTES CON QUEMADURAS GRAVES DE PACIENTES QUE DESARROLLARON O NO SEPSIS.	28
FIGURA 11.	NIVELES DE H3K9ME2 EN PACIENTES CON QUEMADURAS GRAVES.	29
FIGURA 12.	NIVELES DE H3K9ME2 EN PACIENTES CON QUEMADURAS GRAVES DE PACIENTES QUE DESARROLLARON O NO SEPSIS.	29
FIGURA 13.	NIVELES DE H3S28PH EN PACIENTES CON QUEMADURAS GRAVES.	30
FIGURA 14.	NIVELES DE H3S28PH EN PACIENTES CON QUEMADURAS GRAVES DE PACIENTES QUE DESARROLLARON O NO SEPSIS.	31
FIGURA 15.	NIVELES DE H3K27ME1 EN PACIENTES CON QUEMADURAS GRAVES.	32
FIGURA 16.	NIVELES DE H3K27ME1 EN PACIENTES CON QUEMADURAS GRAVES DE PACIENTES QUE DESARROLLARON O NO SEPSIS.	32

Índice de tablas

TABLA 1.	DESCRIPCIÓN DE LAS PRINCIPALES CITOCINAS Y SU PAPEL EN PROCESOS INFLAMATORIOS.....	8
TABLA 2.	MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS ENCONTRADAS EN LINFOCITOS DE PACIENTES CON QUEMADURAS PARA LAS HISTONAS H3 Y H4 (38).....	17
TABLA 3.	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON QUEMADURAS.....	20
TABLA 4.	CARACTERÍSTICAS DE LOS INDIVIDUOS CONTROL.....	21
TABLA 5.	INFORMACIÓN DE LOS ANTICUERPOS PARA INMUNOPRECIPITAR LA CROMATINA.	22
TABLA 6.	SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA CHIP-QPCR	23
TABLA 7.	DEMOGRAFÍA Y DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES CON QUEMADURAS.....	24
TABLA 8.	MODELO EPIGENÉTICO PARA EL GRUPO PACIENTES CONTRA INDIVIDUOS SANOS.....	35
TABLA 9.	MODELO EPIGENÉTICO PARA EL GRUPO SEPSIS CONTRA EL GRUPO NO SEPSIS.	36

1. Introducción

1.1. Quemaduras

Las quemaduras representan un problema de salud a nivel mundial, ya que, como reporta la Organización Mundial de la Salud (**OMS**), causan aproximadamente 180,000 muertes al año, de las cuales, la gran mayoría tienen lugar en los países de bajos y medianos ingresos, como es el caso de México. Por otro lado, en México, el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (**ISSSTE**), reportó en 2014 una incidencia de mortalidad de 54.55 por cada 100,000 habitantes a causa de quemaduras o procesos desarrollados después de las quemaduras, como es el caso de la sepsis (1). En muchos países de ingreso alto, las tasas de muerte por quemaduras han ido disminuyendo y la tasa de mortalidad infantil es actualmente siete veces más elevada en los países de bajos y medianos ingresos que en los de ingreso alto (2).

Se define como quemadura al daño en tejidos causado por calor intenso, electricidad, radiación, frío o algunos químicos, lo que provoca una desnaturalización de proteínas y muerte celular en un área determinada. La principal amenaza que resulta después de la quemadura es la pérdida catastrófica de fluidos que contienen proteínas y electrolitos (3). Esta pérdida da lugar a una deshidratación, desequilibrio electrolítico y posteriormente a una falla renal y choque circulatorio. Este choque circulatorio se da porque el cuerpo tiene un mecanismo que se denomina estado compensatorio, que es básicamente la conducción del flujo sanguíneo hacia los órganos que requieren un mayor aporte de oxígeno y nutrientes como son: cerebro, corazón y pulmones. Este proceso deja en desventaja a los demás órganos ya que dejan de recibir el aporte normal de sangre (proceso denominado isquemia). En la clínica cuando se recibe a un paciente con pérdidas de sangre, el primer paso es la administración de suero para reponer los fluidos que ha perdido el paciente (reperfusión), sin embargo, en algunas ocasiones, la reperfusión puede ser contraproducente si es que la isquemia causó daño en intestino y hubo liberación de bacterias al torrente sanguíneo, lo que provoca un desplazamiento masivo de las bacterias a los demás órganos.

1.1.1. Clasificación de las quemaduras

En los adultos, el volumen de fluido perdido puede ser estimado calculando el porcentaje de superficie corporal quemada utilizando la regla de los nueve (**Figura 1**). Este método divide el cuerpo en 11 áreas, cada una de las cuales representa el 9% del área total del cuerpo más un área adicional que rodea los genitales y representa el 1% del área superficial (4).

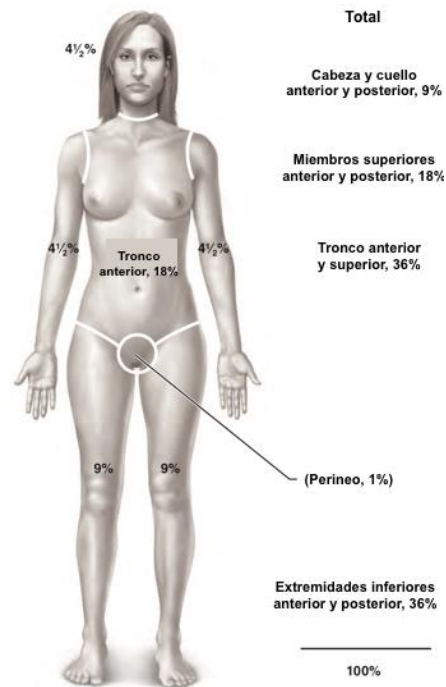


Figura 1. Estimación de la extensión y severidad de quemaduras usando la regla de los nueve.

Por otra parte, las quemaduras se pueden clasificar de acuerdo con su severidad, como: quemaduras de primero, segundo o tercer grado. En las quemaduras de primer grado, solamente la epidermis se ve dañada y tiende a sanar dentro de los dos o tres días posteriores a la quemadura sin atención especial. Las quemaduras de segundo grado se caracterizan por daño en la epidermis y la región superior de la dermis. En este tipo de quemaduras suelen aparecer ampollas, enrojecimiento y dolor continuo. La regeneración suele ocurrir con poca o ninguna cicatrización dentro de tres a cuatro semanas tomando especial atención en evitar las infecciones. Finalmente, las quemaduras de tercer grado son aquellas con daño de espesor total, es decir, que involucran todo el grosor de la piel (**Figura 2**). El área quemada tiene apariencia gris-blanca, roja cereza o ennegrecida, e inicialmente hay poco o ningún edema. En este caso, las terminaciones nerviosas se han destruido y por lo tanto el área quemada no es dolorosa. Aunque la piel eventualmente podría regenerarse al proliferar las células epiteliales en los bordes de la quemadura o las células madre en los folículos capilares, por lo general es imposible esperar tanto tiempo debido a la pérdida de líquidos y la infección, por lo tanto, es altamente recomendable el uso de apósitos de piel como opción terapéutica que acelere el proceso de reepitelización (5).

En general, las quemaduras se consideran críticas si existe alguna de las siguientes condiciones:

- Más del 25% del cuerpo tiene quemaduras de segundo grado
- Más del 10% del cuerpo tiene quemaduras de tercer grado
- Hay quemaduras de tercer grado en la cara, manos o pies

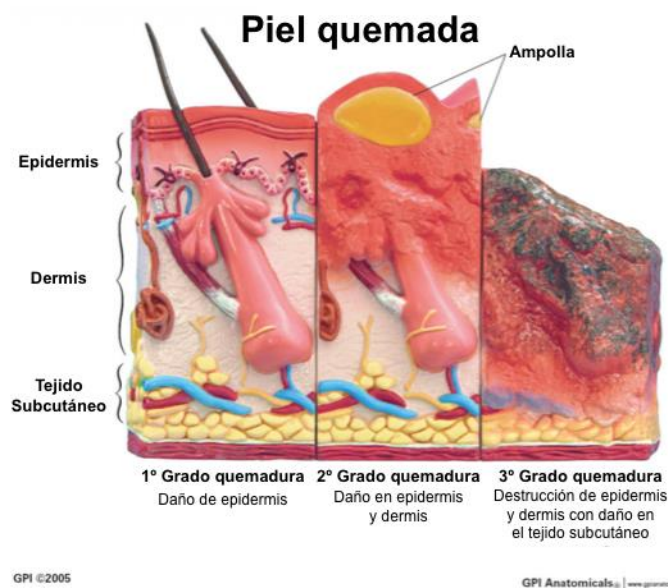


Figura 2. Clasificación de las quemaduras de acuerdo con la profundidad de la quemadura y el tejido afectado.

Cuando un individuo sufre quemaduras, pierde grandes cantidades de proteínas, por lo tanto, necesitan miles de calorías adicionales a las que consumen diariamente para reemplazar estas calorías perdidas y así permitir la reparación de los tejidos. Después de controlar el daño cutáneo del paciente, las infecciones y la sepsis (infección bacteriana generalizada) se convierten en la principal amenaza y causa de muerte en las víctimas de quemaduras. A pesar de que la piel quemada es estéril durante aproximadamente las 24 horas siguientes a la quemadura, las bacterias, hongos y otros patógenos pueden invadir y multiplicarse fácilmente en las áreas donde se destruyó la barrera de la piel con un contorno rico en nutrientes que deja el tejido muerto. A este problema se suma el hecho de que el sistema inmune es deficiente durante uno o dos días después de la lesión (4).

1.1.2. Efectos locales y sistémicos de quemaduras

Mediante alteraciones estructurales a nivel molecular, los metabolitos tóxicos, antígenos y la liberación de agentes inmunomoduladores dan como resultado efectos fisiopatológicos de choque por quemadura. Los mediadores locales liberados son histamina, serotonina, bradicinina, óxido nítrico, radicales libres y productos de la cascada del ácido eicosanoide (prostaglandina y tromboxano), TNF- α e interleucinas (**Tabla 1**). Se cree que la histamina es el mediador responsable del aumento de la permeabilidad microvascular en fase temprana observada inmediatamente después de las quemaduras debido a que la histamina causa la formación transitoria de grandes espacios endoteliales como resultado de la contracción de las células endoteliales venulares. Asimismo, los estudios demostraron que la patogénesis del edema provocado por quemaduras en la piel parece estar relacionada con la interacción de la histamina con la xantina oxidasa y los radicales libres de oxígeno (6).

Tabla 1. Descripción de las principales citocinas y su papel en procesos inflamatorios.

Citocina	Principal fuente celular	Principales dianas celulares y efectos biológicos
Interleucina 6 (IL-6)	Macrófagos/monocitos, células endoteliales, linfocitos T	Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda Linfocitos B: proliferación de células productoras de anticuerpos Linfocitos T: crecimiento y diferenciación
Interleucina 10 (IL-10)	Macrófagos, linfocitos T (sobre todo, linfocitos T reguladores)	Macrófagos, células dendríticas: inhibición de la expresión de IL-12, coestimuladoras y clase II del MHC
Interleucina 17a (IL-17a)	Linfocitos T	Células endoteliales: mayor producción de quimiocinas Macrófagos: mayor producción de quimiocinas y citocinas Células epiteliales: producción de GM-CSF y G-CSF
CSF de granulocito y monocito (GM-CSF)	Linfocitos T, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos	Progenitores inmaduros y comprometidos, macrófagos maduros: maduración inducida de granulocitos y monocitos, activación del macrófago
Factor de necrosis tumoral (TNF- α)	Macrófagos/monocitos, linfocitos NK, linfocitos T	Células endoteliales: activación (inflamación, coagulación) Leucocitos: activación y secreción de citocinas. Hipotálamo: fiebre, anorexia Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda Músculo, grasa: catabolismo (caquexia)
Interleucina 1 β (IL-1 β)	Macrófagos/monocitos, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, hepatocitos	Células endoteliales: activación (inflamación, coagulación) Hipotálamo: fiebre Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda Linfocitos T: proliferación y activación

El estrés oxidativo desencadenado por la isquemia conduce a la generación de mediadores proinflamatorios que finalmente causaran dos tipos de daño celular: necrosis y apoptosis. Estos mediadores consisten en la actividad de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la del óxido nítrico sintasa (NOS) que conducirán a la producción de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico (NO) y, finalmente daño en la pared celular debido a la alta reactividad de las moléculas (7). Se ha demostrado que el NO tiene influencia en la síntesis de citocinas inmunoregulatoras y pro-inflamatorias como el interferón gamma (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) (3). Hur y colaboradores reportaron en 2014 que, en suero de pacientes con quemaduras mayores de 20% de superficie total quemada, se encontraban incrementadas las citocinas G-CSF, GM-CSF, IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, MCP-1, MIP-1 β , y VEGF (8).

De estas moléculas, las que se encuentran en común con la mayoría de los estudios realizados por otros grupos de investigación son las citocinas IL-6, IL-8, MCP-1 y G-CSF, mientras que las demás solo se han reportado aumentadas en algunas investigaciones pero en otras no tienen una diferencia significativa (9-12). Estas discrepancias se podrían explicar mediante diversos factores como la longitud de la quemadura, tiempo entre la quemadura y el tratamiento, comorbilidades o complicaciones, el conteo de glóbulos blancos, factores genéticos y epigenéticos (8).

Las lesiones graves en la piel son seguidas por una enorme respuesta inflamatoria que, si bien es una respuesta sistémica transitoria, la herida puede sufrir los efectos del influjo agudo de mediadores inflamatorios y de factores de crecimiento durante tiempos prolongados. Una vez que se produce la quemadura, el área contiene una variedad de tipos celulares dentro de los que se encuentran las plaquetas, neutrófilos, linfocitos, macrófagos y fibroblastos, cuya actividad se regula por una compleja interacción de múltiples citocinas, así como de mecanismos neuroendocrinos del individuo (13).

Todos estos procesos involucran una regulación orquestada por vías de señalización celular que controlan la expresión de diversos genes asociados con funciones cruciales (14). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) son de los principales reguladores moleculares que controlan la evolución de una herida causada por quemadura. Para la activación y proliferación de fibroblastos es importante el factor de crecimiento transformante (TGF- β). La actividad constante de TGF- β es asociada con cicatrices hipertróficas y contracciones de la herida que conducen a desfiguración y deformidad (13). Alteraciones en estas vías de señalización puede causar una inadecuada cicatrización y, en consecuencia, un aumento en morbilidad y mortalidad de los pacientes (14).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, los procesos moleculares en los que se involucrado el organismo después de sufrir algún daño de quemadura son variados y dependen en gran medida de la gravedad de la quemadura. Uno de los principales actores en la respuesta a quemaduras es la inflamación y con ella, moléculas pro y antiinflamatorias que son las mediadoras de la respuesta ante la quemadura para intentar atenuar el daño. Sin embargo, en algunas ocasiones la exacerbación de los mecanismos inflamatorios es contraproducente para el organismo y termina dañando más el tejido que previamente fue afectado por la quemadura, por lo que la regulación de la expresión de estos mediadores es muy importante. A la fecha se han descrito diversos mecanismos de regulación de estos mediadores, dentro de los que se encuentran los mecanismos epigenéticos (3, 15).

Finalmente, en función de la severidad y profundidad de la quemadura, se puede desarrollar una variedad de respuestas y complicaciones como es la respuesta inflamatoria sistémica, infección, hiperglicemia, lipólisis, hipermetabolismo, inmunosupresión y alteraciones intestinales. La respuesta sistémica exacerbada o también conocida como choque post-quemadura, provoca una serie de cambios fisiopatológicos que tienen el potencial de afectar múltiples órganos y tejidos provocando falla multiorgánica e incluso la muerte de los pacientes con quemaduras graves. Dentro de los sistemas mas afectados podemos encontrar

el sistema hepático, cardiovascular, pulmonar, gastrointestinal, hematopoyético, renal, inmunológico y muscular (3).

1.2.Epigenética

El termino epigenética viene del griego que significa “sobre” y en el contexto biológico, epigenética representa una forma de herencia que está sobrepuesta en la herencia génica basada en el ADN (16). Por lo tanto, epigenética se refiere a aquellas modificaciones a nivel de ADN que no afectan directamente la secuencia de nucleótidos y que pueden ser tanto transitorias como heredables. Las modificaciones epigenéticas comprenden tres principales procesos que son: 1) metilación del ADN; 2) interacciones y acciones del ARN no codificantes; y 3) modificación de histonas y remodelación de cromatina. Estas modificaciones epigenéticas al no alterar la secuencia génica pueden potencialmente regular la expresión o silenciamiento de genes de forma mucho más rápido en contraste con las mutaciones del ADN, esto es importante porque gracias a la epigenética, un organismo es capaz de responder a su entorno con mayor rapidez. Por lo tanto, las modificaciones epigenéticas son la respuesta a los procesos ocurridos en el medio ambiente que puedan regular el comportamiento a nivel molecular de un organismo (17). Los mayores componentes del sistema epigenético son la metilación del ADN y las modificaciones de histonas (18).

1.2.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN es un proceso reversible resultado de la transferencia de un grupo metilo del cofactor S-adenosilmetionina (SAM) al carbono 5 del anillo de citosina para generar grupos 5-metilcitosina (5mC), preferentemente en regiones donde una citosina es seguida directamente por una guanina en la secuencia de ADN, también conocida como islas CpG (**Figura 3 A**). La metilación de citosina en el ADN ocurre en sitios clave, lo que dificulta la unión de la maquinaria transcripcional a los genes promotores o potenciadores de genes o simplemente expresando un gen diana por completo. La metilación de la citosina de ADN debe estar en un contexto de dinucleótidos CpG o islas CpG. Las islas CpG son frecuentemente encontradas en regiones regulatorias del ADN, y en particular en los promotores de aproximadamente 40% de los genes humanos; sus metilaciones pueden silenciar la expresión genética mediante: 1) interferencia directa, ya que la formación de 5mC puede inhibir la unión específica de factores de transcripción para reconocer sitios en sus respectivos promotores; y 2) silenciamiento genético el cual ocurre por unión directa de represores transcripcionales específicos del ADN metilado (19). El perfil de metilación del ADN deriva no solo de la acción directa de enzimas como las ADN metiltransferasas (DNMTs), sino que también de la acción indirecta de otras proteínas, incluyendo las proteínas de unión a CpG (18). Solamente tres enzimas (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B) tienen actividad de metiltransferasa en los residuos de citosina del ADN genómico de mamíferos; DNMT1 y DNMT3 juegan un papel importante en el mantenimiento de la metilación y la metilación *de novo* del ADN, respectivamente. DNMT1 metila selectivamente la citosina de

la secuencia CpG en ADN hemimetilado, y puede copiar el patrón de metilación durante la replicación del ADN para permitir que las células hijas hereden con fidelidad el patrón de metilación (20).

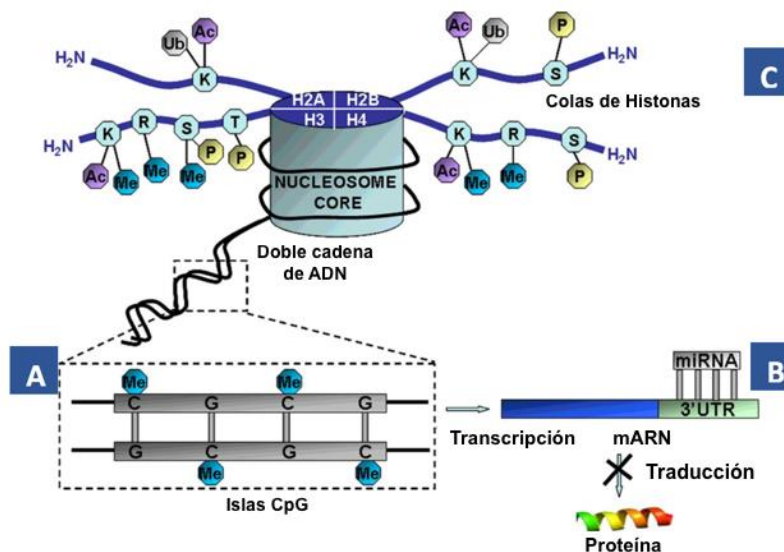


Figura 3. Representación esquemática de los principales mecanismos de regulación epigenética en la expresión génica (21).

1.2.2. ARN no codificante

La epigenética ahora incluye también a los mecanismos endógenos de RNAi, basados en los miRNAs (secuencia de cadena simple, no codificante, entre 21 y 23 nucleótidos), moléculas de ARN que fueron transcritas del *loci* de miRNA y funcionan principalmente como represores postranscripcionales de la expresión génica (Figura 3 B). Los miRNAs operan a través de la unión de elementos de respuesta a miRNA (MREs) dentro del 3'-UTRs de sus mRNAs diana. La formación del híbrido miRNA/mRNA diana induce la escisión y/o represión traduccional de su mRNA. Un único miRNA es capaz de dirigirse a múltiples mRNAs y un único mRNA puede contener múltiples sitios de unión a miRNA. Mitchell y colaboradores en 2008 reportaron la presencia de miRNAs endógenos en la circulación que no tenían células asociadas. Tales miRNAs circulantes son excepcionalmente estables debido a que están protegidos de degradación por micro vesículas, proteínas de unión a ARN o lipoproteínas (22). Los miRNAs circulantes probablemente sean liberados por las células circulantes y los órganos dañados/enfermos, siendo muy prometedores como posibles biomarcadores en detección de enfermedades y diagnóstico. Finalmente, las interacciones entre las metilaciones del ADN y las modificaciones de histonas pueden regular la expresión de algunos miRNAs, mientras que otros miRNAs pueden controlar la expresión de DNMTs e Histonas Acetiltransferasas (HDACs), lo cual crea un pequeño circuito bastante complejo (23).

1.2.3. Histonas

Al complejo de histonas-ADN se le conoce como nucleosoma, éstos son los responsables del empaquetamiento de los cromosomas. Cada nucleosoma consiste en un complejo de ocho proteínas llamadas histonas. La cromatina es el complejo de histonas con proteínas cromosomales no histonas y con el ADN nuclear de las células eucarióticas. La estructura de la cromatina no es un soporte inerte para el empaquetamiento de la información, más bien, se podría definir mejor como un mapa fluido e informativo de todo el genoma y que puede cambiar como resultado de estímulos internos, externos o como contribución o respuesta de decisiones en el proceso de diferenciación celular (17).

El complejo octamérico de histona está compuesto por dos juegos de subunidades de histonas: H2A, H2B, H3 y H4 en las cuales se encuentran enrollados aproximadamente 142 pares de bases de ADN y como histona “estabilizadora” encontramos a la histona H1 (Figura 4 A). Cada una de estas proteínas son relativamente pequeñas (102 – 135 aminoácidos) y comparten motivos estructurales conocidos como “*histone fold*”, formados de tres α hélices conectados mediante dos bucles. Cuando se ensambla el nucleosoma, la unión entre las histonas se hace en pares, es decir, se unen H3-H4 y H2A-H2B para formar dímeros y después cada uno de estos dímeros se unen para formar tetrameros. Un tetramero de H3-H4 posteriormente se combina con el de H2A-H2B para formar un octámero compacto alrededor del cual se enrollara el ADN (16) (Figura 4 B). Los tallos de histona N- y C-terminal, sobresalen del nucleosoma, lo que les da el potencial de interactuar con los nucleosomas adyacentes y el ADN enrollado (Figura 3 C).

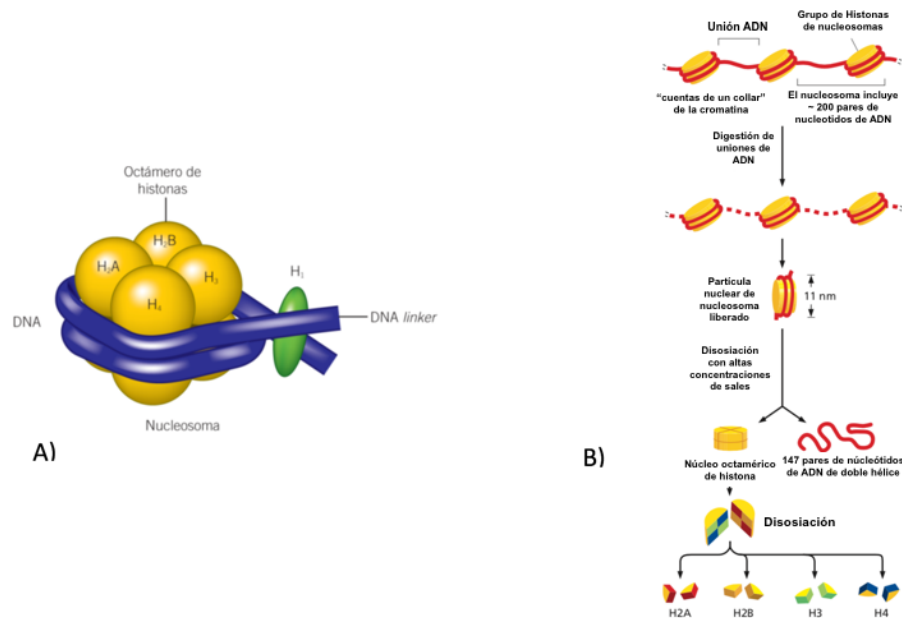


Figura 4. A) Complejo octamérico de histona (24). B) Composición del nucleosoma (16).

Al estado compacto de la cromatina se le conoce como heterocromatina, mientras que el estado relajado recibe el nombre de eucromatina. Estos estados están asociados con modificaciones postraduccionales particulares en las histonas que ocurren en los sitios N-terminal de las colas de las histonas. Por ejemplo, la heterocromatina está asociada a metilaciones en residuos específicos de lisina (K) de la histona 3 (H3) como son: H3K9, H3K27 y H4K20 por mencionar algunas. Estas se deben al arreglo espacial que adopta el ADN con las histonas dificultando las modificaciones en otros sitios de histonas. Por el contrario, a la eucromatina se le asocia con las modificaciones epigenéticas de metilación en H3K4 y acetilación de los residuos de lisina en H3 y H4, esto se debe a que en el arreglo espacial de eucromatina, el ADN se encuentra laxo y sin ser envuelto en el complejo octamérico de las histonas (25). Este tipo de modificaciones estructurales son fundamentales para la coordinación de la remodelación de la cromatina y el acceso del ADN a la maquinaria transcripcional.

Hasta ahora se tienen identificadas más de 60 modificaciones postraduccionales de histonas, de las cuales, la gran mayoría de esta información es acerca de las modificaciones covalentes pequeñas, como es el caso de las acetilaciones, metilaciones, ubiquitinaciones, fosforilaciones, sumoilación y ADP-ribosilación; sin embargo, no hay que descartar otras modificaciones menos frecuentes y/o que no se han encontrado en humanos, como es el caso de la butirilación, crotonilación, formilación, glutationilación, malonitación, O-GlucosilNAcetilación, hidroxilación, propionilación y succinilación (26, 27) (Figura 5). Estas pequeñas modificaciones en las histonas cambian la diafonía y pueden regular diferentes funciones, a través de la acción de proteínas lectoras (28).

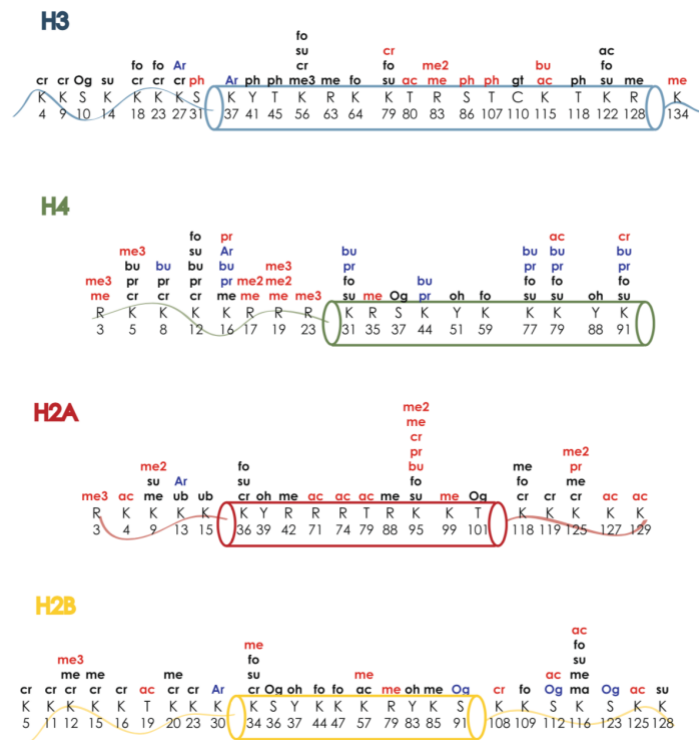


Figura 5. Modificaciones identificadas recientemente en los residuos de las histonas. Negro, modificaciones encontradas in vivo en humanos; rojo, modificaciones encontradas en cerebro de ratón; azul, modificaciones encontradas in vitro (27).

La acetilación en histonas neutraliza las cargas positivas de los residuos de lisina, quitando la atracción entre las proteínas de histonas y los grupos fosfatos cargados negativamente en el ADN, que conduce a un cambio hacia la cromatina transcripcionalmente activa. El estado de acetilación de histona resulta del balance entre la actividad de la enzima histona acetiltransferasa (HATs) y la histona deacetilasa (HDACs). La metilación de histona tiene lugar en los residuos de arginina y lisina con mono, di o tri-metilaciones (29). La metilación de histona es regulada por el balance en la actividad de diferentes metiltransferasas y demetilinas. La fosforilación de histonas se encuentra en los residuos de serina, treonina y tirosina y su abundancia puede variar dramáticamente entre la interfase y la mitosis (30). La cromatina transcripcionalmente activa o silenciada se caracteriza por distintas combinaciones en las modificaciones de histonas, resultando en la acción balanceada de enzimas. Tales combinaciones parecen ajustar la expresión génica y regular procesos celulares importantes, los cuales, cuando están desregulados, pueden contribuir al desarrollo de una enfermedad (21).

Entonces, las modificaciones en las histonas son modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés) que alteran la estructura proteica del complejo octamérico de las histonas dentro del nucleosoma sin modificar la secuencia de ADN y estas se regulan por enzimas específicas (31). Parte de la complejidad de la epigenética se encuentra en que las PTMs de histonas pueden ser reversibles y parcialmente heredables, y a su vez, pueden controlar y ser controladas por el genoma. Las modificaciones en las histonas no tienen la misma fidelidad a través de las divisiones celulares como las metilaciones del ADN, por lo tanto algunas modificaciones pueden reestablecerse y otras no (17).

El grado de modificaciones en cada residuo de histonas, así como la combinación de estas modificaciones puede tener diferente impacto en la expresión o supresión de genes y en la misma estructura de las histonas, ocasionando en algunos casos la posibilidad de una reprogramación fenotípica de diversas células (32, 33). Sabiendo esto entonces podemos decir que, los estados epigenéticos juegan un rol importante en la regulación transcripcional y el mantenimiento de la actividad de ciertos genes, que a su vez tendrán un impacto en toda una cascada de señalizaciones, y que dependerá de las condiciones con las que este interaccionando el organismo.

1.2.4. Inflamación y epigenética

Como ya se ha mencionado con anterioridad, los procesos moleculares en los que se involucra el organismo después de sufrir algún daño de quemadura son variados y dependen en gran medida de la gravedad de la quemadura. Uno de los principales actores en la respuesta a quemaduras es la inflamación y con ella, moléculas pro y antiinflamatorias que son las mediadoras de la respuesta ante la quemadura para intentar atenuar el daño. Sin

embargo, en algunas ocasiones la exacerbación de los mecanismos inflamatorios es contraproducente para el organismo y termina dañando más el tejido que previamente fue afectado por la quemadura. Al analizar el perfil de expresión epigenética en procesos inflamatorios, se ha observado una correlación de marcas epigenéticas con la activación o supresión de genes que están involucrados en los procesos inflamatorios. Por ejemplo, la metilación en los sitios H3K4me3 y H3K27me3 es característica de las células dendríticas (DC) que son derivadas de monocitos bajo condiciones inflamatorias, a medida que pasan de células “inmaduras” a células maduras presentadoras de antígeno. La localización de las modificaciones postraduccionales (PTMs) de histonas bivalentes (histonas que pueden contener modificaciones asociadas a represión o activación al mismo tiempo), da como resultado un estado bivalente con regulación dinámica de moléculas coestimuladoras de DC dominantes, CD14, CD83 y CD86, así como el antígeno leucocitario humano (HLA)-DRB1, factores de transcripción de la familia NF- κ B y otras citocinas, quimiocinas y sus receptores. En pocas palabras, estas marcas tienen un papel de regulación génica que determina la habilidad de la célula para detectar y reaccionar a una inflamación por patógenos. Entonces, si se analiza a detalle el perfil epigenético que presentan pacientes con quemaduras en la piel, se podría conocer como estas PTMs están involucradas en la regulación de la cascada de señalización en procesos inflamatorios y con ello se podrá tener un conocimiento más amplio sobre el estado del paciente y cómo evadir el daño que se produce por mecanismo inflamatorios (15).

En procesos inflamatorios, Ansel y colaboradores descubrieron que cambios epigenéticos afectan a una variedad de genes que pueden ser hereditarios(34) y que, como sabemos, tienen funciones específicas en los procesos inflamatorios. Por ejemplo, en las células T, existe una pequeña región en el gen de interleucina 2 (IL-2) que sufre una desmetilación después de su activación, provocando la producción de las IL-2 (35).

Foster y colaboradores estudiaron mediante una serie de experimentos, la participación de la cromatina en el control específico de genes en la tolerancia inducida por lipopolisacárido (LPS). Básicamente el experimento consistió en una estimulación de LPS a los macrófagos que, previamente se habían vuelto hiporesistentes, los cuales produjeron dos patrones distintos de modificaciones en la cromatina durante este estado de hiperreactividad. Así, mientras que un grupo de genes que son responsables de la producción de moléculas inflamatorias (TNF- α e IL-6) se silenciaron momentáneamente, un segundo grupo de genes (incluyendo varios efectores antimicrobianos) permanecieron listos para su activación. Esta regulación epigenética dinámica entonces, puede ser un punto clave para controlar la respuesta inflamatoria del huésped (36).

Aunque la metilación del ADN y las modificaciones de histonas son reguladas por diferentes enzimas y procesos químicos, los dos sistemas están enlazados en una regulación cooperativa de expresión génica. Tal parece, que la relación entre estos dos mecanismos epigenéticos puede funcionar en ambas direcciones, con metilación de histonas dirigiendo los patrones de metilación en el ADN y con metilación del ADN actuando como molde para facilitar las modificaciones de histonas después de la replicación de ADN (37).

2. Antecedentes.

En el laboratorio de medicina genómica del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), mediante ensayos multiplex colorimétricos basados en la técnica de ELISA, se evaluó la presencia de modificaciones postraduccionales a partir de linfocitos de pacientes con quemaduras graves. Se encontró un perfil diferencial en el cual se determinó una disminución significativa en el perfil de metilaciones, acetilaciones y fosforilaciones para histona H3 (**Figura 6F**) (38).

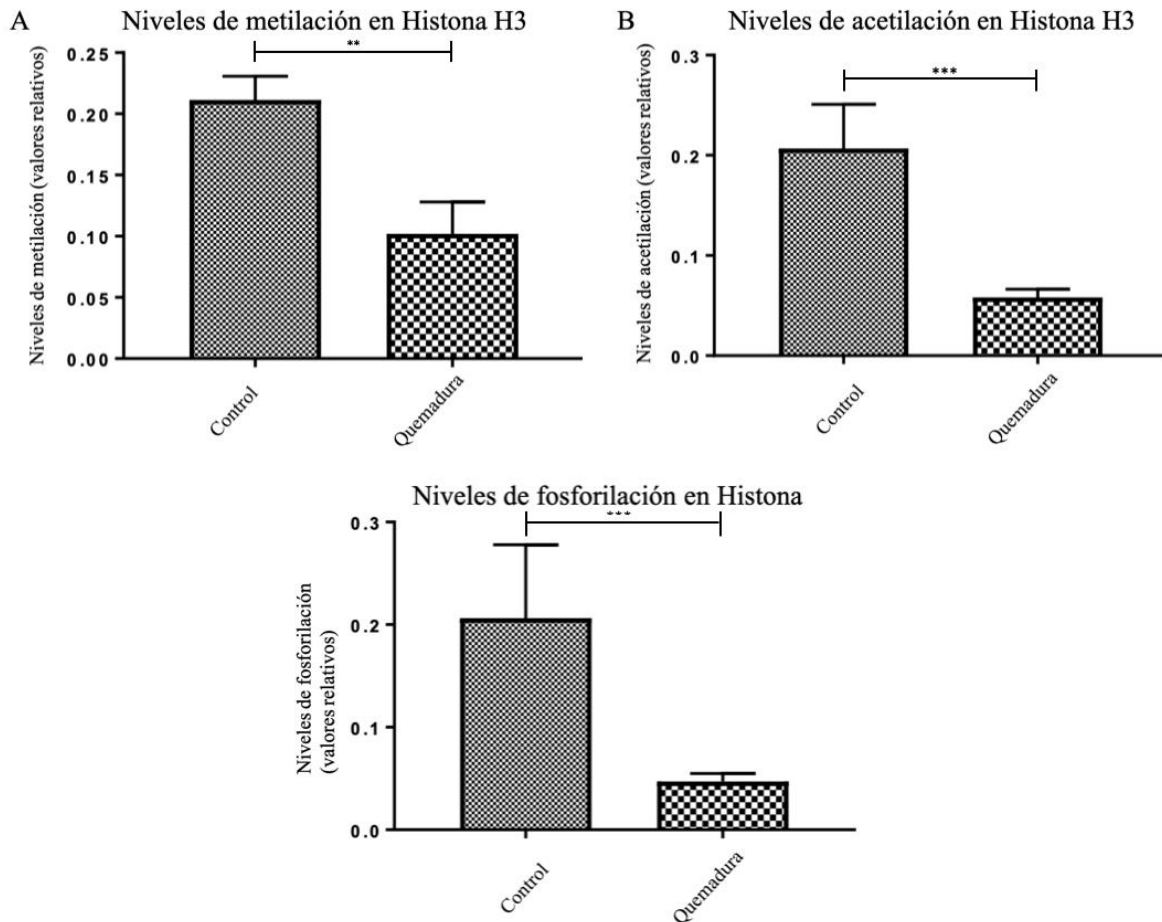


Figura 6. Niveles de las modificaciones postraduccionales de histona H3.

Se muestran los niveles de A) metilación, B) acetilación y C) fosforilación en H3 de pacientes con quemaduras graves comparadas con controles de linfocitos de individuos sanos. Estos resultados son presentados con una media \pm S.E.M. de tres repeticiones técnicas. ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$ (38).

Adicionalmente, se analizaron los niveles de 21 modificaciones postraduccionales individuales de histona H3 y se encontraron niveles alterados en varias de ellas, incluyendo metilaciones, acetilaciones y fosforilaciones (**Tabla 2**).

TABLA 2. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS ENCONTRADAS EN LINFOCITOS DE PACIENTES CON QUEMADURAS PARA LAS HISTONAS H3 Y H4 (38).

MODIFICACIONES EN H3	Significancia Estadística
K4MET2	**
K9MET1	**
K9MET3	*
K27MET2	ns
K36MET1	*
K36MET3	*
K79MET2	*
K4MET1	***
K4MET3	***
K9MET2	***
K27MET1	***
K27MET3	ns
K36MET2	**
K79MET1	ns
K79MET3	***
K9AC	*
K18AC	ns
K14AC	ns
K56AC	**
S10p	*
S28p	***

Las modificaciones postraduccionales mayormente afectadas y que resultaron de mayor interés por sus funciones previamente reportadas, se encontraron las marcas de activación H3K4me3, H3S28ph y H3K27me1, y la de represión H3K9me2.

2.1.H3K4me3

La trimetilación de lisina 4 en la histona H3 es una modificación clave que (39). Cuando H3K4me3 se encuentra cerca de los Sitios de Inicio de la Transcripción (TSS) (40). Esta marca interacciona con los complejos de remodelación de la cromatina ISw1/NURF, Yng1-NuA3 HAT, así como con la maquinaria transcripcional basal TFIID. También se une a Chd1 a través del cual se reclutan los componentes del (41)(41).

2.2.H3K9me2

Esta modificación de la histona se ha asociada a represión para los genes ampliamente distribuidos en la eucromatina, y con los dominios dinámicos asociados a la lámina nuclear periférica (LAD) (42). Mediante un análisis genómico se detectó que H3K9me2 está significativamente incrementado durante la diferenciación celular para formar Grandes dominios de Organización de la Cromatina K9 (LOCKs, por sus siglas en inglés), los cuales están notablemente alterados en células de cáncer (43). Una visualización por

inmunofluorescencia demostró que H3K9me2 está distribuida sobre la cromatina nuclear en células con proliferación activa, pero se vuelve espacialmente segregada de la forma activa de eucromatina y estructuralmente modificada durante la terminación de la diferenciación celular, de modo que se bloquea su exposición antigénica, es decir, que queda oculta. Estos hallazgos son consistentes con el hecho de que H3K9me2 es la mayor marca de la cromatina facultativa que comienza a condensar y reprimir a manera de regulador del desarrollo (44).

2.3.H3S28ph

Se ha demostrado que la fosforilación de H3S28 contrarresta el silenciamiento de Polycomb mediante la promoción de la disociación del complejo de represión Polycomb en respuesta a señales externas (45, 46). A pesar de los conocimientos de varios sistemas biológicos, los mecanismos por los cuales la fosforilación de la histona H3 impacta la transcripción aún no se conocen completamente, sin embargo, se ha reportado un papel importante de esta marca en la inducción de la transcripción en situación de estrés. Asimismo, se ha demostrado que H3S28ph regula el desensamble de una histona deacetilasa lo que provoca un incremento en la acetilación de la histona. Un enriquecimiento en las acetilaciones de la histona ha demostrado establecer una estructura en el nucleosoma que facilita la unión de RNAPII. Sin embargo, un incremento solamente de la acetilación no es siempre suficiente para inducir la transcripción, lo que sugiere que necesita de la fosforilación para promover la transcripción (47).

2.4.H3K27me1

Aunque poco se sabe de la marca H3K27me1, algunos estudios han demostrado que la mono metilación de la lisina 27 en la histona H3 está enriquecida en los sitios de activación de las regiones promotoras de la transcripción (48). Un análisis espectrofotométrico detectó la presencia de H3S28ph y H3K27me1/2 pero no la presencia de la trimetilación de H3K27, lo que sugiere que H3K27me1 trabaja en el mismo sentido que H3S28ph, mientras que H3K27me3 y H3S28ph son modificaciones mutuamente excluyentes (49).

3. Justificación

Cuando se expone al organismo a algún agente que provoque una quemadura, el cuerpo tiene diferentes procesos celulares que ayudan a atenuar el daño por las quemaduras. La respuesta inflamatoria es de los primeros procesos que se desencadenan ante este tipo de lesiones. Los procesos inflamatorios son regulados por una maquinaria celular en la cual actúan principalmente los linfocitos T, linfocitos T *helper* (Th), células NK y diversas citocinas como son: TNF- α , ICAM-1, IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-17 e IL-10. En diversos modelos inflamatorios, la diferenciación y función de las células del sistema inmune, así como la expresión de las citocinas, se ha visto regulada epigenéticamente por modificaciones postraduccionales. En el Laboratorio de Medicina Genómica del CENIAQ-INR, se demostró que algunas marcas epigenéticas, incluyendo H3K4me3, H3K9me2, H3K27me1 y H3S28ph, están desreguladas en pacientes con quemadura severa. Actualmente se sabe que estas marcas están regulando a las regiones promotoras de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-17, IL-8, c-Fos y miR-21 en algunos procesos inflamatorios, sin embargo, poco se conoce sobre la implicación de estas marcas en condiciones de quemaduras para promover o no la inflamación y el desarrollo de sepsis ([46](#), [50-55](#)).

Por esta razón, este proyecto de maestría planteó estudiar las alteraciones en el enriquecimiento de PTMs en regiones promotoras de genes inflamatorios en linfocitos de sangre periférica de paciente con quemadura severa. Los resultados contribuirán a explicar cómo estos procesos epigenéticos están regulando la maquinaria de mediadores inflamatorios, lo que llevará a mejorar el entendimiento de la epigenética de los pacientes con quemaduras y el desarrollo de su respuesta inflamatoria.

4. Objetivo general

Analizar las alteraciones en el enriquecimiento de modificaciones postraduccionales de la histona H3 en genes involucrados en procesos inflamatorios, en linfocitos de sangre periférica de pacientes con quemaduras severas.

5. Objetivos particulares

- Implementar técnica de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) en linfocitos de pacientes con quemaduras.
- Evaluar las alteraciones en los niveles de las marcas epigenéticas H3K4me3, H3K9me2, H3K27me1 y H3S28ph en genes asociados a procesos inflamatorios, en pacientes con quemaduras severas.
- Evaluar los perfiles de estas PTMs en los genes inflamatorios de pacientes con quemadura severa que desarrollan sepsis en comparación con los que no la desarrollan.

6. Materiales y métodos experimentales

6.1. Pacientes y controles

Para este proyecto, se incluyeron doce pacientes masculinos que ingresaron al Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados-INR (CENIAQ-INR) durante las primeras 24 horas después de una quemadura de segundo grado con al menos el 25% de la superficie corporal quemada, o pacientes con quemaduras de tercer grado y una superficie corporal quemada de al menos el 10%. En la **Tabla 3** se describen algunas características de los pacientes.

La población control corresponde a individuos que no presentan lesiones por quemaduras ni patologías que conlleven a procesos inflamatorios patológicos, y que correspondan en edad y sexo con los pacientes (**Tabla 4**).

Ambas poblaciones (pacientes y controles) dieron su autorización para participar en el estudio mediante la firma de una carta de consentimiento informado. Las cartas de consentimiento informado se realizaron siguiendo los lineamientos del comité de ética del INR (Anexos).

Los pacientes con quemaduras de primer grado, o quemaduras severas que se atendieron después de 24 horas del trauma no se incluyeron en el estudio.

TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON QUEMADURAS.

EDAD	Sexo	%SCQ	Tipo de quemadura	Sepsis (dpb)
71	M	50	Eléctrica	8
23	M	60	Eléctrica	12
81	M	50	Eléctrica	NP
18	M	35	Fuego	10
18	M	23	Fuego	NP
34	M	40	Fuego	9
21	M	20	Fuego	NP
22	M	60	Fuego	6
16	M	35	Eléctrica	6
15	M	35	Eléctrica	9
17	M	15	Fuego	NP
34	M	20	Fuego	7

Edad (años), M=masculino, NP=no presentó y día post-quemadura (dpq).

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DE LOS INDIVIDUOS CONTROL.

EDAD	Sexo
40	M
18	M
15	M
71	M
35	M
23	M

Edad (años) y M= masculino.

6.2. Obtención y purificación de linfocitos

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de pacientes con quemaduras de 1, 5 y 10 dpq. Las muestras de pacientes y controles se obtuvieron usando tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y fueron procesadas el mismo día en que fueron tomadas. Se empleó la técnica de separación de células mononucleares (MNC) por medio de un gradiente de Ficoll con la solución Lymphoprep™ (60-00092-12).

6.3. Inmunoprecipitación de la cromatina

Se realizó el entrecruzamiento de proteínas-ADN añadiendo 500 µL de solución de fijación (PBS 1X y Formaldehído 1%) al botón de linfocitos de pacientes y controles. Se incubó a temperatura ambiente en agitación por 15 minutos. Se adicionó glicina 125 mM, se agitó y se incubó en agitación por 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó el botón con 5 mL de solución de lavado PBS (PBS 1X y PMSF 10.2 mM, 10837091001). Se centrifugó por 5 min a 3,200xg a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se volvió a lavar. Se incubó en hielo seco 10 minutos para facilitar la lisis celular. Se añadió 5 mL de solución de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl y 0.5% NP40, 127087-87-0) y se suplementó con inhibidor de proteasas 1X (PIC, ab201119) y PMSF 0.05 mM. Se incubó en hielo 30 minutos, se agitó por 30 segundos vigorosamente y se centrifugó a 3,200xg, 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 500 mL de solución de lisis nuclear (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS) suplementado con inhibidor de proteasas 1X y PMSF 0.05 mM. Se transfirió la solución a un tubo de 1.5 mL para poder realizar la sonicación y se incubó en hielo por 10 minutos.

Se sonicó la cromatina usando el sonicador Fisherbrand™ 705 Sonic Dismembrator a 10% de potencia, 30 pulsos, 15 segundos encendido y 60 segundos apagado. La muestra se mantuvo en frío todo el tiempo. Se centrifugó 14,000 rpm, 4°C por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se dividió en 3 tubos con los siguientes volúmenes: 25 µL para *input* 1, 15 µL para *input* 2 y los 460 µL restantes fueron usados como la cromatina para inmunoprecipitar.

Para obtener la cuantificación de la cromatina, a los 25 μL del *input* 1 se le agregaron 175 μL de solución TE pH 8 y RNAsa A (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se agitó e incubó a 37 °C por una hora. Se añadió Proteínasa K (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), se agitó y se incubó a 37 °C por 3 horas. Después se añadió NaCl (0.25 M), se agitó y se incubó a 65 °C por toda la noche. Se purificó por el método de Fenol:Cloroformo ayudado de glucógeno (polisacárido que co-precipita con cantidades pequeñas de ADN, haciéndolo visible). Se resuspendió en TE, se dejó hidratar el ADN por 30 minutos y se cuantificó. Se usaron 10 μg de cromatina para la inmunoprecipitación.

Se equilibraron 30 μL de perlas de Proteína G Agarosa (Invitrogen, N° de catálogo 15920-010) por inmunoprecipitado con solución de dilución (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA y 1 % Tritón). Se agitaron por inversión 10 veces, centrifugaron a 1,250xg, 1 minuto a 4 °C y se desechó el sobrenadante.

Se realizó el entrecruzamiento de proteínas-ADN con PBS 1X, formaldehído 1% y glicina 125 mM. Se lavó el botón con PBS 1X y PMSF 0.2 mM. Se lisaron las células incubando el botón en hielo seco y adicionando solución de lisis Tris-HCl pH 7.4 10 mM, NaCl 10 mM y NP40 0.5%) suplementado con inhibidores de proteasas 1X y PMSF (0.05 mM). Se resuspendió el botón en solución de lisis nuclear (Tris-HCl pH. 7.5 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%) suplementados con inhibidor de proteasas 1X y PMSF 0.05 mM. Se fragmentó la cromatina por sonicación 10%, 30 pulsos, 15 encendido/60 apagado y se separó en 3 tubos (cromatina e *input*).

Se clarificó la cromatina con perlas de proteína G agarosa previamente equilibradas con solución de dilución (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM y tritón 1%), se incubaron y se añadieron 4 μg de anticuerpo correspondiente a cada inmunoprecipitado, excepto para H3S28ph, como se muestra en la **Tabla 5**. Se añadieron inhibidores de proteasas y se incubó 4°C, 16 horas.

Tabla 5. Información de los anticuerpos para inmunoprecipitar la cromatina.

<i>Anticuerpo</i>	Catálogo	Concentración Stock	Cantidad	Origen
<i>Anti-H3K4me3</i>	AB8580	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	4 μg	Conejo
<i>Anti-H3K9me2</i>	AB1220	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	4 μg	Rata
<i>Anti-H3K27me1</i>	AB194688	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	4 μg	Conejo
<i>Anti-H3S28ph</i>	AB32388	0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1 μg	Conejo
<i>Anti-IgG</i>	AB6709	2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	4 μg	Conejo

Se bloquearon las perlas equilibradas con BSA 4% deslipidado (vol:vol). Se añadió la reacción de CHIP-Ab, se incubó y se realizaron lavados secuenciales con las soluciones: solución de dilución (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM y Tritón 1%), solución baja en NaCl (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, Tritón 1%, SDS 0.1% y deoxicolato 0.1%), solución alta en NaCl (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 2mM, Tritón 1%, SDS 0.1% y deoxicolato 0.1%), solución alta en LiCl ((20 mM Tris-HCl, 500 mM LiCl, 2mM EDTA, 1% Tritón, 0.1% SDS, 0.1 % deoxicolato) y solución TE pH. 8. Al botón, se le añadió solución de elución (25 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA y 0.5% SDS) y se incubó 15 minutos, 65°C en agitación suave.

Al eluido se le adicionó RNAsa A (0.1 µg/µL). Se tomó el 10% (tomando como relación el volumen de cromatina inmunoprecipitada) y se le adicionó solución TE pH.8 y RNAsa A (0.1 µg/µL). Se añadió proteínasa k. Se adicionó NaCl y se dejó en el termociclador 16 horas a 65 °C.

Se purificó el ADN mediante el método Fenol: Cloroformo, se resuspendió el botón con 100 µL de TE y se realizaron las soluciones para hacer qPCR.

6.4. qPCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real se usó para evaluar el enriquecimiento de las marcas epigenéticas de histonas con secuencias promotoras de los genes IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-17, IL-8, c-Fos y miR-21, los cuales están involucrados en procesos inflamatorios causados por quemaduras. Se realizó por triplicado usando Power SYBR_green PCR master mix (Bio-rad). Los datos fueron normalizados por el método porcentaje del *input*, el cual toma la relación entre el CT del *input* y el CT de los inmunoprecipitados para eliminar la señal de las uniones inespecíficas (56). Los oligonucleótidos usados en la reacción de qPCR son listados en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos usados para Chip-qPCR

Gen	NCBI	Sentido 5' → 3'	Anti sentido 5' → 3'
IL-1β	NG_008851.1	CGTGGGAAAATCCAGTATTTTAATG	CAAATGTATCACCATGCAAATATGC
IL-10	NG_012088.1	GGGGACCCAATTATTTCTCA	TGGGCTACCTCTCTTAGAAT
IL-17α	NG_033021.1	TCACATGATGCTGTGCAGTAAGAA	TGGTACGAGATAATGGAACAAAAG
IL-8	M28130.1	CAGAGACAGCAGAGCACAC	ACGGCCAGCTTGGAAGTC
c-Fos	NG_029673.1	GAGCAGTTCCCGTCAATCC	GCATTCGCAGTTCCTGTCT
miR-21	BK006524.1	TGGCAACACCAGTCGATGGGC	AGTGCCACCAGACAGAAGGAC
IL-6	NG_011640.1	TCGTGCATGACTTCAGCTTT	GCGCTAAGAAGCAGAACCAC
TNF-α	LT546440.1	AACCGAGACAGAAGGTGCAG	TGTGCCAACAACTGCCTTTA

6.5. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados usando *Prism 8 software* (GraphPad). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos se presentan como media \pm S.E.M. (error estándar de la media). Los análisis estadísticos fueron realizados usando un análisis de ANOVA *one-way* para determinar la diferencia estadística entre diferentes grupos y control. $P < 0.005$ fue considerado estadísticamente significativo. El valor P esta presentado en las figuras con un asterisco. La ausencia del asterisco indica que el cambio relativo entre el control y el grupo problema no presento diferencia estadísticamente significativa.

7. Resultados

Previamente, en el Laboratorio de Medicina Genómica, CENIAQ-INR, se encontraron niveles diferenciales de algunas modificaciones postraduccionales de histonas H3 entre pacientes con quemaduras e individuos sanos. Las marcas más afectadas fueron H3K4me3, H3K9me2, H3K27me1 y H3Ser28ph, las cuales se sabe que tienen funciones en la regulación de la expresión de genes asociados con la inflamación (46, 50-53, 57), por lo que en este trabajo evaluamos el enriquecimiento de estas marcas sobre las regiones promotoras de genes inflamatorios previamente descritos con regulación epigenética en otros modelos de inflamación, tales como IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-8, c-Fos, TNF- α y miR21. Adicionalmente, debido a que la expresión alterada de los genes involucrados en la inflamación también ha sido asociada a una mayor susceptibilidad al desarrollo de sepsis, en este trabajo analizamos el perfil de asociación de estas marcas epigenéticas con los promotores de genes inflamatorios en pacientes con quemadura severa que desarrollaron sepsis, en comparación con los que no desarrollaron sepsis.

Las edades de los pacientes y controles que se utilizaron para este estudio están en un rango de 15 a 81 años, con un promedio de edad de 31 ± 21 años y 34 ± 19 años, respectivamente (Tabla 7). El estado inflamatorio de los pacientes se confirmó mediante un ensayo de ELISA para IL-6 en plasma, para los días 1, 5 y 10 (dpq).

Tabla 7. Demografía y datos clínicos de los pacientes con quemaduras.

	Pacientes con quemadura (n=12)	Controles (n=6)	Valor de P
Edad (años \pm SD) (rango)	31 \pm 21 (15-81)	34 \pm 19 (15-71)	0.79 (NS)
SCQ (% \pm SD) (rango)	40 \pm 15 (15-60)	-	-
Sepsis (n)	8	-	-

7.1. Estandarización de la técnica ChIP-qPCR

Para la estandarización de la inmunoprecipitación de la cromatina, se tomó como base el método reportado por Hirose y colaboradores en 2014 (58). Brevemente, se aislaron los leucocitos a partir de sangre periférica y posteriormente se realizó el entrecruzamiento de ADN-proteínas usando formaldehído y glicina como agentes de entrecruzamiento. Las condiciones de sonicado se estandarizaron cambiando la potencia, tiempo de sonicado y pulsos que recibía la muestra con el fin de obtener fragmentos con tamaño de entre 200 y 500 pares de bases. Finalmente, las condiciones de sonicado se definieron y verificaron mediante la visualización de los fragmentos de cromatina purificados en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 7).

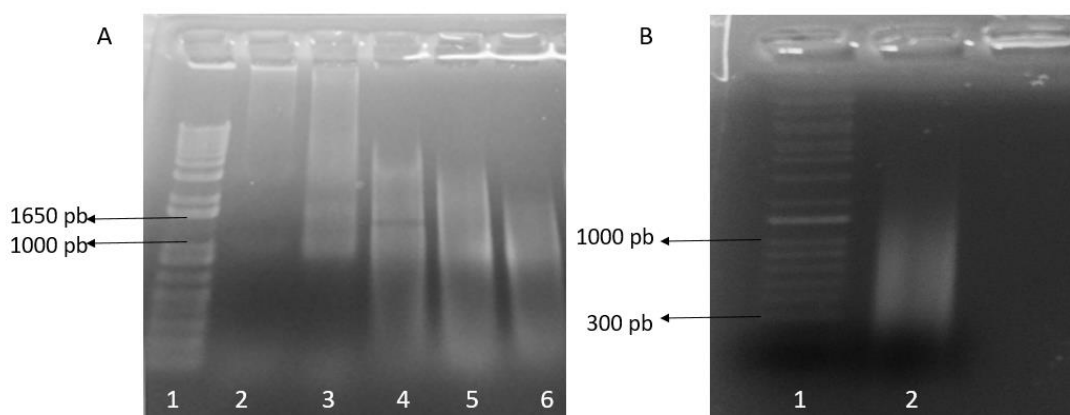


Figura 7. Reversión de entrecruzamiento y optimización de sonicación.

A) Sonicación al 10% de amplitud, usando 20 pulsos (carriles 3, 4, 5) o 40 pulsos (carril 6), cada uno con 30 s de encendido y 60 s de descanso. Carril 2, control sin sonicación. Carril 3, control sin proteinasa K/sin incubación 65 °C. Carril 4, control sin proteinasa K/con incubación 65 °C. Carril 5 y 6, tratados con proteinasa K/incubación 65 °C B) Sonicación al 10% de amplitud, usando 30 pulsos (carril 2), con 15 s de encendido y 60 s de descanso. Carril 1, marcador de peso molecular de 1 kilobase.

Para estandarizar las condiciones de inmunoprecipitación se usó como control positivo la asociación de la marca H3K27me3 sobre el promotor de IL-6 en leucocitos humanos, de acuerdo a lo reportado previamente por Ríos y colaboradores (59).

Los primeros ensayos mostraron muchas interacciones inespecíficas, es decir, que la señal del anticuerpo irrelevante (IgG), era casi de la misma magnitud que la señal del anticuerpo para H3K27me3 en la región promotora de IL-6 (Figura 8 A). Para observar un enriquecimiento en los niveles de H3K27me3 en el promotor de IL-6, fue necesario disminuir las interacciones inespecíficas aumentando los lavados, el bloqueo y un cambio en las concentraciones de sales de las soluciones utilizadas para los lavados (Figura 8 B).

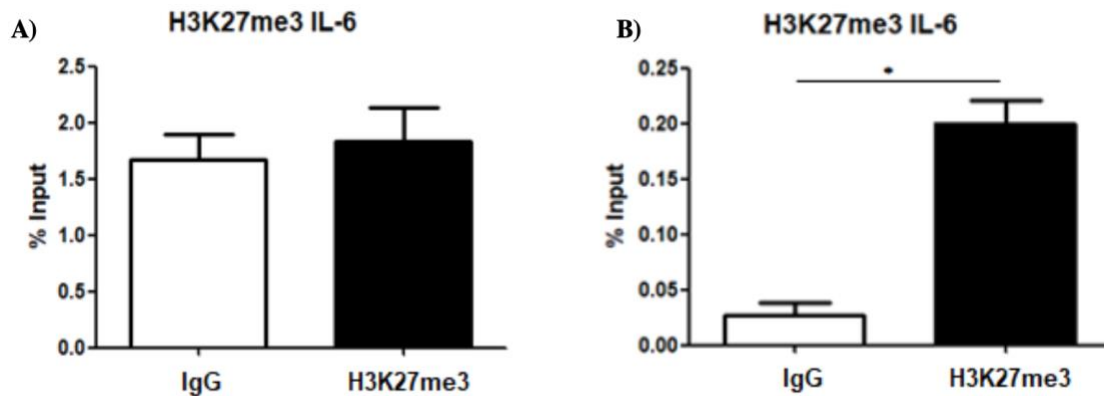


Figura 8. Optimización de las condiciones de inmunoprecipitación de cromatina acoplada a PCR en tiempo real. A) Se muestran los ensayos iniciales con uniones inespecíficas en el anticuerpo irrelevante (IgG) para H3K27me3 en la región promotora de IL-6. B) Muestra los ensayos con condiciones finales en los cuales las uniones inespecíficas del anticuerpo irrelevante (IgG) se ven disminuidas y presenta un enriquecimiento en los niveles de H3K27me3 para la región promotora de IL-6, mostrando una diferencia estadísticamente significativa (promedio \pm SD; * $p < 0.05$ con análisis de t-student).

7.2. ChIP-qPCR

Como ya se ha reportado, las modificaciones epigenéticas H3K4me3, H3K27me1 y H3S28ph están asociadas a la activación de la transcripción, mientras que la marca H3K9me2 se ha asociado a un silenciamiento en la transcripción. Por otra parte, diversos estudios han reportado una desregulación en la expresión de diversas citocinas y genes asociados a respuesta inflamatoria, tales como, IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-17, TNF- α , miR21 y c-Fos por lo que nos preguntamos si este aumento está asociado a un cambio en las interacciones de alguna de estas PTMs con las regiones promotoras de los genes. Para determinar si las quemaduras inducen la expresión de factores inflamatorios a través del reclutamiento de H3K4me3, H3K9me2, H3K27me1 y H3S28ph a las regiones promotoras de genes asociados a la inflamación, se realizó un ChIP-qPCR para examinar la acumulación de las modificaciones en las regiones promotoras de los genes blanco a través de los tiempos 1, 5 y 10 dpq. Para cada caso, se realizaron análisis comparativos entre controles y pacientes con quemaduras, y también entre pacientes con quemaduras que desarrollaron sepsis contra los que no desarrollaron sepsis. Los análisis estadísticos se hicieron usando ANOVA-one way.

7.3. H3K4me3

7.3.1. Pacientes y Controles

Los niveles de H3K4me3 en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-17, IL-8, c-Fos y miR21) para los 1, 5 y 10 dpq, fueron significativamente bajos en el grupo de quemados comparado con el control. Esto indica que en respuesta a quemaduras las marcas epigenéticas tienen un cambio importante en las regiones promotoras de genes inflamatorios. Además, lo anterior lleva a suponer que, ante una lesión por quemadura, H3K4me3 en cierta medida tiene que ser depuesta de estos promotores, probablemente para facilitar o promover la ocupación por parte de otras marcas de activación y/o la disminución de marcas de represión (**Figura 9**).

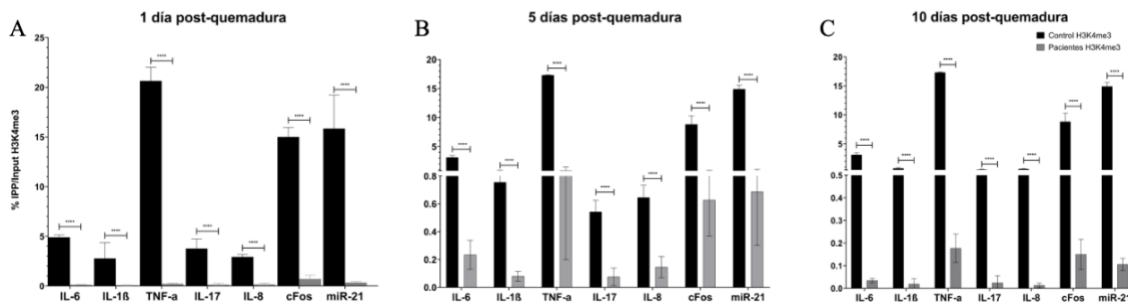


Figura 9. Niveles de H3K4me3 en pacientes con quemaduras graves.

(A) Día 1 post-quemadura, (B) día 5 post-quemadura y (C) día 10 post-quemadura en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación los cuales fueron detectados por CHIP-qPCR. El ensayo fue realizado usando anti-H3K4me3 e IgG como anticuerpo irrelevante (control). Se comparó el grupo control contra el grupo pacientes. Los niveles de H3K4me3 en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación fueron cuantificados por qPCR. Estos resultados son presentados con una media \pm S.E.M. de tres repeticiones técnicas. *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$.

7.3.2. Sepsis y no sepsis

Como se mencionó previamente, las marcas epigenéticas también fueron analizadas en los pacientes con quemaduras agrupados en: los que desarrollaron sepsis y los que no la desarrollaron. A pesar de que, con respecto a individuos sanos, la marca H3K4me3 bajó en todos los casos, al analizar los grupos de sepsis y no sepsis, algunos genes mostraron enriquecimiento diferencial de esta marca. Tanto en 1 como 5 dpq, el promotor de IL-1 β mostró niveles superiores de H3K4me3 en los pacientes que desarrollaron sepsis, mientras que TNF- α se encontró disminuida. miR21, por otra parte, tuvo niveles inferiores en 5 dpq en pacientes con sepsis, mientras que en 1 y 10 dpq no mostró diferencias entre los dos grupos. Interesantemente, los pacientes que desarrollaron sepsis presentaron niveles superiores de H3K4me3 en el promotor de c-Fos en 1 dpq con respecto a los niveles observados en pacientes que no desarrollaron sepsis, pero este se vio disminuido en 5 dpq, lo que revela que estos cambios son dinámicos durante el desarrollo de la respuesta

inflamatoria. En 10 dpq, cuando la mayoría de los pacientes con sepsis ya habían sido diagnosticados, los niveles de esta marca fueron homogéneos en los promotores analizados. Es destacable entonces, que se observaron cambios en el enriquecimiento de esta marca solo a tiempos cortos (1 y 5 dpb), cuando aún no se desarrollaba la sepsis (**Figura 10**).

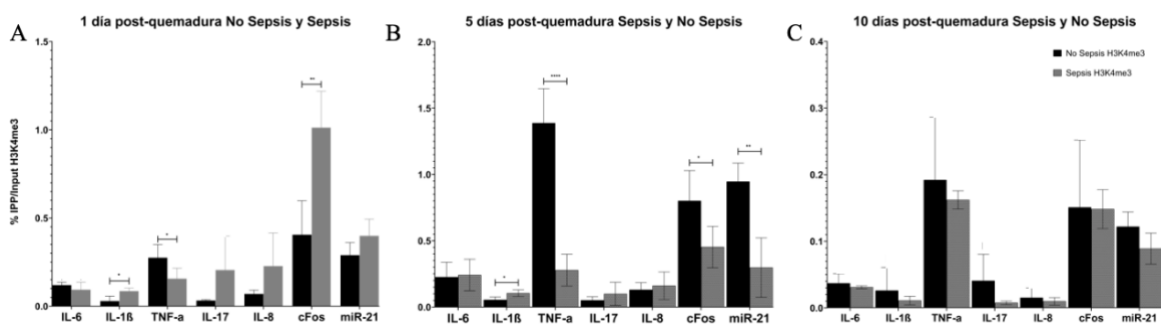


Figura 10. Niveles de H3K4me3 en pacientes con quemaduras graves de pacientes que desarrollaron o no sepsis. (A) Día 1 post-quemadura, (B) día 5 post-quemadura y (C) día 10 post-quemadura en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación los cuales fueron detectados por CHIP-qPCR. El ensayo fue realizado usando anti-H3K4me3 e IgG como anticuerpo irrelevante (control). Se comparó el grupo sepsis contra el grupo no sepsis. Los niveles de H3K4me3 en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación fueron cuantificados por qPCR. Estos resultados son presentados con una media \pm S.E.M. de tres repeticiones técnicas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

7.4.H3K9me2

7.4.1. Pacientes y controles

Los niveles de H3K9me2 en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-17, IL-8, c-Fos y miR21) para 1 dpq, fueron significativamente bajos en el grupo de quemaduras comparados con el control; sin embargo, para 5 dpq no se observa una disminución estadísticamente significativa para ninguna región promotora de genes y, por otro lado, para 10 dpq se observa una disminución significativa para la región promotora de TNF- α y miR-21. Esto indica que, en respuesta a quemaduras, H3K9me2 cambia rápidamente a tiempos cortos en las regiones promotoras de genes inflamatorios y se nivela a lo largo del tiempo. Además, lo anterior lleva a suponer que, ante una lesión por quemadura, esta marca tiene que ser rápidamente eliminada de los promotores, ya que es una marca de represión y los genes de inflamación necesitan ser rápidamente activados (**Figura 11**).

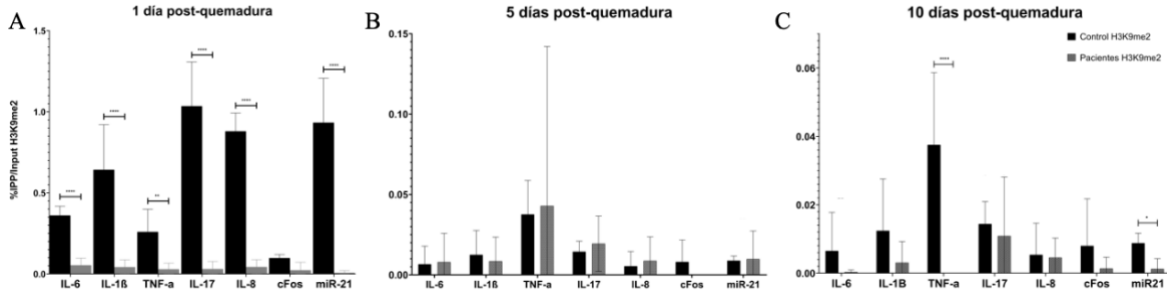


Figura 11. Niveles de H3K9me2 en pacientes con quemaduras graves. (A) Día 1 post-quemadura, (B) día 5 post-quemadura y (C) día 10 post-quemadura en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación los cuales fueron detectados por ChIP-qPCR. El ensayo fue realizado usando anti-H3K9me2 e IgG como anticuerpo irrelevante (control). Se comparó el grupo control contra el grupo pacientes. Los niveles de H3K9me2 en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación fueron cuantificados por qPCR. Estos resultados son presentados con una media \pm S.E.M. de tres repeticiones técnicas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

7.4.2. Sepsis y no sepsis

A pesar de que, con respecto a individuos sanos, la marca H3K9me2 bajó en todos los casos, al analizar los grupos de sepsis y no sepsis, algunos genes mostraron enriquecimiento diferencial de esta marca. En 1 dpq, los promotores de IL-1 β e IL-8 mostraron niveles aumentados de H3K9me2 en los pacientes que desarrollaron sepsis, mientras que en 5 y 10 dpq no se encontró diferencia significativa en los niveles de la marca para ninguna región promotora (Figura 12).

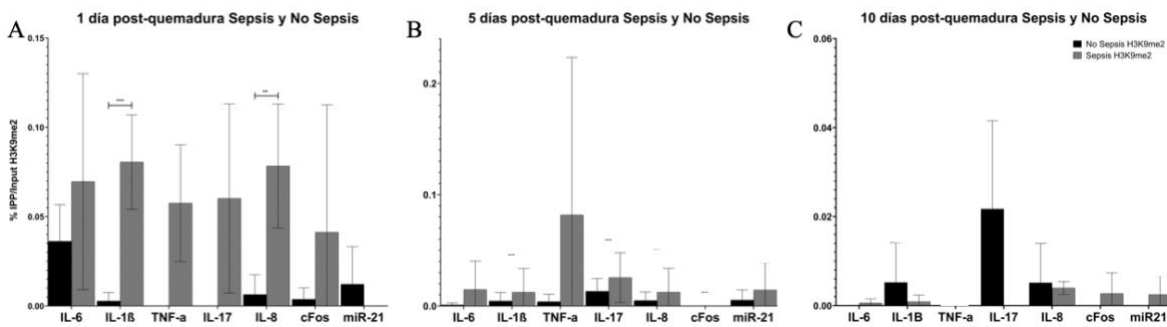


Figura 12. Niveles de H3K9me2 en pacientes con quemaduras graves de pacientes que desarrollaron o no sepsis. (A) Día 1 post-quemadura, (B) día 5 post-quemadura y (C) día 10 post-quemadura en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación los cuales fueron detectados por ChIP-qPCR. El ensayo fue realizado usando anti-H3K9me2 e IgG como anticuerpo irrelevante (control). Se comparó el grupo sepsis contra el grupo no sepsis. Los niveles de H3K9me2 en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación fueron cuantificados por qPCR. Estos resultados son presentados con una media \pm S.E.M. de tres repeticiones técnicas. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

7.5. H3S28ph

7.4.1. Pacientes y controles

Los niveles de H3S28ph en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación (IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-8, c-Fos y miR21) para 1 dpq, fueron significativamente bajos en el grupo de quemaduras comparado con el control; sin embargo, para 5 dpq no se observó diferencia significativa en IL-8, y por otro lado, hubo una disminución significativa en el promotor de TNF- α , la cual no estuvo presente en el día 1 y es destacable ya que es la única marca que no tuvo disminución significativa para la región promotora de TNF- α en 1 dpq. Finalmente, para 10 dpq se observa una disminución significativa para todas las regiones promotoras de genes (**Figura 13**).

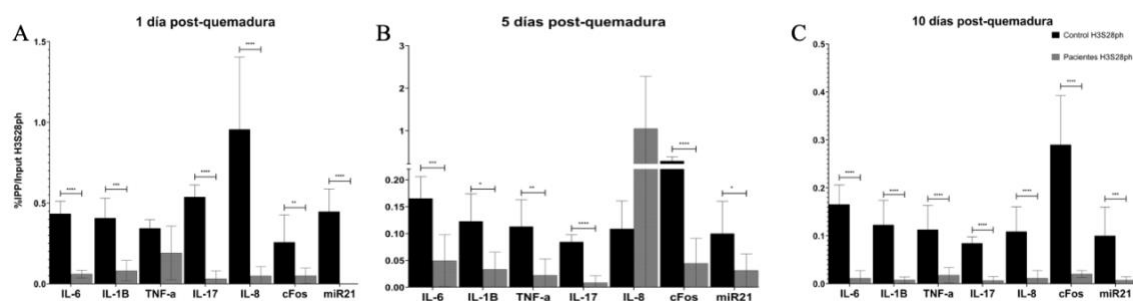


Figura 13. Niveles de H3S28ph en pacientes con quemaduras graves.

(A) Día 1 post-quemadura, (B) día 5 post-quemadura y (C) día 10 post-quemadura en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación los cuales fueron detectados por ChIP-qPCR. El ensayo fue realizado usando anti-H3S28ph e IgG como anticuerpo irrelevante (control). Se comparó el grupo control contra el grupo pacientes. Los niveles de H3S28ph en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación fueron cuantificados por qPCR. Estos resultados son presentados con una media \pm S.E.M. de tres repeticiones técnicas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

7.5.2. Sepsis y no sepsis

A pesar de que, con respecto a individuos sanos, la marca H3S28ph bajó en la mayoría de los casos a excepción de TNF- α , al analizar los grupos de sepsis y no sepsis, algunos genes mostraron enriquecimiento diferencial de esta marca. En 1 dpq, el promotor de IL-1 β y TNF- α mostró niveles aumentados de H3S28ph en los pacientes que desarrollaron sepsis, mientras que en 5 dpq, el promotor de IL-8 mostró niveles disminuidos. Por otro lado, en 10 dpq observamos que los promotores de IL-6, TNF- α , IL-17 e IL-8 mostraron niveles aumentados de la marca en los pacientes que desarrollaron sepsis. Interesantemente, los niveles de H3S28ph se encontraron diferencialmente alterados en más regiones promotoras a tiempos largos (10 dpq) que a tiempos cortos (1 y 5 dpq), en donde solo se presentaron alteraciones en dos y una región promotora, respectivamente. Este dinamismo en la marca supone que la regulación se da de forma activa ante el estímulo de sepsis (**Figura 14**).

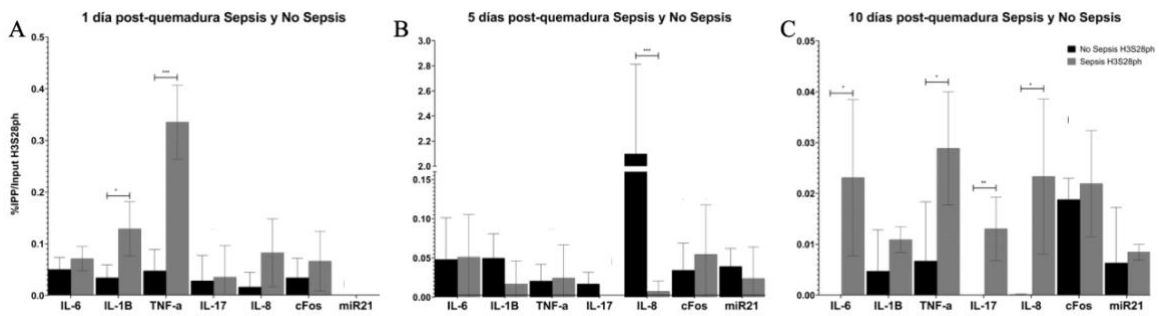


Figura 14. Niveles de H3S28ph en pacientes con quemaduras graves de pacientes que desarrollaron o no sepsis. (A) Día 1 post-quemadura, (B) día 5 post-quemadura y (C) día 10 post-quemadura en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación los cuales fueron detectados por ChIP-qPCR. El ensayo fue realizado usando anti-H3S28ph e IgG como anticuerpo irrelevante (control). Se comparó el grupo sepsis contra el grupo no sepsis. Los niveles de H3S28ph en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación fueron cuantificados por qPCR. Estos resultados son presentados con una media \pm S.E.M. de tres repeticiones técnicas. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

7.6. H3K27me1

7.5.1. Pacientes y controles

Los niveles de H3K27me1 en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación (IL-6, IL-1 β y miR21) para 1, 5 y 10 dpq, fueron significativamente bajos en el grupo de quemaduras comparado con el control, mientras que el promotor de TNF- α e IL-17, fueron significativamente altos en 5 y 10 dpq en el grupo de quemaduras. Por otro lado, IL-8 y c-Fos mostraron cambios en los tres periodos de tiempo, lo que indica que en respuesta a quemaduras H3K27me1 tienen cambios importantes y específicos en las regiones promotoras de genes inflamatorios. Además, debido a que esta es una marca de activación y que hay un aumento en la expresión de los genes en quemaduras, nuestros resultados nos llevan a suponer que, ante una lesión por quemadura, esta marca es altamente dinámica y que puede participar directamente para promover la activación de genes o indirectamente para facilitar o promover la ocupación por parte de otras marcas de activación y/o la disminución de marcas de represión (**Figura 15**).

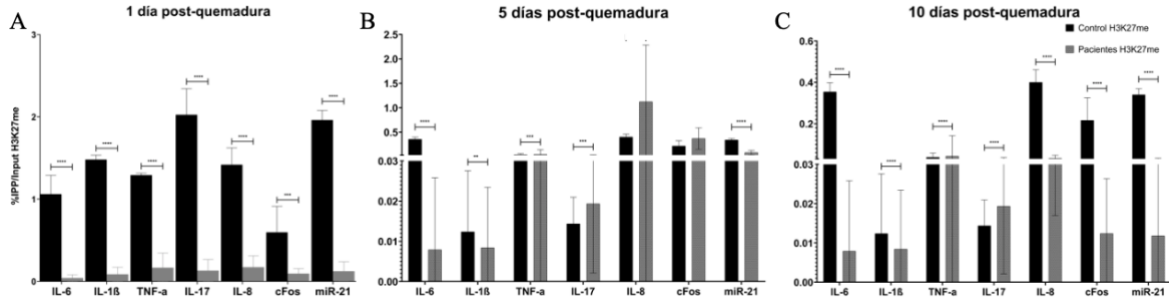


Figura 15. Niveles de H3K27me1 en pacientes con quemaduras graves.

(A) Día 1 post-quemadura, (B) día 5 post-quemadura y (C) día 10 post-quemadura en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación los cuales fueron detectados por ChIP-qPCR. El ensayo fue realizado usando anti-H3K27me1 e IgG como anticuerpo irrelevante (control). Se comparó el grupo control contra el grupo pacientes. Los niveles de H3K27me1 en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación fueron cuantificados por qPCR. Estos resultados son presentados con una media \pm S.E.M. de tres repeticiones técnicas. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

7.6.2. Sepsis y no sepsis

Al analizar los grupos de sepsis y no sepsis, se observó que en 1 dpq, el promotor de IL-6, TNF- α , IL-17, IL-8 y miR-21 mostró niveles aumentados de H3K27me1 en los pacientes que desarrollaron sepsis, mientras que en 5 dpq, el promotor de IL-6 y c-Fos mostró niveles aumentados y por otro lado, IL-8 mostro niveles disminuidos. Asimismo, en 10 dpq observamos que el promotor de IL-8 mantiene los niveles disminuidos de la marca, mientras que IL-1 β y c-Fos mostraron niveles aumentados en los pacientes que desarrollaron sepsis. Interesantemente podemos observar como en 1 dpq hay una regulación para casi todas las regiones promotoras de genes, mientras que en 5 y 10 dpq hay una disminución en la cantidad de genes con diferencia significativa (Figura 16).

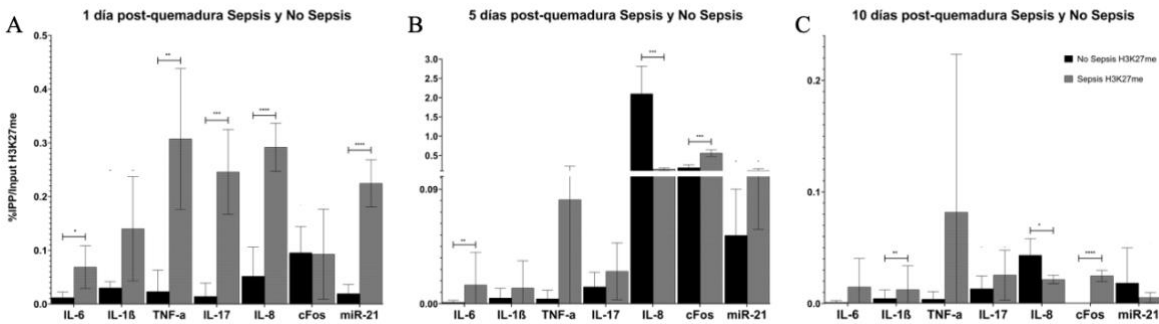


Figura 16. Niveles de H3K27me1 en pacientes con quemaduras graves de pacientes que desarrollaron o no sepsis.

(A) Día 1 post-quemadura, (B) día 5 post-quemadura y (C) día 10 post-quemadura en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación los cuales fueron detectados por ChIP-qPCR. El ensayo fue realizado usando anti-H3K27me1 e IgG como anticuerpo irrelevante (control). Se comparó el grupo sepsis contra el grupo no sepsis. Los niveles de H3K27me1 en las regiones promotoras de genes asociados a inflamación fueron cuantificados por qPCR. Estos resultados son presentados con una media \pm S.E.M. de tres repeticiones técnicas. ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

8. Discusión

Los procesos fisiológicos y moleculares que se desencadenan después de una quemadura ya se han descrito y están bien documentados; sin embargo, cómo es que se monta y regula la respuesta inflamatoria sigue teniendo algunos cabos sueltos, tales como, la vía detallada de regulación y retroalimentación de las señales que regulan los procesos pro y anti-inflamatorios, la regulación de la homeostasis de los procesos inflamatorios y la regulación del vínculo de la respuesta inmune innata y adaptativa (6-8).

En la actualidad se sabe que la epigenética es un importante regulador transcripcional, el cual responde de manera rápida y concreta ante estímulos externos, como es el caso de las quemaduras. Es por ello por lo que, en este proyecto de investigación, analizamos las alteraciones en los niveles de las modificaciones postraduccionales de la histona H3 asociada a promotores de genes inflamatorios. Esto nos ayudará a entender la importancia e impacto que las modificaciones postraduccionales pueden tener para el desarrollo de una respuesta inmune controlada o bien, para dirigirla a una respuesta alterada, la cual, podría dar lugar a alteraciones tales como el desarrollo de sepsis.

Las marcas de activación H3K4me3 y H3S28ph están disminuidas en respuesta a quemaduras en casi todos los promotores de genes de inflamación analizados durante los primeros 10 dpb (**Tabla 8**). Las marcas H3K4me3 y H3S28ph se han asociado con activación de la transcripción, ya que la trimetilación de lisina 4 en la histona H3 es una modificación clave que está involucrada en la regulación transcripcional debido a que se encuentra cerca de los Sitios de Inicio de la Transcripción (TSS) y, por otro lado, la fosforilación de serina 28 en la histona H3 contrarresta el silenciamiento del complejo Polycomb mediante la disociación del complejo en respuesta a algunas señales externas (39, 45). En nuestro trabajo, los niveles disminuidos de estas marcas se contraponen con los niveles aumentados de la expresión de estos genes en respuesta a quemaduras, lo que nos lleva a pensar que estas marcas son sustituidas por otras marcas de activación específicas del estímulo, como podría ser la H3K27ac, ya que se sabe que actúa en procesos inflamatorios y es afectada por la marca adyacente H3S28ph. Previamente, Kimball y colaboradores (2017), también reportaron que a pesar de una disminución de la marca H3K4me3, se presentaba un aumento en la expresión de IL-1 β y TNF- α en monocitos de pacientes con diabetes mellitus (DM), lo cual refuerza la hipótesis que existen procesos y marcas epigenéticas específicos que sustituyen y regulan la activación de la transcripción en pacientes con inflamación (52).

Otra de las marcas asociadas con activación transcripcional es H3K27me1 (48). Nosotros observamos que en 1 dpq, esta marca está disminuida en todos los genes de inflamación analizados, pero a partir del día 5, se encuentra diferencialmente enriquecida en algunos genes (**Tabla 8**). Por ejemplo, en el promotor de TNF- α e IL-17, la marca H3K27me1 se encuentra aumentada desde el día 5. Estos genes participan en respuesta inflamatoria causada por infecciones fúngicas o bacterianas (60). El aumento de H3K27me1, sugiere que esta mono metilación tiene un papel importante en el mantenimiento de los niveles de expresión

transcripcional de TNF- α e IL-17 a los 5 y 10 dpb, probablemente aumentando en respuesta al inicio del establecimiento de posibles procesos infecciosos.

H3K9me2 es una marca de represión que se ha reportado ampliamente distribuida en la eucromatina (42). Interesantemente, esta marca de represión se encontró disminuida a 1 dpb (**Tabla 8**), probablemente como parte de los mecanismos que permiten el rápido cambio del estado transcripcional de estos genes hacia un estado activo cuando hay un estímulo inflamatorio.

Por otra parte, si bien como se mencionó previamente, en términos generales las marcas analizadas tienden a disminuir en respuesta a quemaduras, nosotros quisimos analizar si había diferencias entre los pacientes que desarrollaron sepsis y los que no desarrollaron sepsis. Debido a que los pacientes que desarrollaron sepsis fueron diagnosticados entre 6 y 12 dpq, los días 1 y 5 constituyen una etapa previa al desarrollo de sepsis (**Tabla 3**) y podrían ayudarnos a comprender factores epigenéticos involucrados en el desarrollo y/o predisposición al desarrollo de sepsis.

En general, la mayoría de las diferencias encontradas fueron en las marcas de activación. En 1 dpq, en la mayoría de los casos se observaron niveles aumentados de enriquecimiento de estas PTMs en los promotores de pacientes que desarrollaron sepsis (**Tabla 9**). Esto podría significar que la disminución tan marcada de estas PTMs de activación (H3S28ph, H3K4me3 y H3K27me1) en respuesta a quemaduras, es necesaria para mejorar el pronóstico de los pacientes y evitar el desarrollo de sepsis. Así, una disminución en menor grado podría generar susceptibilidad al desarrollo de sepsis.

Interesantemente, en 5 dpq, varias de estas PTMs cambian sus niveles y disminuye su enriquecimiento en estos mismos promotores de pacientes que desarrollan sepsis. Lo anterior podría formar parte de un mecanismo encaminado a controlar estas alteraciones, y llevar los niveles de las PTMs hacia los mismos niveles que se observan en el grupo de no sepsis.

Finalmente, a 10 dpq, cuando en la mayoría de los pacientes del grupo de sepsis ya se ha establecido el diagnóstico, solo hay niveles diferenciales en las marcas S28ph y K27me1. Se ha reportado que la marca S28ph es una marca epigenética implicada en la respuesta a estrés, promoviendo el desplazamiento del complejo Polycomb en la marca adyacente H3K27me3, promoviendo el aumento de acetilación en K27me1. Lo anterior, es consistente con nuestro hallazgo de estas alteraciones en respuesta a sepsis establecida, lo que indica su papel en el restablecimiento de la condición de los pacientes, tratando de contrarrestar el proceso de sepsis.

Tabla 8. Modelo epigenético para el grupo pacientes contra individuos sanos

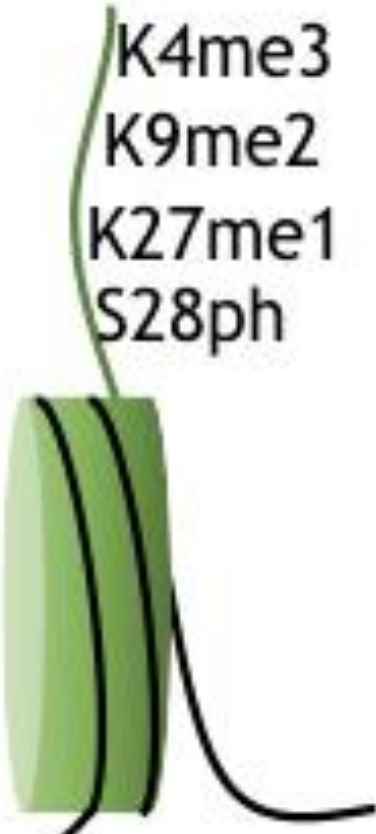
























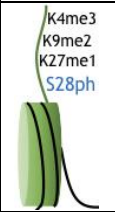

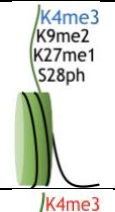


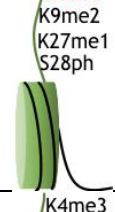












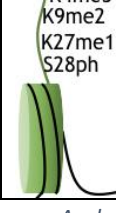
Control	Pacientes			
	Gen	Día 1	Día 5	Día 10
 <p>K4me3 K9me2 K27me1 S28ph</p>	IL-6			
	IL-1 β			
	TNF- α			
	IL-17			
	IL-8			
	c-Fos			
	miR-21			
	<p>Negro: niveles de la marca en el grupo control (sano), Rojo: niveles disminuidos de la marca y Azul: niveles aumentados de la marca en el grupo de pacientes comparado con el grupo control para las regiones promotoras de genes asociados a inflamación.</p>			

Tabla 9. Modelo epigenético para el grupo sepsis contra el grupo no sepsis.

Control	Sepsis			
	Gen	Día 1	Día 5	Día 10
	IL-6			
	IL-1 β			
	TNF- α			
	IL-17			
	IL-8			
	c-Fos			
	miR-21			

Negro: niveles de la marca en el grupo control (no sepsis), Rojo: niveles disminuidos de la marca y Azul: niveles aumentados de la marca en el grupo de sepsis comparado con el grupo no sepsis para las regiones promotoras de genes asociados a inflamación.

9. Conclusiones

En este proyecto se demostró que existe un perfil diferencial de las marcas H3K4me3, H3K9me2, H3S28ph y H3K27me1 en las regiones promotoras de los genes IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-17, IL-8, c-Fos y miR-21 en linfocitos de pacientes con quemaduras graves y pacientes que desarrollaron o no sepsis a 1, 5 y 10 días post-quemadura.

Agrupando nuestros resultados, proponemos un modelo epigenético para cada región promotora de genes asociados a inflamación para tener un panorama general de la regulación dada por las PTMs.

10. Perspectivas

Se propone realizar estudios en células THP-1 o Jurkat retadas con polisacárido para inducir una respuesta inflamatoria en condiciones reguladas, lo cual nos ayudara a determinar de manera mucho mas precisa cuales son las marcas epigenéticas que están presentes durante y después del desarrollo de sepsis.

Asimismo, se propone realizar un modelo de mutación para H3S28ph, el cual consiste en generar mutantes para S28 las cuales induzcan un alta en la fosforilación y, por otro lado, mutantes que eviten la fosforilación. Este experimento ayudaría a dilucidar el papel que tiene H3S28ph en el proceso de protección de las células ante estímulos como la inflamación o sepsis.

11. Anexos

Anexo 1. Cartas de consentimiento informado

Carta de consentimiento informado (Pacientes con quemaduras)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F., a ____ de _____ de ____

A quién corresponda:

A través de esta carta se le invita a participar en un protocolo de investigación médica que se lleva a cabo en el Laboratorio de Medicina Genómica del Ceníaq, en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Dicho trabajo de investigación se titula "**Identificación de alteraciones epigenéticas a nivel sistémico en el paciente quemado**" y se encuentra a cargo de la Dra. María del Rocío Suárez Sánchez, Investigadora en Ciencias Médicas del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Justificación y objetivo del protocolo de investigación médica. Cuando ocurre una quemadura se activan mecanismos celulares y moleculares que propician la respuesta inflamatoria tanto en el sitio de la lesión como en el resto del cuerpo, lo que puede llevar a la falla de múltiples órganos, tales como hígado, riñón, pulmón, cerebro, corazón, etc. Asimismo, el organismo reacciona con el fin de contrarrestar los efectos producidos por la quemadura. Estas alteraciones incluyen cambios en la expresión de genes y cambios en las concentraciones de muchas sustancias. Por ejemplo, se ha visto que el óxido nítrico aumenta sus niveles en sangre ante una lesión por quemadura severa. El óxido nítrico utiliza mecanismos conocidos como epigenéticos para modular la expresión de genes. Por esta razón, en este proyecto se plantea estudiar los cambios en la regulación epigenética en linfocitos de sangre periférica provocados por los niveles aumentados de óxido nítrico en sangre de pacientes con quemadura severa. Esto contribuirá a explicar las múltiples alteraciones que ocurren en los pacientes con quemaduras severas, lo que llevará a proponer alternativas terapéuticas que permitan controlar la respuesta inflamatoria sistémica producida por estas lesiones graves.

Procedimiento. En caso de aceptar, la participación consistirá en la donación de tres muestras de sangre periférica en los días 1, 5 y 10 post-quemadura (aproximadamente 4 ml de sangre cada una) de la vena de un brazo, bajo las medidas de seguridad e higiene establecidas por las normas internacionales. El riesgo asociado a este procedimiento es mínimo y consiste solo en la posible aparición de un moretón temporal en el sitio de la punción. Todos los materiales que se utilicen para la toma de muestra son nuevos y estériles y serán abiertos en presencia del paciente. La muestra de sangre será cuidadosamente resguardada en el Laboratorio de Medicina Genómica del CENIAQ en el Instituto Nacional de Rehabilitación,

y su identidad estará protegida usando números de folios en lugar de su nombre. El material obtenido a partir de sus muestras será empleado solamente para fines de investigación y los resultados y los productos obtenidos no serán usados con fines de lucro. Asimismo, con la firma de este documento se solicita autorización para el uso de la información y material derivado de esta investigación con fines de difusión, y se solicita el consentimiento para emplear las muestras biológicas en futuros estudios manteniendo siempre la confidencialidad de los datos del paciente.

La participación en el estudio es voluntaria y podrá retirarse del protocolo en el momento que lo desee o negarse a participar sin que ello demerite de ninguna manera en la calidad de la atención hospitalaria que recibe en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Asimismo, los investigadores involucrados en el estudio se comprometen a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda acerca de los procedimientos que se lleven a cabo (tel. 59991000 ext 14710, Dra. María del Rocío Suárez Sánchez, Laboratorio de Medicina Genómica, 6° piso del Ceniaq, Instituto Nacional de Rehabilitación; tel. 59991000 ext 14710, Dr. Oscar Hernández Hernández, Laboratorio de Medicina Genómica, 6° piso del Ceniaq, Instituto Nacional de Rehabilitación).

Si bien los beneficios directos derivados de su participación en este protocolo de investigación pudieran no ser inmediatos, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento y para el mejor entendimiento de los procesos que ocurren ante una lesión por quemadura severa, lo que en un futuro ayudará a proponer alternativas terapéuticas. La participación en este estudio no generará ninguna compensación económica, ni tampoco implicará ningún gasto por parte del participante.

En el caso de pacientes menores de edad o bien de personas con alguna incapacidad legal para tomar la decisión de participar en el estudio, se solicitará la firma del padre o tutor. Adicionalmente, se solicitará la firma y datos de al menos dos testigos, y el consentimiento informado se extenderá por duplicado para entregar un ejemplar al participante.

Participante:

Firma: _____

Nombre: _____

Datos de contacto: _____

Fecha: _____

- En caso de padre o tutor:

○ Relación con el participante: _____

○ Razón por la firma de padre o tutor: _____

Testigo 1:

Firma: _____

Nombre: _____

Datos de contacto: _____

Relación con el participante: _____

Fecha: _____

Testigo 2:

Firma: _____

Nombre: _____

Datos de contacto: _____

Relación con el participante: _____

Fecha: _____

Investigador Responsable:

Firma: _____

Nombre: _____

Datos de contacto: _____

Fecha: _____

Carta de consentimiento informado (Individuos sanos)

CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F., a ____ de _____ de ____

A quién corresponda:

A través de esta carta se le invita a participar en un protocolo de investigación médica que se lleva a cabo en el Laboratorio de Medicina Genómica del Ceníaq, en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Dicho trabajo de investigación se titula "**Identificación de alteraciones epigenéticas a nivel sistémico en el paciente quemado**" y se encuentra a cargo de la Dra. María del Rocío Suárez Sánchez, Investigadora en Ciencias Médicas del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Justificación y objetivo del protocolo de investigación médica. Cuando ocurre una quemadura se activan mecanismos celulares y moleculares que propician la respuesta inflamatoria tanto en el sitio de la lesión como en el resto del cuerpo, lo que puede llevar a la falla de múltiples órganos, tales como hígado, riñón, pulmón, cerebro, corazón, etc. Asimismo, el organismo reacciona con el fin de contrarrestar los efectos producidos por la quemadura. Estas alteraciones incluyen cambios en la expresión de genes y cambios en las concentraciones de muchas sustancias. Por ejemplo, se ha visto que el óxido nítrico aumenta sus niveles en sangre ante una lesión por quemadura severa. El óxido nítrico utiliza mecanismos conocidos como epigenéticos para modular la expresión de genes. Por esta razón, en este proyecto se plantea estudiar los cambios en la regulación epigenética en linfocitos de sangre periférica provocados por los niveles aumentados de óxido nítrico en sangre de pacientes con quemadura severa. Esto contribuirá a explicar las múltiples alteraciones que ocurren en los pacientes con quemaduras severas, lo que llevará a proponer alternativas terapéuticas que permitan controlar la respuesta inflamatoria sistémica producida por estas lesiones graves.

Procedimiento. En caso de aceptar, la participación consistirá en la donación de una muestra de sangre periférica (aproximadamente 4 ml de sangre) de la vena de un brazo, bajo las medidas de seguridad e higiene establecidas por las normas internacionales. El riesgo asociado a este procedimiento es mínimo y consiste solo en la posible aparición de un moretón temporal en el sitio de la punción. Todos los materiales que se utilicen para la toma de muestra son nuevos y estériles y serán abiertos en presencia del paciente. La muestra de sangre será cuidadosamente resguardada en el Laboratorio de Medicina Genómica del CENIAQ en el Instituto Nacional de Rehabilitación, y su identidad estará protegida usando números de folios en lugar de su nombre. El material obtenido a partir de sus muestras será empleado solamente para fines de investigación y los resultados y los productos obtenidos no serán usados con fines de lucro. Asimismo, con la firma de este documento se solicita autorización para el uso de la información y material derivado de esta investigación con fines de difusión, y se solicita el consentimiento para emplear las muestras biológicas en futuros estudios manteniendo siempre la confidencialidad de los datos del paciente.

La participación en el estudio es voluntaria y podrá retirarse del protocolo en el momento que lo desee o negarse a participar. Asimismo, los investigadores involucrados en el estudio se comprometen a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda acerca de los procedimientos que se lleven a cabo (tel. 59991000 ext 14710, Dra. María del Rocío Suárez Sánchez, Laboratorio de Medicina Genómica, 6° piso del Ceniaq, Instituto Nacional de Rehabilitación; tel. 59991000 ext 14710, Dr. Oscar Hernández Hernández, Laboratorio de Medicina Genómica, 6° piso del Ceniaq, Instituto Nacional de Rehabilitación).

Si bien los beneficios directos derivados de su participación en este protocolo de investigación pudieran no ser inmediatos, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento y para el mejor entendimiento de los procesos que ocurren ante una lesión por quemadura severa, lo que en un futuro ayudará a proponer alternativas terapéuticas. La participación en este estudio no generará ninguna compensación económica, ni tampoco implicará ningún gasto por parte del participante.

En el caso de pacientes menores de edad o bien de personas con alguna incapacidad legal para tomar la decisión de participar en el estudio, se solicitará la firma del padre o tutor. Adicionalmente, se solicitará la firma y datos de al menos dos testigos, y el consentimiento informado se extenderá por duplicado para entregar un ejemplar al participante.

Participante:

Firma: _____

Nombre: _____

Datos de contacto: _____

Fecha: _____ - En caso de padre o tutor:

○ Relación con el participante: _____

○ Razón por la firma de padre o tutor: _____

Testigo 1:

Firma: _____

Nombre: _____

Datos de contacto: _____

Relación con el participante: _____

Fecha: _____

Testigo 2:

Firma: _____

Nombre: _____

Datos de contacto: _____

Relación con el participante: _____

Fecha: _____

Investigador Responsable:

Firma: _____

Nombre: _____

Datos de contacto: _____

Fecha: _____

12. Referencias

1. Moctezuma-Paz, L.E. Epidemiología de las quemaduras en México. *Rev Esp Méd Quir.* 2015;20.
2. Quemaduras Organización Mundial de la Salud 2017 [Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/es/>].
3. Evers LH, Bhavsar D, Mailänder P. The biology of burn injury. *Experimental Dermatology.* 2010;19(9):777-83.
4. Marieb EN, Hoehn KN, Mitchell SJ, Hutchinson M, Mallatt J. *Human Anatomy and Physiology with MasteringA&P with Laboratory Manual: Benjamin-Cummings Publishing Company;* 2012.
5. Gravante G, Palmieri MB, Esposito G, Delogu D, Santeusano G, Filingeri V, et al. Apoptotic death in deep partial thickness burns vs. normal skin of burned patients. *Journal of Surgical Research.* 2007;141(2):141-5.
6. Friedl HP, Till GO, Trentz O, Ward PA. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. *The American journal of pathology.* 1989;135(1):203.
7. Chen LW, Hsu CM, Wang JS, Chen JS, Chen SC. Specific inhibition of iNOS decreases the intestinal mucosal peroxynitrite level and improves the barrier function after thermal injury. *Burns.* 1998;24(8):699-705.
8. Hur J, Yang HT, Chun W, Kim J-H, Shin S-H, Kang HJ, et al. Inflammatory cytokines and their prognostic ability in cases of major burn injury. *Annals of laboratory medicine.* 2015;35(1):105-10.
9. Finnerty CC, Herndon DN, Przkora R, Pereira CT, Oliveira HM, Queiroz DM, et al. Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients. *Shock.* 2006;26(1):13-9.
10. Mikhal'chik E, Piterskaya J, Budkevich L, Pen'kov LY, Facchiano A, De Luca C, et al. Comparative study of cytokine content in the plasma and wound exudate from children with severe burns. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2009;148(5):771-5.
11. Jeschke MG, Gauglitz GG, Kulp GA, Finnerty CC, Williams FN, Kraft R, et al. Long-term persistence of the pathophysiologic response to severe burn injury. *PloS one.* 2011;6(7):e21245.
12. Davis CS, Janus SE, Mosier MJ, Carter SR, Gibbs JT, Ramirez L, et al. Inhalation injury severity and systemic immune perturbations in burned adults. *Annals of surgery.* 2013;257(6):1137.
13. Gabriel VA. Transforming growth factor- β and angiotensin in fibrosis and burn injuries. *Journal of burn care & research.* 2009;30(3):471-81.
14. Satoh Y, Saitoh D, Takeuchi A, Ojima K, Kouzu K, Kawakami S, et al. ERK2 dependent signaling contributes to wound healing after a partial-thickness burn. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2009;381(1):118-22.
15. Huang Y, Min S, Lui Y, Sun J, Su X, Liu Y, et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals chromatin state-based regulation of human monocyte-derived dendritic cells in different environments. *Genes and immunity.* 2012;13(4):311.
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition: Taylor & Francis Group;* 2014.
17. Kidd CDA, Thompson PJ, Barrett L, Baltic S. Histone Modifications and Asthma. The Interface of the Epigenetic and Genetic Landscapes. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2016;54(1):3-12.
18. Yagi S, Hirose M, Shiota K. DNA Methylation Profile: A Composer-, Conductor-, and Player-Orchestrated Mammalian Genome Consisting of Genes and Transposable Genetic Elements. *Journal of Reproduction and Development.* 2012;58(3):265-73.

19. Neary R, Watson CJ, Baugh JA. Epigenetics and the overhauling wound: the role of DNA methylation in fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2015;8:18.
20. Chen T, Li E. Structure and Function of Eukaryotic DNA Methyltransferases. *Current Topics in Developmental Biology*. 60: Academic Press; 2004. p. 55-89.
21. Forte A, Galderisi U, Cipollaro M, De Feo M, Corte Alessandro D. Epigenetic regulation of TGF- β signalling in dilative aortopathy of the thoracic ascending aorta. *Clinical Science*. 2016;130(16):1389-405.
22. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(30):10513-8.
23. Dakhlallah D, Batte K, Wang Y, Cantemir-Stone CZ, Yan P, Nuovo G, et al. Epigenetic regulation of miR-17~92 contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(4):397-405.
24. Montes AMS, Rodríguez ASS, Borunda JSA. *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2016.
25. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
26. Krishna SM, Dear AE, Norman PE, Golledge J. Genetic and epigenetic mechanisms and their possible role in abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2010;212(1):16-29.
27. Arnaudo AM, Garcia BA. Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics & chromatin*. 2013;6(1):24.
28. Kouzarides T. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell*. 2007;131(4):822.
29. Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(26):14967-72.
30. Sawicka A, Seiser C. Sensing core histone phosphorylation - a matter of perfect timing. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(8):711-8.
31. Latham JA, Dent SYR. Cross-regulation of histone modifications. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2007;14(11):1017.
32. Barth TK, Imhof A. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(11):618-26.
33. Kundu TK. *Epigenetics: Development and Disease*: Springer Netherlands; 2012.
34. Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nature immunology*. 2003;4(7):616-23.
35. Baguet A, Bix M. Chromatin landscape dynamics of the Il4–Il13 locus during T helper 1 and 2 development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(31):11410-5.
36. Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 2007;447(7147):972-8.
37. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(5):295.
38. Cintora C. Tesis de Licenciatura. En proceso.
39. Shilatifard A. The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annual review of biochemistry*. 2012;81:65-95.
40. Lauberth SM, Nakayama T, Wu X, Ferris AL, Tang Z, Hughes SH, et al. H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell*. 2013;152(5):1021-36.
41. Yung PYK, Stuetzer A, Fischle W, Martinez A-M, Cavalli G. Histone H3 serine 28 is essential for efficient polycomb-mediated gene repression in Drosophila. *Cell reports*. 2015;11(9):1437-45.

42. Kind J, Pagie L, Ortazokoyun H, Boyle S, de Vries SS, Janssen H, et al. Single-cell dynamics of genome-nuclear lamina interactions. *Cell*. 2013;153(1):178-92.
43. Timp W, Feinberg AP. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nature Reviews Cancer*. 2013;13(7):497.
44. Grigoryev SA, Bulyanko YA, Popova EY. The end adjusts the means: heterochromatin remodelling during terminal cell differentiation. *Chromosome research*. 2006;14(1):53-69.
45. Gehani SS, Agrawal-Singh S, Dietrich N, Christophersen NS, Helin K, Hansen K. Polycomb group protein displacement and gene activation through MSK-dependent H3K27me3S28 phosphorylation. *Molecular cell*. 2010;39(6):886-900.
46. Lau PNI, Cheung P. Histone code pathway involving H3 S28 phosphorylation and K27 acetylation activates transcription and antagonizes polycomb silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(7):2801-6.
47. Sawicka A, Hartl D, Goiser M, Pusch O, Stocsits RR, Tamir IM, et al. H3S28 phosphorylation is a hallmark of the transcriptional response to cellular stress. *Genome research*. 2014;24(11):1808-20.
48. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007;129(4):823-37.
49. Bonenfant D, Towbin H, Coulot M, Schindler P, Mueller DR, Van Oostrum J. Analysis of dynamic changes in post-translational modifications of human histones during cell cycle by mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007;6(11):1917-32.
50. Chen X, El Gazzar M, Yoza BK, McCall CE. The NF-kappaB factor RelB and histone H3 lysine methyltransferase G9a directly interact to generate epigenetic silencing in endotoxin tolerance. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(41):27857-65.
51. Cordero-Herrera I, Chen X, Ramos S, Devaraj S. (-)-Epicatechin attenuates high-glucose-induced inflammation by epigenetic modulation in human monocytes. *European journal of nutrition*. 2017;56(3):1369-73.
52. Kimball AS, Joshi A, Carson WF, Boniakowski AE, Schaller M, Allen R, et al. The histone methyltransferase MLL1 directs macrophage-mediated inflammation in wound healing and is altered in a murine model of obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2017;66(9):2459-71.
53. Li X, Zhang Q, Shi Q, Liu Y, Zhao K, Shen Q, et al. Demethylase Kdm6a epigenetically promotes IL-6 and IFN- β production in macrophages. *Journal of autoimmunity*. 2017;80:85-94.
54. What is an inflammation? : IQWiG (Institute for Quality and Efficiency in Health Care); 2010.
55. Salminen A, Kaarniranta K, Hiltunen M, Kauppinen A. Histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3/KDM6B) at the nexus of epigenetic regulation of inflammation and the aging process. *Journal of molecular medicine*. 2014;92(10):1035-43.
56. ChIP Analysis: Thermo Fisher Scientific; [Available from: <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/chromatin-remodeling/chromatin-immunoprecipitation-chip/chip-analysis.html>].
57. Bekkering S, van den Munckhof I, Nielen T, Lamfers E, Dinarello C, Rutten J, et al. Innate immune cell activation and epigenetic remodeling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo. *Atherosclerosis*. 2016;254:228-36.
58. Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, et al. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(1):169-83.
59. Rios E, Szczesny B, Soriano FG, Olah G, Szabo C. Hydrogen sulfide attenuates cytokine production through the modulation of chromatin remodeling. *International journal of molecular medicine*. 2015;35(6):1741-6.

60. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(4):1397-411.

13. FRASE CESION DERECHOS

Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. **El trabajo experimental (experimental, programa de cómputo, teórico) fue realizado de agosto-2017 (mes-año) al diciembre-2019 (mes-año) en laboratorios del DCN de la DCNI**

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 9 del mes enero del año 2020, el (la) que suscribe **Juan Osvaldo Arias Pérez** alumno (a) del Programa de **Maestría** en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor (a) intelectual de la presente idónea comunicación de resultados titulada; **“Evaluación de marcas epigenéticas en linfocitos de pacientes con quemaduras”** realizada bajo la dirección de **Dra. María del Rocío Suárez Sánchez** y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del (la) director (a) del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: **suarezmrocio@gmail.com**

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Juan Osvaldo Arias Pérez

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, **Juan Osvaldo Arias Pérez**, alumno del Programa de **Maestría** en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta Idónea Comunicación De Resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



Juan Osvaldo Arias Pérez

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, **Juan Osvaldo Arias Pérez** alumno del Programa de **Maestría** en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y **Juan Osvaldo Arias Pérez**.



Juan Osvaldo Arias Pérez

Nombre y firma del alumno