



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN
GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A
QUEMADURAS SEVERAS”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
THELMA ESCOBEDO TAPIA

MÉXICO, CDMX

2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Sobeida Sánchez Nieto

Vocal: Enrique Ortega Soto

Secretario: María del Rocío Suárez Sánchez

1er Suplente: Javier Andrés Juárez Díaz

2° Suplente: Ismael Mancilla Herrera

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Laboratorio de Medicina Genómica, Instituto Nacional de Rehabilitación (INR, Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados «CENIAQ»).

Asesor del tema:
María del Rocío Suárez Sánchez

Sustentante:
Thelma Escobedo Tapia

Este proyecto se realizó con la ayuda del financiamiento por CONACyT (Proyecto Salud-2014-01-233832) en el Laboratorio de Medicina Genómica del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) bajo la dirección de la Dra. María del Rocío Suárez Sánchez.

Tabla de contenido

Marco teórico	9
1. Quemaduras.....	9
1.1 Definición.....	9
1.2 Etiología de las quemaduras	9
1.3 Incidencia y factores de riesgo	10
1.4 Clasificación	11
1.4.1 Grados de quemadura.....	11
1.4.2 Porcentaje de superficie corporal quemada (%SCQ).....	13
1.5 Respuesta local.....	14
1.6 Respuesta sistémica	16
1.6.1 Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica	18
1.6.2 Síndrome de Respuesta Compensatoria Antiinflamatoria	18
1.6.3 Sepsis	19
1.6.4 Dinámica de la respuesta inflamatoria.....	20
1.6.5 Implicaciones de las quemaduras a nivel sistémico.....	21
2. Estructura de la cromatina	24
2.1 Empaquetamiento del DNA.....	24
3. Epigenética.....	25

3.1	Metilación del DNA	26
3.2	RNAs no codificantes (ncRNAs)	27
3.3	Modificaciones postraduccionales de las histonas	28
3.3.1	Metilación de histonas	29
3.3.2	Acetilación de histonas	30
3.3.3	Fosforilación de histonas	31
3.4	Epigenética e inflamación	31
	Antecedentes	34
	Justificación	36
	Objetivos	37
	Métodos	38
	Resultados	48
	Discusión	56
	Conclusiones	64
	Perspectivas	65
	Anexos	66
	Referencias	74

Índice de figuras

<i>Figura 1. Mapa conceptual de los agentes causales de las quemaduras.</i>	9
<i>Figura 2. Clasificación con base en la profundidad de las quemaduras.</i>	12
<i>Figura 3. Extensión de una quemadura.</i>	13
<i>Figura 4. Zonas de lesión por la quemadura.</i>	15
<i>Figura 5. Activación del sistema inmune y las implicaciones a nivel sistémico a causa de las lesiones por quemaduras severas.</i>	20
<i>Figura 6. Respuesta pro y antiinflamatoria después de una lesión grave.</i>	21
<i>Figura 7. Cambios fisiopatológicos debidos al daño por quemadura.</i>	23
<i>Figura 8. Mecanismos epigenéticos: metilación del DNA, modificaciones de histonas y RNAs no codificantes.</i>	26
<i>Figura 9. Efecto de las modificaciones epigenéticas en la accesibilidad de la cromatina.</i>	29
<i>Figura 10. Heat Map de los valores de las 21 PTMs para H3 y 10 PTMs para H4.</i>	35
<i>Figura 11. Representación de la separación de células mononucleares con LymphoprepTM.</i>	40
<i>Figura 12. Diagrama de flujo del ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).</i>	41
<i>Figura 13. Reversión de entrecruzamiento y optimización de sonicación.</i>	50
<i>Figura 14. Optimización de las condiciones de inmunoprecipitación de la cromatina.</i>	51
<i>Figura 15. Estudio de marcas epigenéticas en el promotor de IL-1β.</i>	52
<i>Figura 16. Estudio de marcas epigenéticas en el promotor de IL-6.</i>	54
<i>Figura 17. Determinación de marcas de histonas en el promotor de diferentes genes.</i>	55
<i>Figura 18. Alteraciones epigenéticas en loci específicos debido a quemaduras severas.</i>	63
<i>Figura 19. Melt curves de IL- 1β.</i>	71
<i>Figura 20. Melt curves de IL-6.</i>	71

<i>Figura 21. Melt curves de IL-17a.</i>	72
<i>Figura 22. Melt curves de TNF-α.</i>	72
<i>Figura 23. Melt curves de cFos.</i>	72
<i>Figura 24. Melt curves de miR-21.</i>	73
<i>Figura 25. Melt curves de IL-8.</i>	73

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Citocinas y sus principales efectos biológicos.</i>	17
<i>Tabla 2. Características de los pacientes con quemaduras.</i>	38
<i>Tabla 3. Condiciones de sonicación utilizadas para la inmunoprecipitación de cromatina.</i>	42
<i>Tabla 4. Anticuerpos utilizados durante la inmunoprecipitación de la cromatina.</i>	44
<i>Tabla 5. Reactivos utilizados para realizar la reacción de qPCR.</i>	46
<i>Tabla 6. Programa utilizado en la cuantificación (qPCR) para oligonucleótidos con $T_m \geq 60^\circ\text{C}$.</i>	46
<i>Tabla 7. Programa utilizado en la cuantificación (qPCR) para oligonucleótidos con $T_m < 60^\circ\text{C}$.</i>	46
<i>Tabla 8. Características de los oligonucleótidos utilizados para la qPCR.</i>	47
<i>Tabla 9. Demografía y datos clínicos de los pacientes con quemadura y controles.</i>	48
<i>Tabla 10. Programa de termociclado para las curvas de disociación.</i>	73

Resumen

Las quemaduras severas pueden conducir a una inflamación sistémica, mediada principalmente por leucocitos, a través de la producción de citocinas. En modelos de inflamación se ha reportado que la regulación de la expresión de las citocinas puede ser mediada por modificaciones postraduccionales (PTMs) de histonas. Previamente, en el laboratorio de Medicina Genómica del CENIAQ-INR se demostró un cambio en el perfil de PTMs de histonas en pacientes con quemaduras severas respecto a sujetos sanos. Por lo que, en este trabajo se plantea establecer posibles implicaciones de estas marcas epigenéticas en la modulación de la expresión de genes implicados en la respuesta a quemaduras severas.

El estudio fue de casos y controles y en él se reclutaron 12 pacientes con quemaduras severas y 6 controles. Se tomaron muestras de sangre periférica a 1 día post-quemadura y se hizo la separación de leucocitos. El análisis de los cambios epigenéticos se efectuó por medio de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) cuantificando con qPCR para determinar los porcentajes de cada marca de histona que se encontraban unidos al promotor en estudio.

Los ensayos de ChIP en los leucocitos de pacientes con quemaduras severas mostraron una disminución significativa de H3K9me2 en los promotores de IL-1 β , IL-17a e IL-8 y sin diferencias en el gen de IL-6. La H3S28p mostró sólo un aumento significativo en el promotor de c-Fos y no así para miR-21 e IL-6. Por otro lado, se presentó una disminución significativa de H3K27me3 en IL-6 pero no en IL-1 β . Y finalmente, para la marca H3K4me3 no hubo cambios significativos en los promotores de IL-1 β , IL-6 y TNF- α .

Por lo tanto, en este trabajo se muestran las primeras determinaciones de alteraciones epigenéticas por quemaduras en *loci* específicos en leucocitos circulantes.

Marco teórico

1. Quemaduras

1.1 Definición

Una quemadura se define como el daño a la piel o a otros tejidos causado por la liberación de energía producida por distintos agentes. El daño debido a una quemadura es variable en cuanto a la severidad y el tejido dañado, por lo que las quemaduras pueden provocar un conjunto de fenómenos fisiopatológicos tanto a nivel local como sistémico (Evers, Bhavsar, & Mailänder, 2010; Secretaría de Salud/STCONAPRA, 2016).

1.2 Etiología de las quemaduras

En la actualidad están identificadas diversas causas que provocan una quemadura, las cuales pueden ser de su naturaleza física, química o biológica (Figura 1).

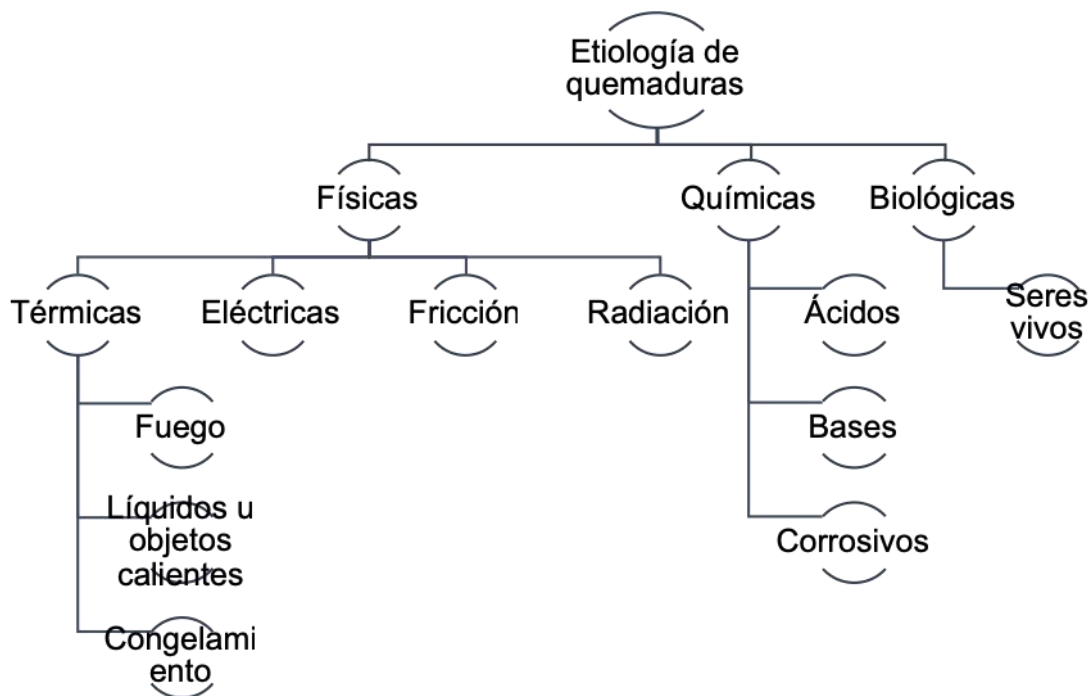


Figura 1. Mapa conceptual de los agentes causales de las quemaduras.

1.3 Incidencia y factores de riesgo

Las quemaduras representan un problema de salud público a nivel mundial, siendo el cuarto tipo de trauma después de los accidentes de tránsito, las caídas y la violencia interpersonal. Se estima que a nivel mundial ocurren 180,000 muertes anualmente debido a lesiones por quemadura, mientras que, las quemaduras que no son mortales causan una importante tasa de morbilidad, que incluye una hospitalización prolongada, programas de rehabilitación, discapacidad, así como, secuelas en la apariencia que genera comúnmente un rechazo y, por lo tanto, daño psicológico (Abdullahi et al., 2017; World Health Organization, 2018).

De acuerdo a una revisión epidemiológica de quemaduras en México, en el año 2014, la incidencia nacional de quemaduras fue de 55 casos por cada 100,000 habitantes, mientras que, las quemaduras severas ocurren en una tasa de 5 por cada 100,000 habitantes. Además, se estima que los costos de la atención médica de un paciente quemado varían de \$30,000 a \$500,000 MXN en casos de severidad leve y hasta 5 a 40 millones de pesos en casos severos (Moctezuma-Paz et al., 2015).

La causa de la quemadura se relaciona íntimamente con la edad, por ejemplo; el 70% de las quemaduras en niños son de tipo escaldadura (líquidos calientes), así mismo, este tipo es frecuente en personas de la tercera edad. En adolescentes la mayoría son por un manejo inadecuado de fuego y líquidos inflamables, mientras que, en adultos el 50% son por flama, las cuales ocurren en una tercera parte aproximadamente, en el ámbito laboral (Evers et al., 2010; Hettiaratchy, 2004).

Por género, las mujeres cuentan con una tasa de muerte mayor en comparación con los hombres, y una de las actividades domésticas como es el pasar más tiempo en la cocina

aumenta el riesgo de sufrir un accidente. Sin embargo, los hombres tienden a sufrir más lesiones por quemaduras que las mujeres (World Health Organization, 2018).

1.4 Clasificación

Las quemaduras son variables en términos del tejido dañado, la profundidad y la extensión, por lo que puede clasificarse en distintos tipos de quemaduras de acuerdo al grado de ésta y al porcentaje de superficie corporal quemada (%SCQ). Así, la sistematización se aplica a un paciente para su diagnóstico, su posterior intervención médica y para estrategias en cuanto a su tratamiento.

1.4.1 Grados de quemadura

Una de las clasificaciones de las quemaduras es con base en la profundidad de la misma, la cual se divide en primero, segundo y tercer grado.

Como se muestra en la Figura 2, las quemaduras de primer grado comprenden daño sólo a nivel de la epidermis. Entre las principales características clínicas de este grado de quemadura están que la lesión se observa entre rosa y roja, no hay ampollas, el dolor es moderado y algunas veces severo, y sanan entre los 3-7 días (Evers et al., 2010).

Las de segundo grado involucran daño por debajo de la epidermis hasta llegar a dañar la dermis y una de las características más importantes es que son muy dolorosas y sensibles al tacto. Éstas a su vez se pueden clasificar en superficiales y profundas. Las superficiales de segundo grado presentan ampolla, tienen una apariencia rojiza y húmeda (el plasma se filtra), el dolor es severo y sana entre 1-3 semanas, mientras que, las profundas tienen una apariencia seca, de color blanca o gris, el dolor es menos severo y sanan en un lapso de 3-6 semanas dejando cicatriz (Oryan, Alemzadeh, & Moshiri, 2017; Evers et al., 2010).

Por su parte, las de tercer grado lesionan todo el espesor de la piel; la epidermis y dermis, llegando incluso hasta el tejido subcutáneo, muscular y óseo, así como a otros órganos. Su apariencia es negra, seca, no presentan dolor, debido a que las terminaciones nerviosas son destruidas, y requieren de injerto de piel para que puedan sanar (Oryan, Alemzadeh, & Moshiri, 2017; Church et al., 2006; Evers et al., 2010).

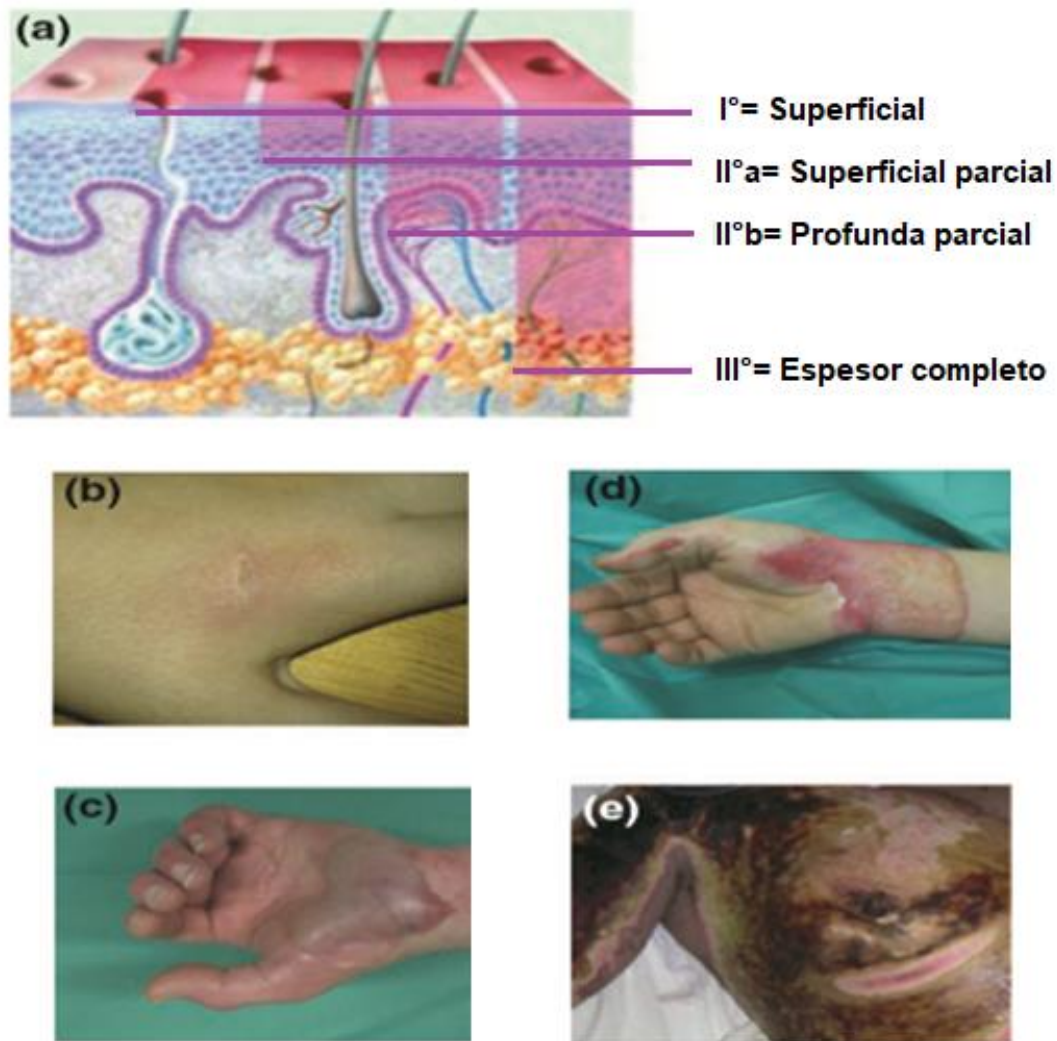


Figura 2. Clasificación con base en la profundidad de las quemaduras. (A) Histología de la piel que ha sufrido quemaduras de distinta magnitud. (B) Primer grado. (C) Segundo grado superficial. (D) Segundo grado profunda. (E) Tercer grado. (Tomada de Evers et al., 2010).

1.4.2 Porcentaje de superficie corporal quemada (%SCQ)

Las quemaduras también se pueden clasificar de acuerdo a otro parámetro conocido como el porcentaje de superficie corporal quemada. Éste consiste en determinar la extensión o el tamaño de la lesión dividiendo el cuerpo humano en diferentes secciones donde a cada área se le asigna un porcentaje y la suma equivale al %SCQ. Uno de los métodos más rápidos y fáciles de usar es la “Regla de los nueve” (Figura 3-A), llamada así porque cada sección es múltiplo de nueve. Sin embargo, por las diferencias anatómicas con los niños, una clasificación más precisa es la de “Lund-Browder” (Church et al., 2006; Evers et al., 2010; Lloyd et al., 2012).

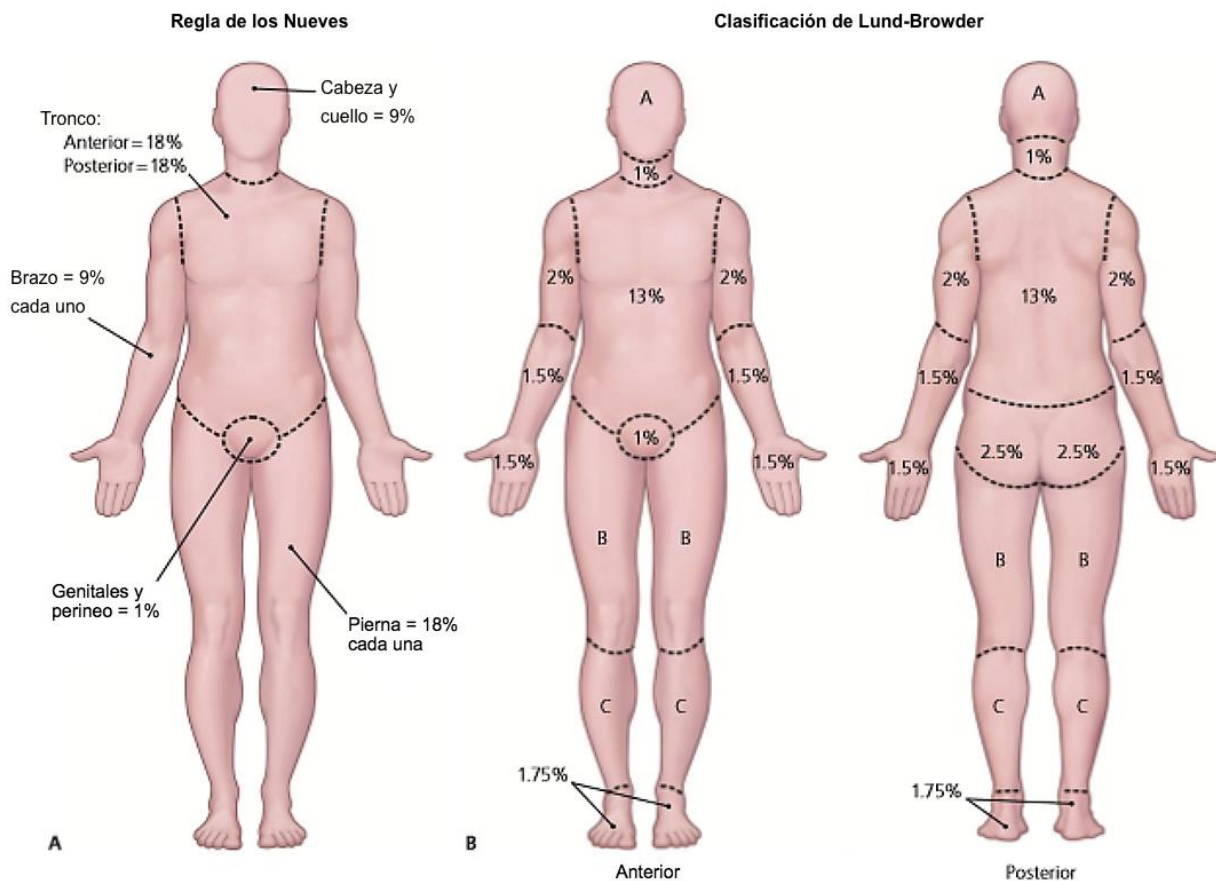


Figura 3. Extensión de una quemadura. (A) Regla de los nueve. (B) Método de Lund-Browder. (Tomada de Lloyd et al., 2012).

Por lo tanto, de acuerdo al grado de profundidad y la extensión de la quemadura se puede determinar si la persona afectada tiene una lesión severa. Entre los criterios para una quemadura severa están quemaduras de segundo grado con más del 25% de la superficie corporal quemada o de tercer grado con al menos el 10% de la superficie corporal afectada (García-Alonso, 1995).

1.5 Respuesta local

Uno de los primeros cambios a causa de una lesión por quemadura es la desnaturalización de las proteínas debido al rompimiento de los enlaces covalentes lo que provoca cambios estructurales en la membrana plasmática de las células (Church et al., 2006). La pérdida de la estabilidad de la membrana provoca que componentes intracelulares salgan de la célula y/o se liberen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Lo anterior, provoca el reclutamiento de diferentes células del sistema inmune donde los neutrófilos son los primeros que se hacen presentes seguidos de los macrófagos/monocitos. Además, y ya que se ha dañado la primera línea de defensa física que es la piel, puede haber invasión de microorganismos, como bacterias presentes en el organismo o que están en el ambiente y lleguen a la lesión. Éstos son reconocidos por las células a través de los receptores de reconocimiento patrón (PRRs) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Todo lo anterior, provoca la activación de vías de señalización río abajo para la secreción de citocinas, proteínas de fase aguda, mediadores neuroendócrinos, así como para la activación del complemento y de la cascada de coagulación (Lenz, Franklin, & Cheadle, 2007; Lord et al., 2014).

Los mediadores locales de la inflamación como histamina, bradicinina y ácido araquidónico causan vasodilatación, aumento en la permeabilidad capilar, edema e infiltración de células del

sistema inmune. Además, el ácido araquidónico, resultado de la acción de fosfolipasas sobre las membranas dañadas, es degradado para formar leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos, que también provocan cambios en los vasos sanguíneos para la quimiotaxis de células del sistema inmune (Arturson, 1996).

Por otro lado, la activación del complemento que es una reacción en cadena por varias proteínas, genera quimiotaxis, fagocitosis y facilita las reacciones de citotoxicidad. Así mismo, se ha visto que en pacientes con quemaduras, los componentes C3a y C5a regulan la función de los leucocitos polimorfonucleares (Arturson, 1996).

Adicionalmente, después de una lesión por quemadura, el cuerpo trata inmediatamente de recuperar la homeostasis por medio de la contracción, retracción y coagulación de los vasos sanguíneos provocando la formación de tres zonas a nivel local (Church et al., 2006; Evers et al., 2010), que se describen a continuación, las cuales, fueron descritas por primera vez en 1947 por Jackson (Figura 4):

- i. Zona de coagulación: esta zona se presenta en el centro de la lesión. Se distingue de las otras zonas porque el tejido está necrótico y no se puede revitalizar debido a la coagulación de proteínas constitutivas.
- ii. Zona de estasis: es la zona aledaña a la zona de coagulación. Esta zona se caracteriza por ser tejido viable que puede perderse fácilmente debido a la isquemia que se presenta

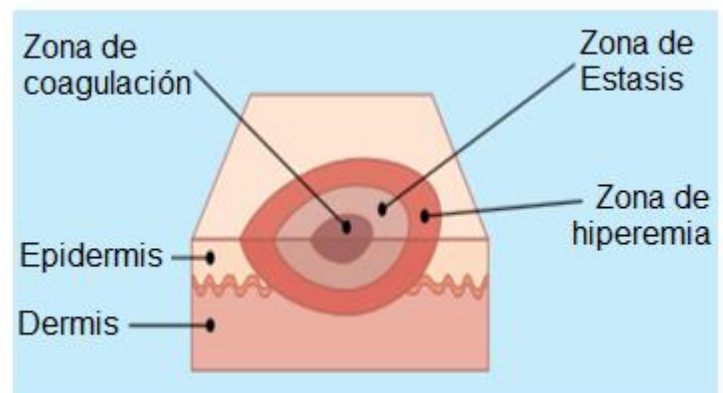


Figura 4. Zonas de lesión por la quemadura. (Tomada y editada de Hettiaratchy, 2014).

en ese lugar, por lo que, se busca la revascularización en los pocos días después de la lesión.

- iii. Zona de hiperemia: comprende la zona más alejada a la zona de coagulación. Se diferencia porque es tejido sano o muy poco lesionado. Existe vasodilatación para que haya un aporte de flujo sanguíneo como respuesta a la lesión.

1.6 Respuesta sistémica

La respuesta sistémica que se produce en quemaduras severas conlleva a una serie de procesos y mecanismos que se relacionan entre sí, tal como una respuesta neuroendocrina-inflamatoria. Aunque estas vías son activadas para poder combatir los efectos de las quemaduras, en la mayoría de los casos, se llega a un estado perjudicial para el organismo, donde se ven afectados órganos aislados o un conjunto de ellos.

En los últimos años se han descrito múltiples cambios en las citocinas inflamatorias circulantes (de las cuales se describen algunas en la Tabla 1) como parte de la respuesta inflamatoria ante quemaduras severas. En un estudio realizado con pacientes que sufrieron una quemadura con más del 20% de SCQ se encontraron diferencias a la alta con respecto a sujetos sanos en citocinas como G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-1RA y MCP-1 durante los primeros tres días después de la lesión. Conjuntamente, los niveles de IL-6, IL-1RA y MCP-1 aumentaron significativamente entre el grupo que no sobrevivió y el que sí sobrevivió (Hur, 2014). En otra investigación, donde también se midieron los niveles de citocinas en sangre en pacientes con más del 20% de SCQ, revelaron que los niveles de IL-4, IL-8, GM-CSF y MCP-1 tuvieron un aumento significativo en los pacientes con quemadura que no sobrevivieron con respecto a los que sobrevivieron (Finnerty et al., 2013). Por otro lado, en pacientes pediátricos con más del

30% de SCQ se encontraron alteraciones inflamatorias, entre ellas, la mayoría de las citocinas están alteradas en respuesta a la lesión por quemadura. Particularmente, los niveles de IL-6, IL-8 y MCP-1 mostraron grandes incrementos con respecto a los niños que no sufrieron quemaduras (Jeschke et al., 2011). Sin embargo, cuando la respuesta inflamatoria es descontrolada, se condicionan estados patológicos, tales como Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), Síndrome de Respuesta Compensatoria Antiinflamatoria (CARS) o sepsis.

Tabla 1. Citocinas y sus principales efectos biológicos.

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, coestimuladores 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, hepatocitos	Células endoteliales: activación (inflamación, coagulación). Hipotálamo: fiebre. Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda. Linfocitos T: proliferación y activación.

Tomada y editada de (Abbas, Lichtman, & Pillai 2012).

1.6.1 Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica

El Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) es una activación inflamatoria que afecta a todo el cuerpo. Ésta puede darse en respuesta a una infección o a un daño que no implique una infección, como lo son las quemaduras (Gorla et al., 2018). Clínicamente una persona puede presentar SIRS cuando tiene dos o más de los siguientes signos (García de Lorenzo, 2013):

- Temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$
- Frecuencia cardiaca >90 lat/min
- Frecuencia respiratoria >20 resp/min
- Leucocitos $>12,000/\mu\text{L}$ o $<4,000/\mu\text{L}$

Lo anterior, indica que se ha perdido el control de la inflamación local y como consecuencia se puede presentar un panorama muy amplio de afectaciones en casi todo el cuerpo humano. Por ejemplo, hay una activación descontrolada de los leucocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos y células NK), los cuales son capaces de montar una respuesta inflamatoria por medio de la liberación de citocinas proinflamatorias (Hazeldine, 2016). Como resultado habrá daño endotelial, disfunción microvascular y daño de órganos (Figura 5).

1.6.2 Síndrome de Respuesta Compensatoria Antiinflamatoria

No obstante, un trauma severo también se caracteriza por la liberación de citocinas antiinflamatorias. Lo anterior, se debe a una forma compensatoria de modular la respuesta inflamatoria inicial conocida como Síndrome de Respuesta Compensatoria Antiinflamatoria (CARS). Esta respuesta también se caracteriza por apoptosis de linfocitos y un ajuste en la producción de linfocitos T. En conjunto, la inmunidad adaptativa estará suprimida y el paciente

entrará en un estado de inmunosupresión haciéndolo más susceptible a una infección, sepsis, falla en diferentes órganos e incluso la muerte (Geovanni, Teresa, & Jaimes, 2015; Hazeldine, Hampson, & Lord, 2016).

1.6.3 Sepsis

El proceso de sepsis se puede definir como una respuesta inflamatoria derivada de una infección y se relaciona íntimamente con el daño a diferentes órganos, lo que pone en riesgo la vida de la persona. En los pacientes con quemaduras, la sepsis representa la principal causa de muerte (Manning, 2018).

El proceso fisiopatológico comprende una activación del sistema inmune tanto celular como humoral, donde lo que se busca por medio del reconocimiento de los patógenos es su destrucción. Cuando los inductores (PAMPs y/o DAMPs) son reconocidos por sus receptores (Figura 5) inducen una señalización intracelular que provoca la expresión de genes para producir mediadores. Entre esos mediadores están las citocinas, las cuales son liberadas al torrente sanguíneo cuando las quemaduras son severas. Así, los mediadores actuarán sobre células, tejidos y órganos para combatir la infección (Greenhalgh, 2017).

Algunas de las manifestaciones clínicas más comunes en los pacientes con sepsis son fiebre, taquicardia, hipotensión, leucocitosis, trombocitopenia y coagulación. Además, el paciente puede llegar a un estado donde no sea posible establecer la homeostasis y las probabilidades de muerte sean mayores (Balk, 2014; Greenhalgh, 2017).

Finalmente, entre los agentes etiológicos están bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y otros patógenos microbianos, siendo las bacterias las más comunes en pacientes con

quemaduras debido al desarrollo de diversos factores de virulencia y mecanismos de resistencia (Colín-Castro et al., 2017).

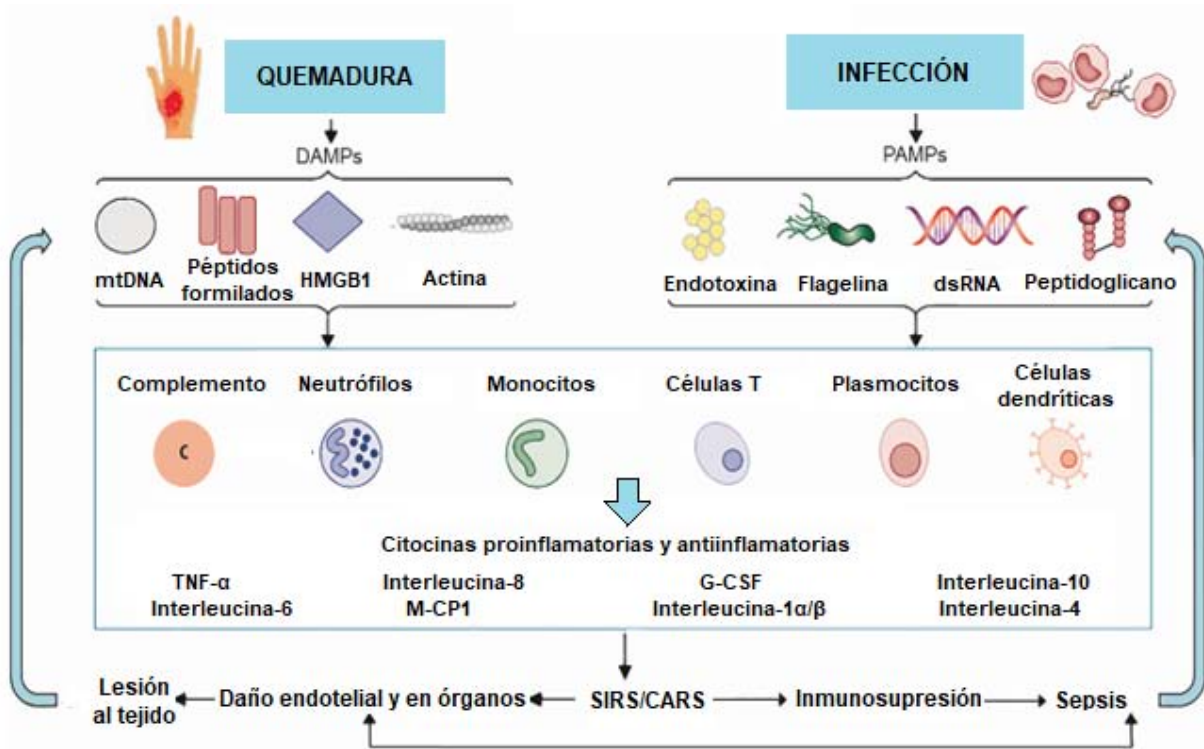


Figura 5. Activación del sistema inmune y las implicaciones a nivel sistémico a causa de las lesiones por quemaduras severas. (Tomada y editada de Lord et al., 2014).

1.6.4 Dinámica de la respuesta inflamatoria

Típicamente las respuestas inflamatorias anteriores (SIRS y CARS), desde hace tiempo se han descrito como respuestas secuenciales (Lenz, 2007) (sobre todo en modelos animales), es decir, que primero aparece la respuesta proinflamatoria y con el transcurso del tiempo aparece la respuesta antiinflamatoria. No obstante, en un estudio realizado por Xiao y colaboradores (Xiao et al., 2011), en donde evalúan la respuesta genómica de pacientes con complicaciones y sin complicaciones después de un trauma severo, encuentran que los cambios en la respuesta

antiinflamatoria ocurren muy temprano y simultáneamente con las reacciones proinflamatorias (Figura 6-B).

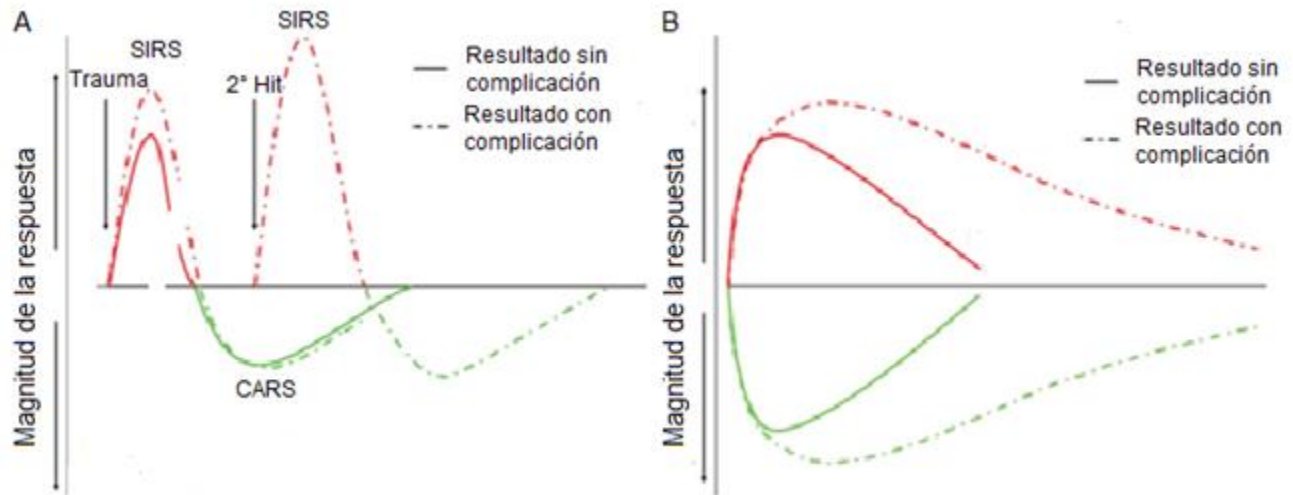


Figura 6. Respuesta pro y antiinflamatoria después de una lesión grave.

(A) En rojo se observa que aparece primero el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS). El primer evento que se presenta es inflamación por el trauma y el segundo (2º hit) es inflamación exacerbada por intervención clínica o infección. Después de cada SIRS aparece el Síndrome de Respuesta Antiinflamatoria Compensatoria (CARS) que se visualiza en verde. (B) Las repuestas SIRS y CARS son simultáneas. No se observa el 2º hit. Líneas punteadas: recuperación >14 días o muerte. Líneas continuas: recuperación <5 días. (Tomada de Xiao et al., 2011).

1.6.5 Implicaciones de las quemaduras a nivel sistémico

Debido a las quemaduras severas se pueden presentar manifestaciones fisiopatológicas en diferentes órganos (Figura 7) o sistemas, tales como el cardiovascular, respiratorio, el hígado, riñón, entre otros.

En un modelo murino de quemaduras severas (30% y 50% SCQ) se encontró infiltración de neutrófilos y macrófagos, presencia de daño alveolar, edema y sangrado en los pulmones. También se ha visto que la inhalación de humo provoca obstrucción de vías aéreas,

broncoespasmos y secreción excesiva de mucosa en los bronquios, lo cual produce alteraciones en el intercambio de gases (Liu et al., 2015; Warner & Martyn, 2015).

A su vez, enseguida de la lesión por quemadura existen cambios a nivel cardiovascular como formación de edema, hipovolemia y disminución de la contractilidad del miocardio (correlacionado con un aumento en los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-1 β) lo que provoca una disminución del gasto cardíaco (Evers et al., 2010; Rae, Fidler, & Gibran, 2016).

Además, entre otras de las manifestaciones características de las quemaduras se encuentra un metabolismo alterado como una respuesta hipermetabólica y catabólica. Esta respuesta es caracterizada por un consumo de oxígeno elevado, producción de dióxido de carbono, alteraciones en el metabolismo de proteínas, tejido graso y en la producción de citocinas (Evers et al., 2010; Jeschke et al., 2008). Asimismo, una quemadura severa conduce a un aumento de glucosa en sangre asociada a una resistencia a insulina y/o a una secreción de insulina alterada que predispone al paciente a otras complicaciones (Li et al., 2018).

Diferentes marcadores de daño hepatocelular como alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y α -Glutación S-Tranferasa (α -GST) se han visto aumentados tanto en modelos porcinos y murinos como en pacientes (Burmeister et al., 2016; Chen et al., 2003; Ozturk et al., 2009). Además, se han observado cambios en la morfología del hígado, por ejemplo, hepatomegalia con infiltración de ácidos grasos que se asocian con un aumento en la incidencia de sepsis y mortalidad (Stanojcic et al., 2016).

El riñón es el órgano excretorio más importante cuya función se ve alterada a causa de las quemaduras. Cuando hay daño renal se observa un aumento en los niveles de nitrógeno ureico

y de creatinina en sangre, así como infiltración de neutrófilos y macrófagos en el tejido renal (Burmeister et al., 2016; Liu et al., 2015).

Todos los cambios mencionados anteriormente, conducen a manifestaciones clínicas severas como insuficiencia respiratoria, shock, sepsis y falla multiorgánica, las cuales condicionan la salud del paciente que ha sufrido una lesión por quemadura (Evers et al., 2010). Por lo anterior, las quemaduras son capaces de provocar cambios a nivel sistémico a través de diferentes mediadores, como lo son las proteínas, las cuales cuentan con una regulación de su expresión en distintos niveles, como lo es a nivel nuclear.

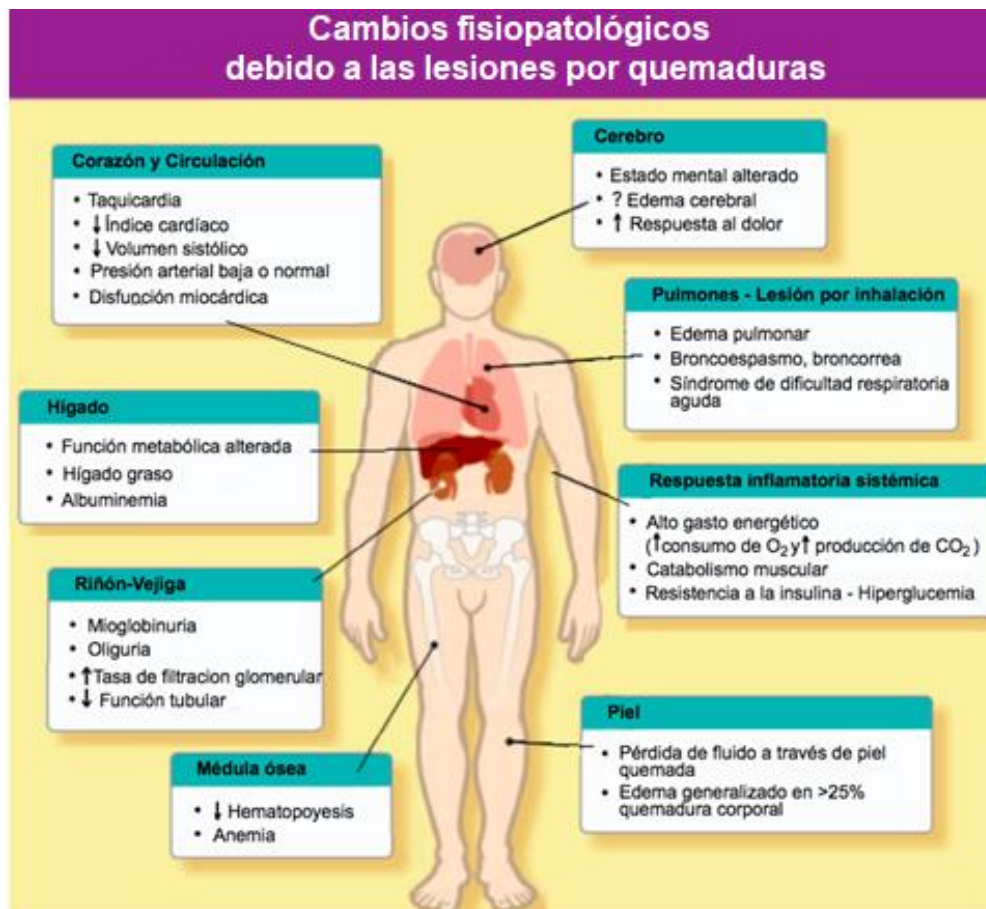


Figura 7. Cambios fisiopatológicos debidos al daño por quemadura. (Tomada y editada de Warner & Martyn, 2015).

2. Estructura de la cromatina

Dado todo el material genético que hay dentro de cada célula y el diámetro muchísimo más pequeño del núcleo, éstas poseen una forma muy organizada de compactarlo todo, de tal manera que pueda estar accesible para la recombinación, replicación, reparación y transcripción (Xu et al., 2018). Esto se lleva a cabo gracias a un gran número de proteínas especializadas, ya sea proteínas histonas o no histónicas, por lo que, todo el complejo de proteínas-DNA dentro del núcleo de las células eucariotas se conoce como cromatina (Alberts, Johnson, & Lewis, 2015). La cromatina tiene diferentes niveles de organización, que se diferencian por la formación de diferentes estructuras dependientes del nivel de compactación.

2.1 Empaquetamiento del DNA

Los nucleosomas son el nivel de empaquetamiento más básico del DNA. Éstos consisten en la unión del DNA a proteínas llamadas histonas, donde aproximadamente 147 pares de nucleótidos le dan un giro a todo este complejo proteico, quedando ~50 pares de bases que conforman el DNA linker el cual queda entre cada nucleosoma, por lo que, los nucleosomas aparecen cada 200 pares de bases formando una estructura que se asemeja a un collar de perlas, conocido como fibra de 10 nm (Alberts, Johnson, & Lewis, 2015).

Este complejo de 10 nm (proteínas-DNA) se conforma de las histonas: H2A, H2B, H3, H4 y H1. El arreglo del nucleosoma se lleva a cabo primero con la formación de dos dímeros de H3-H4 y dos de H2A-H2B. En seguida, los dos dímeros de H3-H4 son los primeros en ensamblarse al DNA, formando una estructura subnucleosomal llamado tetrámero, y lo mismo sucede para H2A-H2B. Finalmente, los dos tetrámeros se combinan para formar el octámero, mientras que la histona H1 le da estabilidad a las organizaciones siguientes (Urahama et al., 2016).

La segunda estructura se conoce como fibra de 30 nm o solenoide, en ésta se conocen dos modelos. Por un lado, está la formación de una “hélice de una estrella” que se forma por la unión de los nucleosomas a través de la H1 y se asemeja a una estrella. Por otro lado, y debido a posibles interacciones entre el DNA linker y H1, mismas que hacen que disminuya la estabilidad, se creó el modelo de la “hélice de dos estrellas”, donde el DNA linker crea una estructura parecida a un zig-zag (Perišić, Colleparado-Guevara, & Schlick, 2010; Quénet, McNally, & Dalal, 2012).

De esta manera, el DNA se va compactando más y más hasta llegar a una forma estructuralmente más compleja, como lo son los cromosomas. Éstos ocupan territorios discretos en el interior del núcleo, lo que quiere decir, que el DNA está espacialmente organizado (Serizay & Ahringer, 2018). Esta compactación está íntimamente relacionada con procesos moleculares como la replicación o la transcripción del material genético, por lo que, alterando la composición de la cromatina estos procesos pueden modificarse. Así, uno de los mecanismos que puede regular la transcripción es a través de las modificaciones epigenéticas.

3. Epigenética

La epigenética se define como la herencia nuclear, que no está basada en diferencias en la secuencia del DNA (Holliday, 1994). Sin embargo, esta definición se complementa con el estudio de las alteraciones en la cromatina que establecen y propagan patrones diferentes de la expresión y silenciamiento genético a partir del mismo genoma (Allis et al., 2015).

Los cambios epigenéticos son efecto del ambiente, la alimentación, el ejercicio, las enfermedades, los medicamentos, los hábitos cotidianos (Asimes et al., 2017; Fraga et al.,

2005), es decir, son consecuencia del entorno de un organismo y de cómo interactúa con él, y pueden presentarse inmediatamente después de los estímulos.

Las bases moleculares de los procesos epigenéticos son complicadas e involucran, principalmente, la metilación del DNA, los RNA's no codificantes y las modificaciones de las histonas (Figura 8).

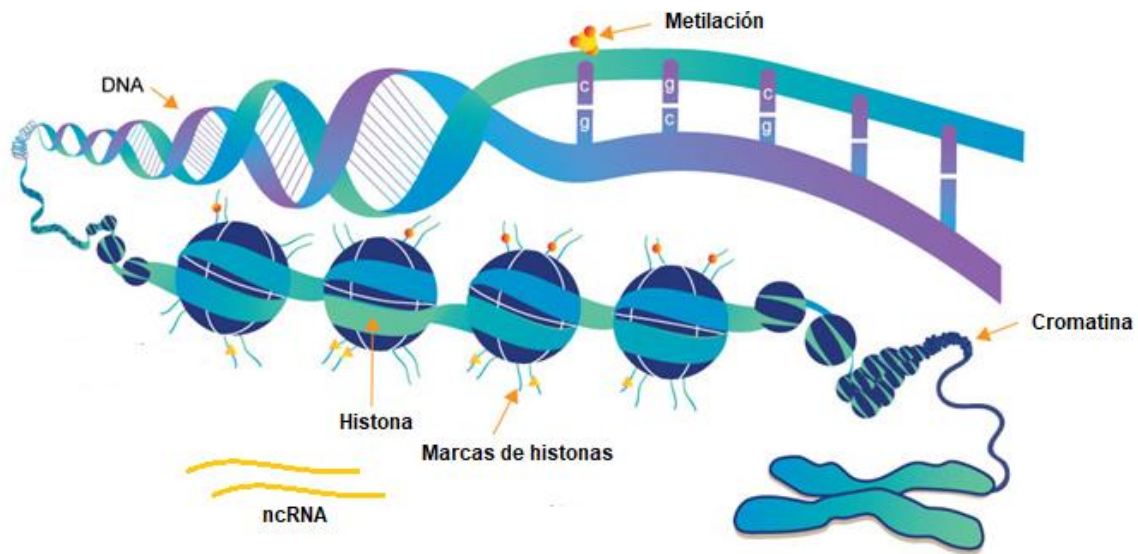


Figura 8. Mecanismos epigenéticos: metilación del DNA, modificaciones de histonas y RNAs no codificantes. Tomada y editada de (Isidro-Keklikián & Virginia-Coronel, 2018).

3.1 Metilación del DNA

Consiste en la unión covalente de un grupo metilo (CH_3) en la posición 5 de la citosina (C) de los dinucleótidos C-G y se genera sobre todo en los sitios CpG, los cuales, son sitios altos en citosinas y guanidinas. Las DNA metiltransferasas (DNMTs) son las proteínas encargadas de colocar esta marca epigenética, la cual, puede ser colocada de manera nueva (*de novo*) por la DNMT3a o DNMT3b. Por otro lado, la DNMT1 ayuda a mantener las metilaciones, ya que, durante la replicación se generará DNA hemimetilado (metilación de sólo una hebra), el cual

requerirá de la actividad de DNMT1 para mantener sus patrones de metilación (Jeltsch & Jurkowska, 2014; Pham & Lee, 2017).

La metilación de los dinucleótidos CpG se correlacionan con una represión o silenciamiento de genes a causa de diferentes mecanismos. Entre ellos se encuentra el bloqueo de la transcripción cuando la metilación está cerca de los sitios de inicio de la misma. También puede promover el reclutamiento de complejos represores transcripcionales, como por ejemplo, a través de marcas de histonas específicas que conducen a un estado de represión (De Groote, Verschure, & Rots, 2012; Mazzió & Soliman, 2012).

Por otro lado, la desmetilación del DNA juega un papel importante en diferentes procesos de regulación como el mantenimiento de la pluripotencia, neurogénesis y tumorigénesis (Shi et al., 2017). La pérdida de la metilación puede ocurrir de forma pasiva o activa. La primera ocurre cuando en la replicación no se lleva a cabo la remetilación, mientras que, la segunda es mediada por la acción de enzimas que modifican la citosina metilada, conocidas como TET (Jeltsch & Jurkowska, 2014).

3.2 RNAs no codificantes (ncRNAs)

Los ncRNAs se pueden clasificar de acuerdo al tamaño: 1) ncRNAs pequeños (<200 pb), los cuales, incluyen microRNAs (miRNA) y PIWI-interacting RNAs (piRNA); 2) ncRNAs largos (lncRNA) (>200 pb). Entre los lncRNAs se encuentran: long intergenic non-coding RNA (lincRNA), circular RNA (circRNAs), natural antisense transcripts (NATs) y enhancer RNAs (eRNAs) (Xu et al., 2018).

Los miRNAs tienen una invaluable función de regulación epigenética postranscripcional. Ellos actúan uniéndose a la región 3' no traducida (3'-UTR) de mRNA, provocando una degradación del transcrito o bloqueando la traducción.

Por otro lado, los lncRNAs regulan la expresión por medio de diferentes mecanismos, por ejemplo, promueven el reclutamiento de proteínas o de complejos a sitios específicos del DNA, poseen una función de andamiaje para otros complejos y se pueden unir a otros RNAs para una regulación postranscripcional (Li et al., 2018). Sin embargo, a un nivel epigenético actúan sobre la metilación del DNA, las modificaciones de histonas, la impronta genómica y el remodelamiento de la cromatina (Zhou et al., 2018).

3.3 Modificaciones postraduccionales de las histonas

Las histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) tienen colas N-terminales de longitudes variables que quedan fuera de la estructura de los nucleosomas, las cuales están sujetas a modificaciones químicas, mejor conocidas como modificaciones postraduccionales, es decir, ocurren después de la traducción. No obstante, también se dan modificaciones en el núcleo de las histonas. Entre las modificaciones se conocen: la metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, glicosilación, biotilación, sumoilación, succinilación, entre otras, siendo las tres primeras las más estudiadas (Pham & Lee, 2017).

Una parte del control de la expresión de los genes está regida por estas modificaciones epigenéticas, que continuamente condensan y descondensan el DNA. Como consecuencia las modificaciones químicas de las histonas pueden provocar la promoción o prevención de la unión del DNA con los nucleosomas, la activación transcripcional o elongación de la RNA polimerasa II, el silenciamiento de la transcripción o formación de heterocromatina (Ciarlo, Savva, & Roger,

2013; Dillon et al., 2005). Dependiendo de la marca y el aminoácido que fue modificado, así como de la suma de las modificaciones localizadas en las histonas en un complejo nucleosomal (que en conjunto se conoce como “Código de histonas”), habrá cambios en la accesibilidad del DNA, lo que deriva en una determinada regulación de la expresión génica. Así, cuando los cambios provoquen una compactación de la cromatina (Figura 9) habrá una inactivación transcripcional, mientras que, cuando ésta se relaje se dará una activación transcripcional (Carson & Kunkel, 2017).

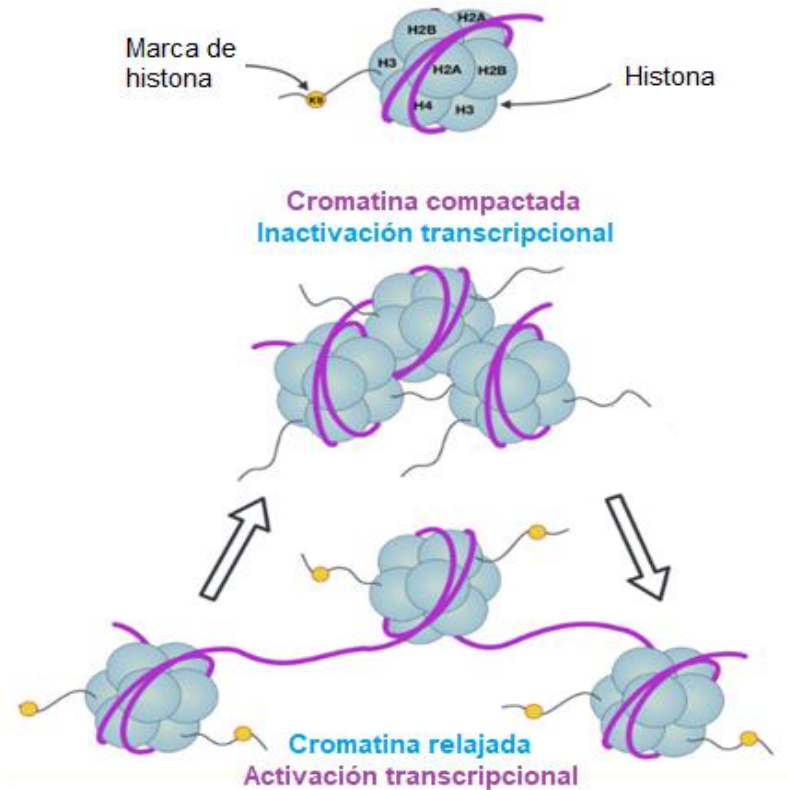


Figura 9. Efecto de las modificaciones epigenéticas en la accesibilidad de la cromatina. Tomada y editada de (Huynh, Everts, & Ampornaramveth, 2017).

3.3.1 Metilación de histonas

Las metilaciones se han encontrado en varios residuos de las histonas como en arginina (R) y lisina (K), los cuales, se pueden monometilar y dimetilar y hasta trimetilar para el caso de las lisinas (Guo et al., 2014).

Las enzimas encargadas de colocar los grupos metilos en las histonas son las metiltransferasas, las cuales, transfieren el grupo CH₃ del sustrato S-adenosil metionina (SAM)

a los residuos de aminoácidos. Estas enzimas, para el caso de las metilaciones de lisina, forman parte de un conjunto de proteínas que contienen el dominio SET (suppressor of variegation-enhancer of zeste-trithorax), mientras que, la desmetilación la realizan otra población que contienen el dominio LSD (lysine-specific demethylase 1) y JMJC (Jumonji C) (Dillon et al., 2005; Hyun et al., 2017).

De manera general, las metilaciones en las histonas pueden ser marcas de activación o de inactivación. Por ejemplo, H3K4me3 está relacionada con una activación de la transcripción o con un locus listo para cambiar de inactivo a activo o viceversa, mientras que, H3K27me3 provoca el silenciamiento de eucromatina, al igual que H3K9me2 que además correlaciona con un silenciamiento de heterocromatina, así como, con la metilación del DNA (Dillon et al., 2005; Medzhitov & Horng, 2009).

3.3.2 Acetilación de histonas

Normalmente, las histonas tienen una carga neta positiva que promueve la unión electrostática con el DNA cargado negativamente, lo que provoca una compactación de la cromatina. Sin embargo, la carga de las histonas puede cambiar cuando se le adiciona un grupo acetilo (COCH_3) desde el cofactor acetil-CoA al nitrógeno de la lisina, provocando una disminución de la carga positiva de la histona y a su vez una repulsión con el DNA, lo que induce a una relajación de la cromatina. Este cambio de compactación ayudará a que la maquinaria transcripcional se acople con mayor facilidad, así como, a que factores de transcripción lleguen al sitio requerido favoreciendo la expresión de los genes (Marmorstein & Zhou, 2014; Wilson, 2008).

Las enzimas encargadas de llevar a cabo esta reacción son las acetiltransferasas de histonas (HAT), que se correlacionan generalmente con una activación; mientras que, las deacetilasas de histonas (HDAC) que son las que tienen como función desacetilar a las histonas (Ito, 2007), son asociadas con represión/silenciamiento.

3.3.3 Fosforilación de histonas

La mayoría de las fosforilaciones se realizan en serinas (S) y treoninas (T), aunque también se da en residuos tirosina (Y). Las enzimas encargadas de fosforilar son cinasas de histonas, mientras que las fosfatasas remueven la marca de fosforilación (Allis et al., 2015).

La fosforilación de las histonas está implicada en varios procesos, entre ellos se encuentran la reparación del DNA y la apoptosis, entre otros. Asimismo, está asociada a la regulación transcripcional, en la cual las marcas más estudiadas son H3S10p y H3S28p. Ambas se correlacionan con activación de la transcripción que se relaciona con acetilación (Lau & Cheung, 2011; Rossetto, Avvakumov, & Côté, 2012). Además, la fosforilación dentro del nucleosoma provoca una disrupción de la interacción DNA-histona por el tamaño del grupo fosfato promoviendo la accesibilidad del DNA a factores de transcripción (Brehove et al., 2015; Tessarz & Kouzarides, 2014).

3.4 Epigenética e inflamación

La inflamación, como se describió anteriormente, genera un conjunto de cambios desarrollados por un sistema regulatorio sofisticado que trabaja en función de las señales y provoca que se transcriban los genes específicos como los relacionados con la respuesta inmune, infecciones o reparación del tejido.

Aunque no hay estudios publicados en la actualidad que demuestren una regulación en la inflamación por medio de mecanismos epigenéticos después de una lesión por quemadura, si existen diversos estudios que muestran participación de mecanismos epigenéticos en la regulación de procesos inflamatorios en diversas patologías.

La aterosclerosis es una enfermedad de almacenamiento de lípidos caracterizada por una inflamación vascular crónica. En un estudio en monocitos de pacientes sintomáticos con aterosclerosis se encontró una asociación de cambios en citocinas con alteraciones epigenéticas. Por un lado, los investigadores observaron un aumento de citocinas proinflamatorias en plasma. Además, cuando se hizo la estimulación *ex vivo* de los monocitos se presentó un aumento en la expresión de IL-6, IL-1 β , IL-8 y TNF α . Por otro lado, midieron los niveles de la marca epigenética H3K4me3 en los promotores de IL-6, IL-1 β y TNF- α y encontraron que la marca estaba disminuida en los pacientes, por lo que también midieron las marcas represivas H3K9me3 y H3K27me3, encontrando sólo una disminución de H3K27me3 en el promotor de TNF- α . Finalmente, hicieron correlaciones y encontraron que cuando hay una disminución de H3K27me3, aumenta la expresión de TNF- α (Bekkering et al., 2016).

También Miao y colaboradores demostraron que existe un perfil alterado a nivel genómico de H3K9me2 en linfocitos de sangre periférica de pacientes con diabetes tipo 1 comparado con controles sanos. Además, con análisis bioinformáticos determinaron que estos cambios están ampliamente asociados con agentes y vías que modulan la inflamación (Miao et al., 2008)

Por otro lado, en otro estudio realizado en monocitos de humanos en un modelo de sepsis, se encontró que existen diferencias en las marcas de histonas en pacientes con sepsis comparado con los controles sanos. Al analizar con ChIP-seq, encontraron que en un cluster de

silenciamiento dos marcas de activación (H3K4me3 y H3K9ac) estaban disminuidas en los pacientes y la marca de represión H3K27me3 estaba aumentada comparado con los controles, mientras que, un cluster de activación presentó un patrón de modificaciones invertido. Hicieron análisis ontológicos y encontraron que los genes con diferencias en las modificaciones de histonas estaban involucrados de forma significativa con la inmunidad innata (Weiterer et al., 2015).

Además, se han estudiado los cambios en la cromatina cuando hay tolerancia en la respuesta inflamatoria. Chen y colaboradores, hallaron en leucocitos de sangre de pacientes con inflamación sistémica severa (SSI) que una interacción directa de RelB con G9a, la metiltransfera de H3K9me2, genera un sitio de unión estable para HP1, una proteína adaptadora de la cromatina, provocando un cambio de activo a silenciamiento de la transcripción de IL-1 β (Chen et al., 2009). Asimismo, en otro modelo de tolerancia en macrófagos estimulados con LPS se presentan cambios en la acetilación y en la trimetilación de la lisina 4 de H3 que determinan la activación o represión de la expresión (Foster, Hargreaves, & Medzhitov, 2007).

Antecedentes

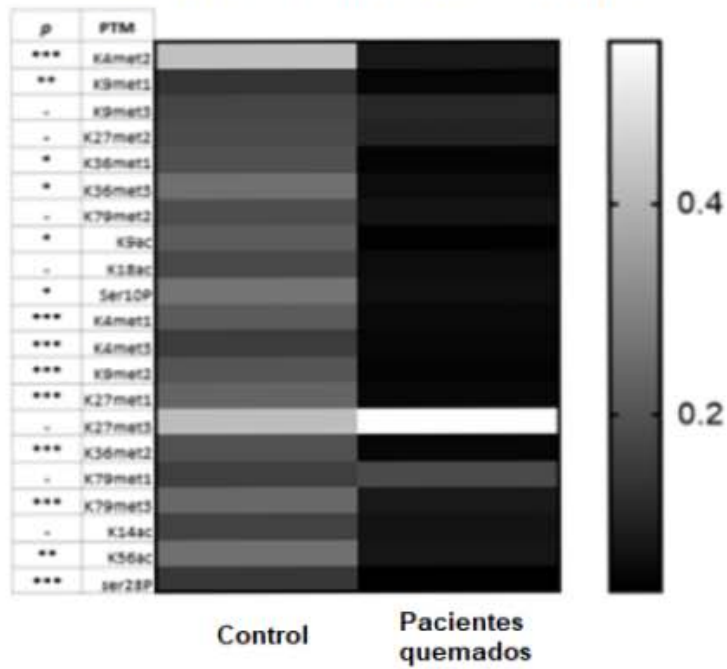
En la actualidad la investigación acerca de los cambios epigenéticos está cobrando relevancia debido a que la epigenética se encuentra en todos los aspectos de la vida y su comprensión está conduciendo a tener más herramientas para combatir enfermedades y traumas.

En estudios realizados en el Laboratorio de Medicina Genómica del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), por medio de ensayos múltiplex colorimétricos basados en la técnica de ELISA, se determinó el perfil de 21 marcas epigenéticas (14 metilaciones, 4 acetilaciones y 2 fosforilaciones) de la histona H3 y 10 marcas (5 metilaciones, 4 acetilaciones y 1 fosforilación) para la histona H4, en leucocitos de pacientes con quemaduras severas (Tesis de Licenciatura de Cintora C., en proceso).

Por un lado, el análisis global de los niveles de metilación, acetilación y fosforilación para la H3 resultaron con una disminución significativa en los pacientes. Además, se evaluaron las marcas individuales y se encontró un perfil diferencial también con una disminución significativa en la mayoría de las modificaciones postraduccionales de las histonas para la H3. Por otro lado, en la H4 los resultados globales mostraron un aumento significativo sólo en las acetilaciones, sin embargo, no hubo diferencia significativa en ninguna de las marcas cuando fueron analizadas individualmente (Figura 10).

Por lo tanto, con ayuda de estos primeros análisis, los cuales indican que existe un perfil diferencial alterado de PTMs de histonas en pacientes con quemaduras graves, surgen nuevas interrogantes por resolver, por ejemplo, conocer las implicaciones directas de estos cambios sobre genes específicos.

Niveles de PTMs en histona 3 (H3)



Niveles de PTMs en histona 4 (H4)

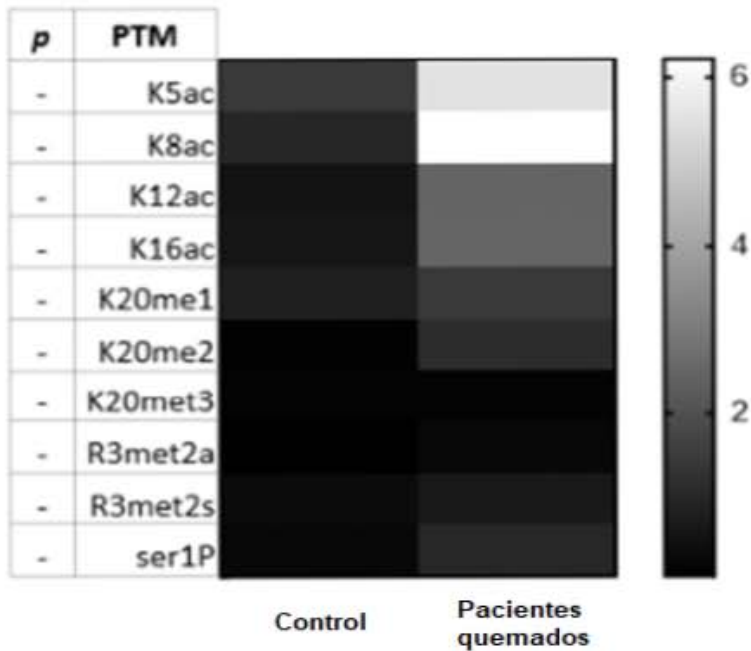


Figura 10. Heat Map de los valores de las 21 PTMs para H3 y 10 PTMs para H4. (Tomada de Tesis de Licenciatura de Cintora C., en proceso).

Justificación

Las quemaduras representan un problema de salud pública a nivel mundial y conllevan importantes gastos económicos, discapacidades, problemas sociales y psicológicos y, en función de la gravedad de las lesiones, pueden desencadenar la muerte.

Entre las manifestaciones fisiopatológicas más comunes, se encuentra el desequilibrio de citocinas que median comúnmente la respuesta inflamatoria. En diversos modelos de inflamación se ha reportado que la regulación de la expresión de las citocinas es dirigida, en parte, por mecanismos epigenéticos tales como, modificaciones postraduccionales de histonas. Recientemente se encontraron perfiles alterados de PTMs en histonas H3 y H4 en leucocitos de pacientes con quemaduras severas, sin embargo, la importancia funcional de estas alteraciones aún no ha sido estudiada. En este trabajo, se inicia el estudio de la importancia funcional de estas alteraciones epigenéticas, a través del análisis de la ocupación diferencial de las PTMs sobre *loci* de genes involucrados con el proceso inflamatorio. El estudio del impacto de los cambios epigenéticos sobre la regulación de la respuesta inflamatoria, permitirá proponer en un futuro posibles terapias epigenéticas encaminadas a modular la respuesta inflamatoria en pacientes con quemaduras severas.

Objetivos

General

Evaluar los niveles de modificaciones postraduccionales de histona H3 sobre *loci* de genes involucrados en inflamación, en leucocitos de pacientes con quemadura severa.

Particulares

1. Estandarizar la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) optimizando condiciones de sonicación, inmunoprecipitación y qPCR.
2. Determinar la presencia de las modificaciones epigenéticas en los siguientes *loci* de genes que median la inflamación en leucocitos de pacientes con quemaduras severas:

H3K4me3: IL-1 β , IL-6 y TNF- α ;

H3K9me2: IL-1 β , IL-6, IL-17a e IL-8;

H3K27me1: IL-1 β , IL-6 y

H3S28p: c-fos, miR-21 e IL-6.

Métodos

1. Pacientes y controles sanos

Doce pacientes con quemaduras y seis sujetos sanos participaron en este estudio. Los pacientes que fueron incluidos cumplieron con los siguientes criterios: individuos que llegaron al Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ, INR) dentro de las 24 horas después de la lesión con quemaduras graves (de segundo grado con al menos el 25% de la superficie corporal quemada o de tercer grado con más del 10% de la superficie corporal quemada). La información clínica de los pacientes como la edad, sexo, tipo de quemadura, %SCQ y sepsis se presentan en la Tabla 2.

Los criterios de exclusión fueron pacientes que decidieron no participar en el estudio, pacientes con quemaduras de primer grado, o quemaduras severas que se atendieron después de 24 horas del trauma.

Tabla 2. Características de los pacientes con quemaduras.

No.	Edad	Sexo	%SCQ	Tipo de quemadura	Sepsis (dpq)
1	71	M	50	Eléctrica	8
2	23	M	60	Eléctrica	12
3	81	M	50	Eléctrica	
4	18	M	35	Fuego	10
5	18	M	23	Fuego	
6	34	M	40	Fuego	9
7	21	M	20	Fuego	
8	22	M	60	Fuego	6
9	16	M	35	Eléctrica	6
10	15	M	35	Eléctrica	9
11	17	M	15	Fuego	
12	34	M	20	Fuego	7

Edad (años), M=masculino y dpq (días post-quemadura).

Las muestras de los individuos sanos fueron colectadas y utilizadas como controles, mismos que, no tenían lesiones por quemadura ni patologías que desencadenaran procesos inflamatorios, que correspondieron en edad y sexo con los pacientes incluidos en el estudio y que aceptaron participar en el estudio.

El consentimiento informado se obtuvo de todos los pacientes con quemaduras y de los individuos control o en su caso de un miembro de la familia calificado (Anexo 1).

2. Procesamiento de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los pacientes con quemadura, a 1 día post-quemadura y de los individuos control. Las muestras fueron procesadas el mismo día que se tomaron y se empleó la técnica de separación de células mononucleares (MNC) por medio de un gradiente de Ficoll con la solución Lymphoprep™ (Figura 11), la cual se describe brevemente. Se tomaron 8 mL de sangre periférica y se adicionó un volumen 2:1 de PBS a temperatura ambiente (16 mL). La sangre diluida se colocó cuidadosamente sobre 15 mL de Lymphoprep y se centrifugó a 600 g por 30 min a 25°C. Enseguida, se recuperó la capa de MNC de la interfase plasma-Lymphoprep y las células fueron lavadas con PBS. Se lisaron los eritrocitos con solución RBC (Qiagen) con una incubación de 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, después de haber lavado el pellet con PBS, se tomó una alícuota que contenía 10 millones de células y se congelaron a -70°C hasta su posterior uso.

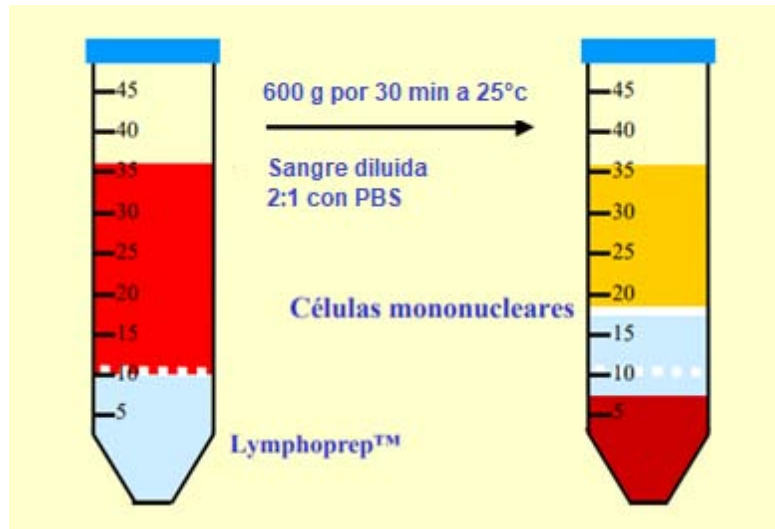


Figura 11. Representación de la separación de células mononucleares con Lymphoprep™. Tomada y modificada de Axis-Shield Density Gradient Media.

3. Inmunoprecipitación de la cromatina

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) es una técnica muy utilizada para estudiar las interacciones entre el DNA y proteínas o visto desde otra manera sitios de enriquecimiento de las proteínas de interés, tales como: factores de transcripción, proteínas co-reguladoras, histonas modificadas, enzimas que modifican la cromatina, polimerasas.

Como se muestra en la Figura 12, las células son tratadas con formaldehído 1% para fijar las interacciones DNA-proteínas. En seguida, se lisan las células para poder liberar la cromatina, la cual, es fragmentada con métodos físicos o químicos. Una vez, que se tienen fragmentos entre 200-1000 pb aproximadamente, se inmunoprecipita con los anticuerpos que van dirigidos contra las proteínas de interés que previamente fueron fijadas al DNA. Estas interacciones se revierten y se purifica el DNA, el cual es analizado por medio de PCR en tiempo real (qPCR).

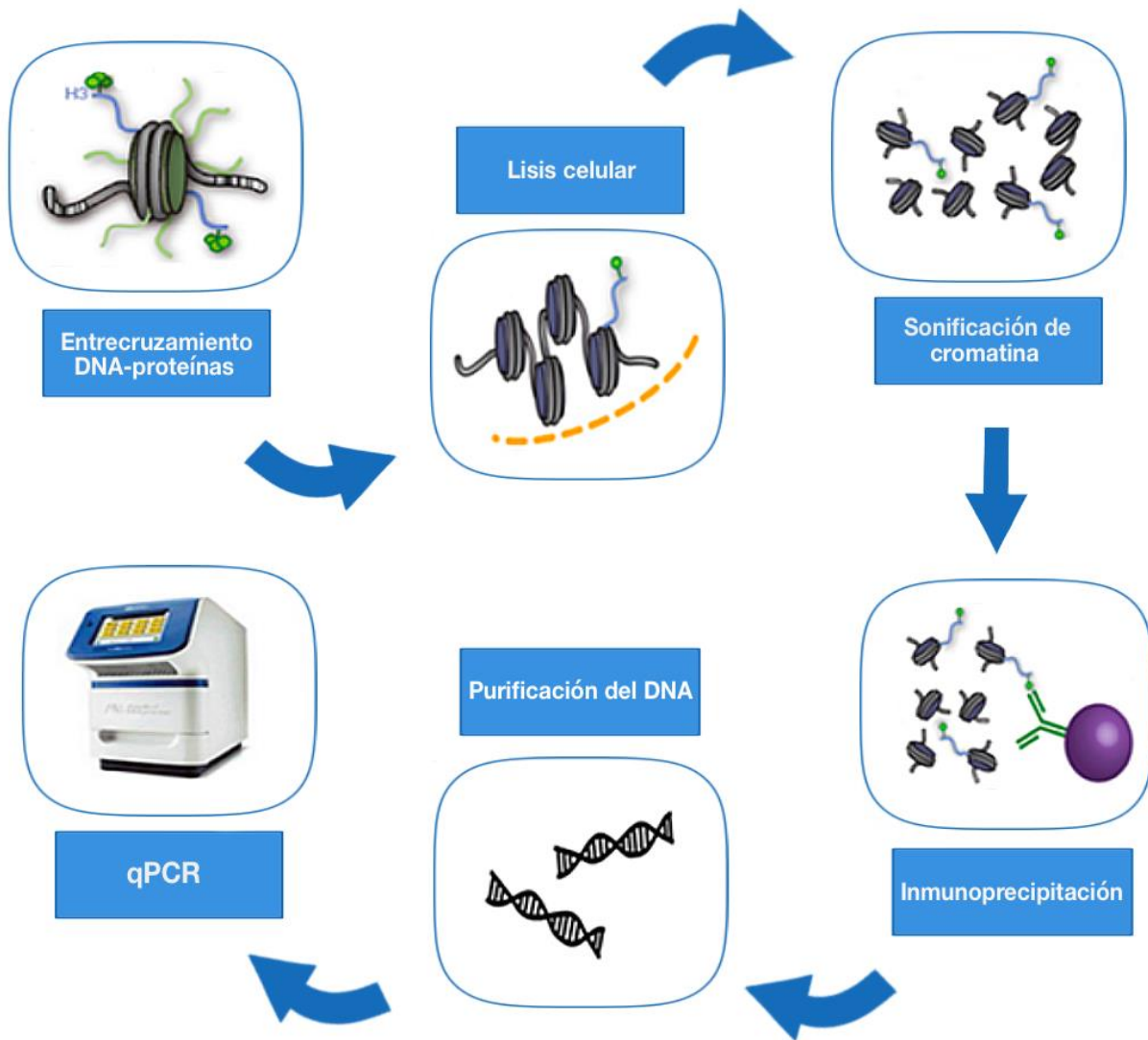


Figura 12. Diagrama de flujo del ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Para llevar a cabo la ChIP se utilizaron dos protocolos (Hirose et al., 2014; ChIP-IT® PBMC Kit Manual, N° de catálogo 53042), a los que se les hicieron modificaciones a lo largo de la estandarización para poder establecer el protocolo que aquí se plantea.

A) Fijación, lisis celular y sonicación

Los leucocitos aislados fueron agrupados en pacientes y controles. Las células fueron tratadas con 5 mL de formaldehído (Sigma) al 1% para la formación del entrecruzamiento DNA-proteínas, con una incubación de 15 min a temperatura ambiente con agitación suave. Para detener la reacción, se añadió glicina a una concentración final de 125 mM, con una incubación de 5 min a temperatura ambiente con agitación suave. Después de centrifugarlas a 1250 g, 5 min, a 4°C, las células se lavaron dos veces con PBS frío suplementado con PMSF a una concentración final de 0.1 mM. El pellet se congeló en hielo seco por 10 min para facilitar la lisis celular. En seguida, éste se suspendió en el buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl y 0.5% NP40) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (Roche) y PMSF (concentración final 0.1 mM) y se colocó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se obtuvieron los núcleos centrifugando a 3200 g, 10 min, a 4°C y se adicionó el buffer de lisis nuclear (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS) suplementado también con inhibidores de proteasas y PMSF. La cromatina se sonicó usando el sonicador Sonic Dismembrator Ultrasonic Processor (Fisher Scientific) con los parámetros mostrados en la Tabla 3, manteniendo las muestras en todo momento en un bloque de refrigeración. Finalmente, se centrifugó la cromatina a 20,817 g por 5 min a 4°C para quitar los restos celulares. Se tomó una alícuota para realizar la cuantificación de la cromatina y el resto se almacenó a -70°C hasta su posterior uso.

Tabla 3. Condiciones de sonicación utilizadas para la inmunoprecipitación de cromatina.

Amplitud	Tiempo de sonicación por cada pulso	Tiempo de descanso entre cada pulso	Pulsos	Tiempo total sonicando
10%	15 seg	60 seg	30	7.5 min

B) Reversión del entrecruzamiento, purificación y cuantificación de la cromatina

Para realizar la cuantificación de la cromatina a partir de la alícuota tomada, primero se revirtió el entrecruzamiento del complejo DNA-proteínas, y posteriormente se realizó su purificación. La alícuota se trató con 0.1 mg/mL de RNAsa a 37°C por 1 hora, así como con 0.5 mg/mL Proteinasa K a 37°C por 3 horas y finalmente con NaCl 0.2 M a 65°C durante toda la noche. Después se purificó por el método de fenol/cloroformo mismo que se describe a continuación: se agregaron 2 volúmenes de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló, se centrifugó 2 min a 14,000 rpm y se recuperó la fase acuosa. Se repitió este procedimiento, pero sólo con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). A la fase acuosa recuperada se le añadieron 2 µL de glucógeno y etanol absoluto frío para precipitar el DNA y se dejó a -70°C por 30 min. Se centrifugó 15 min a 14,000 rpm a 4°C y el DNA se lavó con etanol al 70%. Finalmente, se dejó secar y se hidrató con agua inyectable.

La cuantificación de cromatina se llevó a cabo en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

C) Inmunoprecipitación

Cada inmunoprecipitación se hizo con 10 µg de cromatina, y se reservó el equivalente al 10% de esta cantidad de cromatina, para tomarlo como Input del ensayo. Se añadió buffer de dilución (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA y 1% tritón) para inmunoprecipitar en un volumen máximo de 200 µL. A continuación, se clarificó la cromatina con perlas de Proteína G agarosa (Invitrogen, N° de catálogo 15920-010), previamente equilibradas con el buffer de dilución por 1 hora a 4°C con agitación suave. Se centrifugaron las perlas con la cromatina diluida a 1250

g, 1 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, a cada muestra de cromatina recolectada se le agregaron los anticuerpos correspondientes, todos de la marca Abcam (Tabla 4), y se dejaron incubando toda la noche a 4°C con agitación suave.

Después de haber inmunoprecipitado la cromatina con los anticuerpos durante toda la noche se procedió a bloquear 30 µL de las perlas acopladas a la proteína G con 1 volumen de BSA disueldido al 4%, para cada inmunoprecipitación. Se quitó el remanente de BSA y se hicieron dos lavados con buffer TE pH 8 (10 mM Tris y 1 mM EDTA). En seguida, se añadió la cromatina a las perlas bloqueadas y se dejó incubando 3 horas a 4°C con agitación suave.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados durante la inmunoprecipitación de la cromatina.

Anticuerpo	Catálogo	Concentración Stock	Cantidad	Origen
Anti-H3K4me3	AB8580	1 µg/µL	4 µg	Conejo
Anti-H3K9me2	AB1220	1 µg/µL	4 µg	Rata
Anti-H3K27me1	AB194688	1 µg/µL	4 µg	Conejo
Anti-H3S28p	AB32388	0.12 µg/µL	1 µg	Conejo
Anti-IgG	AB6709	2 µg/µL	4 µg	Conejo

D) Lavados de las perlas

Después de la inmunoprecipitación se realizaron 7 lavados de los complejos DNA-histonas-anticuerpos-perlas cada uno de 5 min con agitación suave a 4°C con los siguientes buffers:

- Lavado 1 y 2: Buffer de dilución (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Tritón X-100).

- Lavado 3: Buffer bajo en sales (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 0.1 % deoxicolato de sodio).
- Lavado 4: Buffer alto en sales (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 0.1 % deoxicolato de sodio).
- Lavado 5: Buffer alto en sales (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM LiCl, 2mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 0.1 % deoxicolato de sodio).
- Lavado 6 y 7: Buffer TE pH 8 (10 mM Tris y 1 mM EDTA).

E) Elución, reversión de entrecruzamiento y purificación del DNA

Al pellet se le añadió 50 µL del Buffer de Elución (25 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM EDTA y 0.5% SDS) y se incubó 15 min a 65°C con agitación suave. En seguida, se centrifugó a 1250 g, 1 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante teniendo cuidado de no aspirar las perlas. Lo anterior se repitió para tener un volumen final eluido de 100 µL.

La reversión del entrecruzamiento DNA-Histonas y la purificación del DNA se llevaron a cabo como se describió previamente. Simultáneamente se hizo la reversión del entrecruzamiento y purificación del Input.

F) Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

Finalmente se cuantificó por medio de qPCR en el equipo StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems), a través de una reacción de 10 µL (Tabla 5) con SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) con base en los programas especificados en el protocolo de termociclado del proveedor (Tabla 6 y 7).

Tabla 5. Reactivos utilizados para realizar la reacción de qPCR.

Reactivo	1 reacción
SYBR Green	5 μ L
H ₂ O	3 μ L
Oligonucleótido Forward (10 μ M)	0.5 μ L
Oligonucleótido Reverse (10 μ M)	0.5 μ L
DNA	1 μ L
Total	10 μ L

Tabla 6. Programa utilizado en la cuantificación (qPCR) para oligonucleótidos con $T_m \geq 60^\circ\text{C}$.

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación de UDG	1	50°C	2 min
Desnaturalización primaria	1	95°C	2 min
Desnaturalización	40	95°C	15 seg
Alineamiento/Extensión		60°C	1 min

Tabla 7. Programa utilizado en la cuantificación (qPCR) para oligonucleótidos con $T_m < 60^\circ\text{C}$.

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación de UDG	1	50°C	2 min
Desnaturalización primaria	1	95°C	2 min
Desnaturalización	40	95°C	15 seg
Alineamiento		T_m de cada oligo	15 seg
Extensión		72°C	1 min

Con todos los experimentos se utilizaron diversos controles, tales como la inmunoprecipitación con un anticuerpo inespecífico (IgG), el input y el control no-templado (NTC). Los oligonucleótidos usados para los ensayos de qPCR se describen en la Tabla 8 y fueron tomados de la literatura. La especificidad de los productos fue corroborada a través de ensayos por curvas de disociación (Anexo 2).

Tabla 8. Características de los oligonucleótidos utilizados para la qPCR.

Oligonucleótido		Secuencia 5' --> 3'	N° de bases	Tm (°C)	Amplicón (Pb)	Referencia
IL-1 β	F	CGTGGGAAAATCCAGTATTTTAATG	25	68	86	Chen, 2009
	R	CAAATGTATCACCATGCAAATATGC	25	68		
IL-17a	F	TCACATGATGCTGTGCAGTAAGAA	24	68	167	Antignano, 2014
	R	TGGTACGAGATAATGGAAACAAAG	24	66		
IL-8	F	CAGAGACAGCAGAGCACAC	19	60	101	Angrisano, 2010
	R	ACGGCCAGCTTGGAAGTC	18	58		
c-FOS	F	GAGCAGTTCCCGTCAATCC	19	60	164	Lau, 2011
	R	GCATTTTCGCAGTTCCTGTCT	20	60		
miR-21	F	TGGCAACACCAGTCGATGGGC	21	68	135	Niu, 2012
	R	AGTGCCACCAGACAGAAGGAC	21	66		
IL-6	F	TCGTGCATGACTTCAGCTTT	20	58	105	Bekkering, 2016
	R	GCGCTAAGAAGCAGAACCAC	20	62		
TNF- α	F	AACCGAGACAGAAGGTGCAG	20	62	145	Li, 2008
	V	TGTGCCAACAACTGCCTTTA	20	58		

F: forward, R: reverse

Resultados

1. Pacientes

Se reclutaron doce pacientes masculinos con quemaduras severas y seis individuos sanos. El promedio de edad de los doce pacientes fue de 31 ± 6 años con un rango de 15 a 81 años. Los datos de edad y sexo de los controles correspondieron con los de los pacientes con quemaduras (Tabla 9). En este estudio, los pacientes presentaron sólo dos tipos de quemadura, ya sea, por fuego o electricidad. La quemadura que mostró mayor frecuencia fue la de fuego ($n=7$), mientras que, la eléctrica la presentaron cinco pacientes. Por otro lado, el porcentaje de la superficie corporal quemada (%SCQ) fue de 37 ± 5 y se presentó desde un 15% hasta un 60%, por lo que, todas entran dentro de la categoría de quemaduras severas. Además, ocho de los pacientes presentaron sepsis entre los 6 y los 12 días post-quemadura. El estado inflamatorio se confirmó con un aumento de IL-6 en plasma a las 24 horas post-quemadura (Tabla 9).

Tabla 9. Demografía y datos clínicos de los pacientes con quemadura y controles.

	Pacientes con quemadura (n=12)	Controles (n=6)	Valor de p
Edad (años) (rango)	31 ± 6 (15-81)	34 ± 8 (15-71)	0.5726
Tipo de quemadura (n) (Fuego/Eléctrica)	7/5	-	-
SCQ (%) (rango)	37 ± 5 (15-60)	-	-
Sepsis (n)	8	-	-
IL-6 en plasma (pg/mL)	907 ± 393	<3	0.0016 (**)

Los datos representan el promedio \pm SEM. El valor de p fue obtenido a partir de la prueba Mann-Whitney (**; $p<0.01$).

2. Ensayos de ChIP

Previamente, en el Laboratorio de Medicina Genómica, CENIAQ-INR, se encontraron niveles diferenciales de algunas PTMs de histona H3 entre pacientes con quemaduras e individuos sanos. Cuatro de las marcas más afectadas fueron H3K4me3, H3K9me2, H3K27me1 y H3S28p, las cuales tienen funciones diferentes a nivel de regulación de la expresión. Adicionalmente, en la literatura se ha reportado la influencia de estas PTMs sobre la expresión de genes involucrados en diversos procesos inflamatorios, incluyendo a los genes de IL-1 β , IL-6, IL-17a, IL-8, c-Fos, miR-21, TNF- α , entre otros. Para analizar la posible implicación de las PTMs alteradas en quemaduras sobre la expresión de genes de respuesta inflamatoria, en este trabajo se realizaron ensayos de ChIP en leucocitos de pacientes con quemaduras severas.

2.1 Estandarización de la técnica de ChIP

Para la estandarización del protocolo de inmunoprecipitación de la cromatina se usaron como base dos protocolos descritos previamente (Hirose et al., 2014; (Hirose et al., 2014; ChIP-IT® PBMC Kit Manual). Después del aislamiento de los leucocitos a partir de las muestras de sangre periférica, estos fueron tratados con formaldehído para realizar el entrecruzamiento DNA-proteínas. Los leucocitos fueron lisados con buffers de lisis específicos y la cromatina fue fragmentada por sonicación. Se estandarizaron las condiciones de fragmentación de la cromatina por sonicación, con el fin de obtener fragmentos de cromatina de un tamaño específico para tener una resolución adecuada de la ChIP. Ya que la fragmentación varía por diversos factores resulta necesario estandarizar las condiciones ideales de sonicación, incluyendo la amplitud (potencia), el número de pulsos, el tiempo total de sonicación, así como los tiempos de descanso (Figura 13). En nuestro caso particular, las condiciones finales de

sonicación fueron 30 pulsos a 10% de amplitud, de 15 segundos de sonicación por 1 minuto de descanso entre cada pulso. Los fragmentos de cromatina se purificaron y se visualizaron en un gel de agarosa, los cuales tuvieron un tamaño aproximado de 300-1000 pb (Figura 13-B).

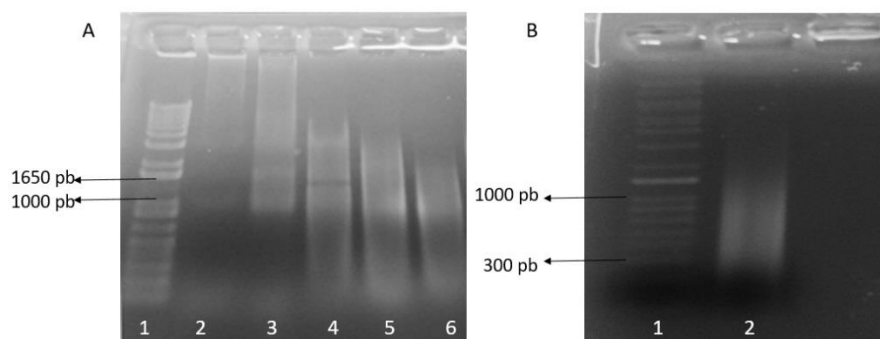


Figura 13. Reversión de entrecruzamiento y optimización de sonicación.

A) Sonicación al 10% de amplitud, usando 20 pulsos (carriles 3, 4, 5) o 40 pulsos (carril 6), cada uno con 30 seg de encendido y 60 seg 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 seg de encendido y 60 seg de descanso. Carril 1, marcador de peso molecular de 1 Kb.

Una vez establecidas las condiciones de fragmentación del DNA, se continuó con la estandarización de las condiciones de inmunoprecipitación. Previamente, Ríos y colaboradores (Rios et al., 2015) reportaron la presencia de la marca H3K27me3 en el promotor de IL-6 en leucocitos humanos, por lo que en este trabajo se usó esta interacción como control positivo para la estandarización de la técnica.

Los resultados de los primeros ensayos mostraron muchas interacciones inespecíficas, como se observa en la Figura 14-A. Para poder disminuir esas interacciones del IgG se realizaron modificaciones en el bloqueo y el lavado de las perlas con que se inmunoprecipita, cambiando; el tiempo y la concentración de BSA, así como las concentraciones de sales y detergentes en

los buffers, y el número de lavados. Con estas nuevas condiciones, fue posible observar la unión específica de la marca H3K27me3 con la región promotora del gen de IL-6 (Figura 14-B).

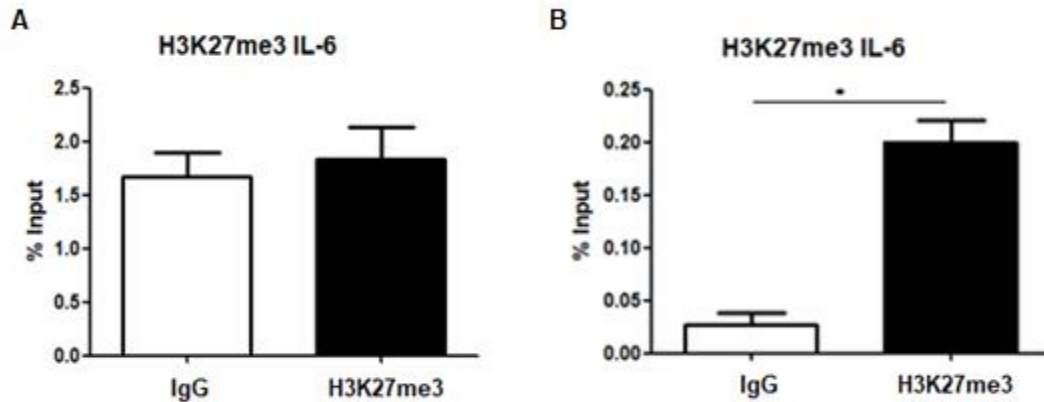


Figura 14. Optimización de las condiciones de inmunoprecipitación de la cromatina.

(A) Ensayos iniciales con inespecificidad en el control IgG. (B) Ensayo con las condiciones finales que muestra la unión específica de la marca H3K27me3 con el promotor del gen de IL-6 (promedio \pm SEM; * $p < 0.05$ con análisis de t-student).

Con base en las condiciones estandarizadas previamente, se realizaron los siguientes ensayos de ChIP usando una mezcla de las muestras de los doce pacientes con quemaduras y por otra parte las de los seis individuos control. Por medio de una cuantificación con SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) se determinaron los porcentajes de cada marca epigenética que se encontraban unidos al promotor en estudio. Los datos se normalizaron con respecto a la cromatina usada como Input.

2.2 Análisis de ChIP en el promotor de IL-1 β

IL-1 β es una citocina implicada en los procesos proinflamatorios. En quemaduras se ha reportado que se encuentra elevada en plasma, tanto en modelos animales como en pacientes pediátricos y adultos (Drost et al., 1993; Finnerty et al., 2006; Gauglitz et al., 2008; Liu et al.,

2015). Con el objetivo de dilucidar el papel de las PTMs alteradas en quemaduras, sobre la regulación de la expresión de IL-1 β , se realizaron ensayos de ChIP con anticuerpos Anti-H3K4me3, Anti-H3K9me2 y Anti-H3K27me1 sobre la región promotora de este gen.

La Figura 15 muestra que hay una disminución de las tres marcas; H3K4me3, H3K27me1 y H3K9me2 en los pacientes con respecto a los controles sanos, mostrando una tendencia muy marcada, principalmente para las dos últimas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se realizaron pruebas estadísticas Mann Whitney, no paramétricas, resultando solamente H3K9me2 con diferencias significativas con un valor de p de 0.0022.

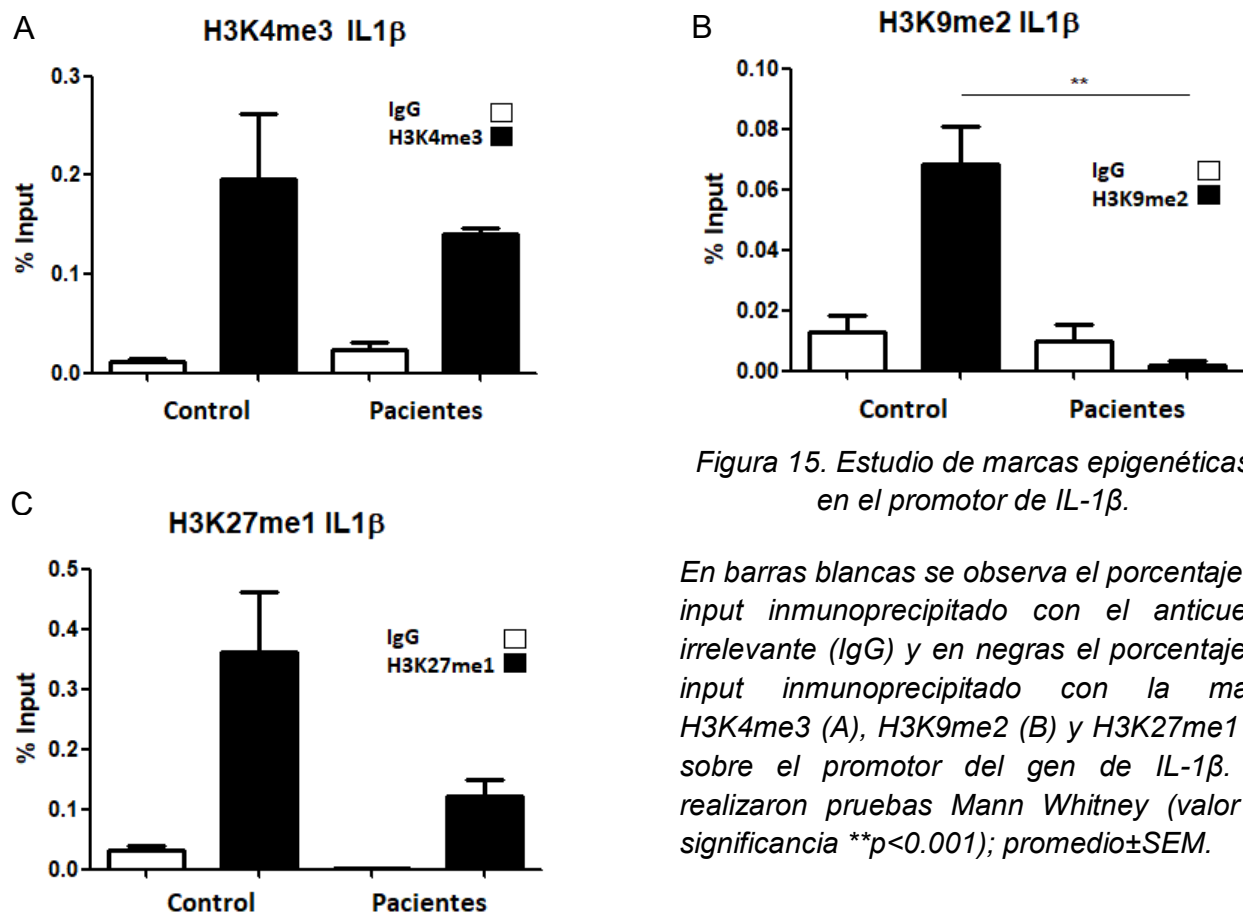


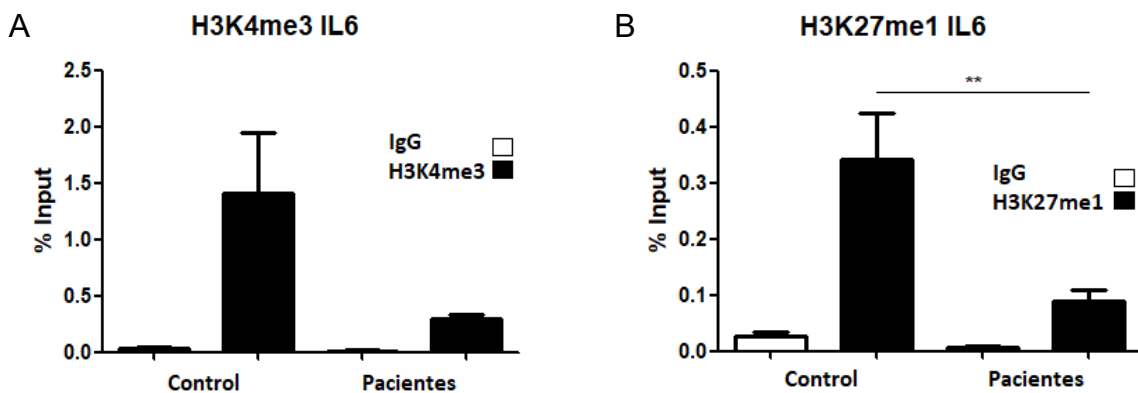
Figura 15. Estudio de marcas epigenéticas en el promotor de IL-1 β .

En barras blancas se observa el porcentaje del input inmunoprecipitado con el anticuerpo irrelevante (IgG) y en negras el porcentaje de input inmunoprecipitado con la marca H3K4me3 (A), H3K9me2 (B) y H3K27me1 (C) sobre el promotor del gen de IL-1 β . Se realizaron pruebas Mann Whitney (valor de significancia $**p < 0.001$); promedio \pm SEM.

2.3 Análisis de ChIP en el promotor de IL-6

Para el caso del análisis en la región del promotor de IL-6 se ocuparon los anticuerpos Anti-H3K4me3, Anti-H3K9me2, Anti-H3K27me1 y Anti-H3S28p. IL-6 es una citocina asociada a importantes funciones inflamatorias y se ha visto implicada en diferentes patologías como artritis reumatoide, cáncer, diabetes, entre otras (Dandona, Aljada, & Bandyopadhyay, 2004; Grivennikov et al., 2009; Srirangan & Choy, 2010). En quemaduras se ha reportado aumentada en plasma inmediatamente después de la lesión tanto en modelos murinos como en humanos (Finnerty et al., 2010; Jeschke et al., 2011).

Los resultados de ChIP, por duplicado y con un análisis estadístico Mann Whitney, arrojaron diferencias significativas sólo para el caso de H3K27me1 con una $p=0.0087$, esto con una disminución de la marca en los pacientes con quemaduras severas (Figura 16-B). La misma tendencia se observa en el caso del ChIP con el anticuerpo H3K4me3, donde hubo una disminución de hasta 4 veces, pero que no tuvo significancia estadística. Por otro lado, H3S28p mostró un ligero aumento en los pacientes con respecto al grupo control, mientras que, no se presentaron cambios entre los grupos con la marca H3K9me2.



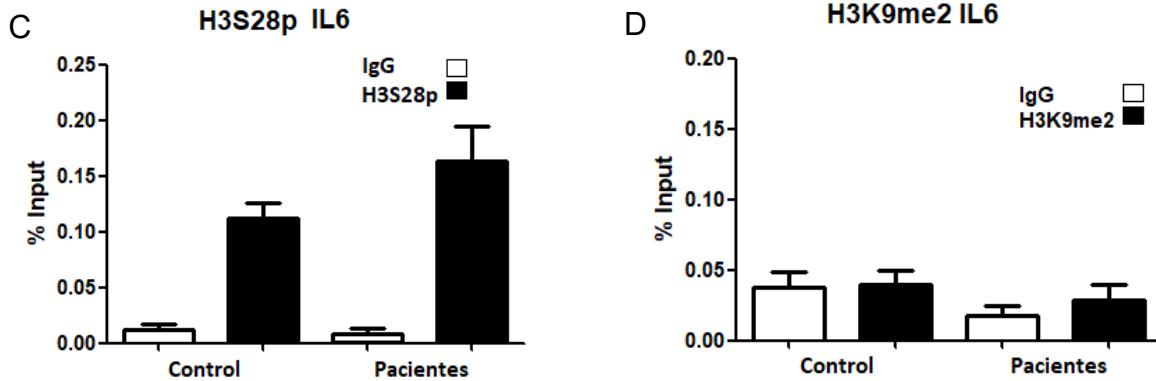


Figura 16. Estudio de marcas epigenéticas en el promotor de IL-6.

En barras blancas se observa el porcentaje del input inmunoprecipitado con el anticuerpo irrelevante (IgG) y en negras el porcentaje de input inmunoprecipitado con la marca H3K4me3 (A), H3K27me1 (B), H3S28p (C) y H3K9me2 (D) sobre el promotor del gen de IL-6. Se realizaron pruebas Mann Whitney (valor de significancia $**p < 0.001$); promedio \pm SEM.

2.4 Análisis de CHIP en *loci* de los genes IL-17a, IL-8, c-FOS, miR-21 y TNF- α .

De la misma manera que con los genes anteriores, se llevó a cabo el ensayo de CHIP para el análisis de la región promotora de otros genes involucrados en respuesta a quemaduras, tales como, IL-17a, IL-8, c-FOS, miR-21 y TNF- α . Para el caso del análisis en la región del promotor de IL-17a e IL-8 se ocupó el anticuerpo Anti-H3K9me2; para c-Fos y miR-21 se usó el anticuerpo Anti-H3S28p y para TNF- α el anticuerpo Anti-H3K4me3, de acuerdo a reportes previos en la literatura (Angrisano et al., 2010; Antignano & Burrows, 2014; Lau & Cheung, 2011; Y. Li et al., 2008; Niu et al., 2012).

Para el caso de H3K9me2, se obtuvo una disminución estadísticamente significativa en el promotor de IL-17a y de IL-8 en pacientes con quemaduras severas con un valor de p de 0.0152 y 0.0250, respectivamente (Figura 17-A y B). Por otro lado, en el promotor de c-Fos y miR-21 se presentó un aumento del enriquecimiento de la marca H3S28p en los pacientes respecto a

los controles sanos (Figura 17-C y D), aunque esta diferencia sólo fue significativa en c-Fos con una $p=0.0367$. Por último, la marca epigenética H3K4me3 resultó estar disminuida en los pacientes (Figura 17-E), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

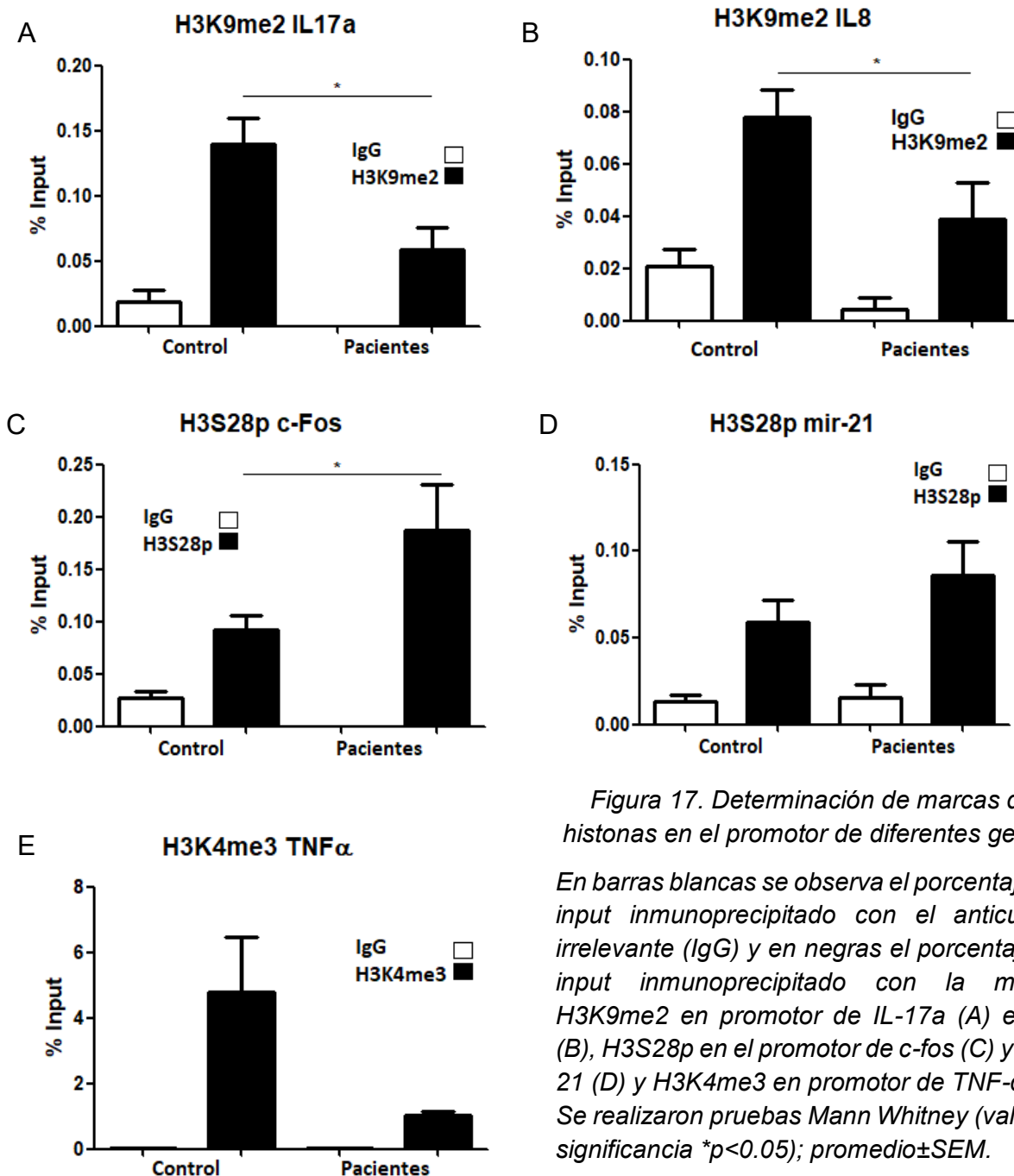


Figura 17. Determinación de marcas de histonas en el promotor de diferentes genes.

En barras blancas se observa el porcentaje del input inmunoprecipitado con el anticuerpo irrelevante (IgG) y en negras el porcentaje de input inmunoprecipitado con la marca: H3K9me2 en promotor de IL-17a (A) e IL-8 (B), H3S28p en el promotor de c-fos (C) y miR-21 (D) y H3K4me3 en promotor de TNF- α (E). Se realizaron pruebas Mann Whitney (valor de significancia $*p<0.05$); promedio \pm SEM.

Discusión

La epigenética estudia las modificaciones del DNA independientes de la cromatina, las cuales, repercuten en la regulación de la información genética. Éstas pueden darse por diversos efectos del ambiente, es decir, los cambios se presentan por el entorno en el que se desarrolla un organismo, tales como, alimentación, ejercicio, el medio ambiente, entre otros. Las quemaduras desencadenan una serie de procesos para poder contrarrestar los daños que causan estas lesiones no sólo a nivel local, sino también a nivel sistémico.

En la actualidad, prácticamente no hay en la literatura evidencia acerca del estudio de alteraciones epigenéticas causadas por las quemaduras severas. Recientemente, en el laboratorio de Medicina Genómica del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) se encontraron alteraciones en las modificaciones postraduccionales (PTM's) de las histonas H3 y H4 en respuesta a quemaduras severas. Sin embargo, la asociación de estas marcas alteradas con *loci* de genes implicados en inflamación no había sido estudiada. En este trabajo, por lo tanto, nos enfocamos en analizar la relación directa de estas marcas diferenciales con genes específicos que están relacionados con la inflamación y que presentan alteraciones importantes en PTM's de las histonas, tanto para la activación como para la represión de la transcripción. Por lo que, este trabajo estaría dando un primer panorama de alteraciones epigenéticas por quemaduras en *loci* específicos de leucocitos, lo cual podría ayudar a establecer teorías acerca de posibles mecanismos moleculares que estén regulando los genes estudiados, los cuales tienen un papel para desencadenar la inflamación exacerbada cuando una persona sufre una lesión por quemadura grave.

Desde hace varios años diversos estudios se han enfocado en caracterizar la respuesta inmune después de una quemadura severa. En éstos se han utilizado con frecuencia los modelos

murinos al ser la respuesta inmune parecida a la de los humanos (Finnerty et al., 2010; Gauglitz et al., 2008; Liu et al., 2015). Asimismo, se han identificado cambios de las citocinas en plasma de pacientes con quemaduras severas y se han demostrado aumentos de: IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, IL-13, GM-CSF, entre otras (Finnerty et al., 2006; Hur et al., 2015; Jeschke et al., 2011).

IL-1 β es un mediador importante de la inflamación, cuya función es llevar a cabo una respuesta proinflamatoria, por ejemplo, actúa como un pirógeno, conduce a la secreción de otras citocinas, activa a células T-helper, etc. Estos efectos, sólo son producidos cuando células como monocitos o macrófagos son estimuladas a través de sus PRR's por los DAMP's y/o PAMP's (Eder, 2009; Lenz et al., 2007). En quemaduras puede existir invasión de microorganismos o liberación de ciertas moléculas por la afectación de la lesión lo que desencadena la activación de PRR's por los DAMP's y/o PAMP's. Además, se describió que IL-1 β aparece aumentada en sangre periférica en modelos murinos (Gauglitz et al., 2008; Liu et al., 2015) y en pacientes con quemaduras graves (Finnerty et al., 2006).

De acuerdo con lo anterior, en nuestros análisis de ChIP, esperábamos un enriquecimiento de las marcas de activación, y una disminución en las de represión en el promotor de IL-1 β en respuesta a las quemaduras, lo que correlacionaría con el aumento en su expresión. Sin embargo, si bien se observó una disminución de la marca de represión H3K9me2, la marca de activación H3K4me3 no mostró un cambio estadísticamente significativo, solo una ligera tendencia, pero también a disminuir. De igual manera, la H3K27me1, una marca que puede actuar como activadora o como represora, tampoco tuvo diferencia significativa, pero si una tendencia clara a disminuir (Figura 15-C). Previamente, Bekkering y sus colaboradores reportan un fenómeno parecido en monocitos de pacientes sintomáticos con aterosclerosis, una enfermedad donde la inflamación tiene un importante papel. En este caso, se propuso que los

57

niveles aumentados de TNF- α en plasma de pacientes se debía principalmente a la disminución de la marca de represión H3K27me₃, y no a la función de la marca de activación H3K4me₃, la cual de hecho estaba disminuida (Bekkering et al., 2016). De esta manera, nosotros proponemos que, en nuestros pacientes, el aumento en los niveles de IL-1 β en respuesta a quemaduras se debe a la reducción de la represión, dada por la disminución de la marca de represión H3K9me₂ en el promotor del gen de IL-1 β . Con lo cual, de manera presuntiva se provocaría una activación de la secreción de interleucina en los pacientes, misma que sería reprimida en los controles al estar la marca de represión aumentada.

IL-6 es una proteína con diversas funciones biológicas. Entre las principales actividades se encuentran que: provoca la producción de proteínas de fase aguda, promueve la infiltración y activación de leucocitos mononucleares, origina la generación de Ig's, así como la diferenciación de células T (Puchner & Blüml, 2014; Schett, 2018). IL-6 es una citocina proinflamatoria que se ha encontrado elevada en plasma en prácticamente todos los reportes en los cuales estudian los efectos de las lesiones graves, así como, en aquellos donde sólo estudian las quemaduras (Hur et al., 2015). En nuestro grupo de pacientes, corroboramos los niveles elevados de IL-6 en plasma, los cuales además fueron usados como referente del estado inflamatorio de los pacientes (Tabla 9).

Los resultados de ChIP para IL-6, nuevamente mostraron que la marca de activación H3K4me₃ no está aumentada en los pacientes, como se había esperado. Las marcas H3K9me₂ y H3S28p tampoco mostraron diferencias significativas. Sin embargo, la marca H3K27me₁ mostró una disminución significativa en los pacientes con quemaduras.

Aunque la marca H3K27me3 es la modificación distintiva de la represión de la transcripción, en este caso, se analizó la H3K27me1 que fue la que mostró diferencias significativas en el perfil de histonas a nivel genómico que se hizo previamente (Figura 10). Esta metilación se ha estudiado menos y lo que se ha reportado ha sido variable. Por una parte, se ha encontrado una asociación de esta marca con un aumento de la misma en los sitios de inicio de la transcripción (TSS) o dentro del cuerpo del gen, necesaria para la activación de la transcripción (Barski et al., 2007; Ferrari et al., 2014). Por otra parte, también se ha visto como una marca de represión (Hoffmann & Palmgren, 2013), presente también en heterocromatina constitutiva (zonas pericentroméricas) silenciando a la cromatina (Peters et al., 2003).

En el presente estudio, los resultados mostraron una disminución de la marca H3K27me1 en el promotor de IL-6 de los leucocitos de los pacientes. Siendo una marca que puede servir para activación o represión, se podría plantear, en este caso, como una marca de represión que, al estar disminuida en los pacientes que sufrieron una quemadura, provoca la activación transcripcional de esta interleucina. No obstante, se requieren más estudios que demuestren esto.

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) es una citocina proinflamatoria producida por monocitos y macrófagos activados. La unión a su receptor (TNF-1R) promueve la activación de diferentes cascadas de señalización. En nuestros ensayos de ChIP en el promotor de TNF- α se encontró una disminución de la marca H3K4me3 en los pacientes de hasta 4 veces comparado con los controles sanos, lo cual apuntaría a una disminución de la transcripción más que a un aumento. Sin embargo, esto coincide con los datos descritos en párrafos anteriores sobre el trabajo de Bekkering en aterosclerosis, en donde se reporta que la trimetilación de la lisina 4 está disminuida en el promotor de TNF- α pero la expresión aumentada, lo que en su caso es debido

a la disminución de los niveles de H3K27me3 (Bekkering et al., 2016). En nuestro caso, no evaluamos marcas de represión, pero queda abierta la posibilidad de que un mecanismo semejante esté operando.

IL-17a es una citocina que tiene como principal función atraer a células del sistema inmune como monocitos y neutrófilos y propagar la inflamación (Kim et al., 2017). Respecto a las implicaciones en las quemaduras se ha reportado que esta interleucina está elevada en muestras de piel en modelos murinos de quemaduras severas (Sasaki, Zhang, & Schwacha 2011) hasta siete días después de la lesión por quemadura (Rani et al., 2015).

De acuerdo a los resultados de ChIP, la marca H3K9me2 está reducida significativamente en los pacientes en el locus de IL-17a, lo que podría estar provocando una menor represión en respuesta a quemadura y el consecuente aumento de esta interleucina. Este resultado es consistente con un reporte previo, en donde, en un modelo murino de inflamación intestinal encuentran que la marca H3K9me2 es removida del locus de IL-17a en células Th17, esto a través de una pérdida de la metiltransferasa G9a. Así mismo, proponen que la ausencia de G9a, que reduce los niveles de H3K9me2, provoca también una reducción en la metilación del DNA que a su vez causa una disminución de los proteínas de unión al DNA-metilado provocando una mayor accesibilidad de la cromatina y en consecuencia una mayor expresión de IL-17a (Antignano & Burrows, 2014).

La interleucina 8 (IL-8) es una quimiocina implicada principalmente en el reclutamiento de neutrófilos, pero también tiene efectos sobre otras células del sistema inmune. Esta es secretada por diferentes células, tales como células endoteliales, células mononucleares de sangre periférica, entre otras (Rollins, 1997).

En diversos reportes previos, esta citocina se ha encontrado aumentada en el plasma de los pacientes con quemaduras (Finnerty et al., 2006; Hur et al., 2015). En nuestro estudio, la marca de represión H3K9me2 se encuentra disminuida en el promotor de IL-8 en los pacientes ($p=0.0250$) respecto a los controles, por lo que, se estaría propiciando la transcripción. Además, Angrisano y cols. (Angrisano et al., 2010) en un modelo de inflamación, encuentra que esta misma marca está disminuida significativamente en el promotor de IL-8 incluso después de 24 horas con el tratamiento con LPS.

Durante una respuesta inmune puede haber una activación de los TLR's, las cuales, activan cascadas de señalización río abajo. Así, diferentes genes de respuesta inmune son expresados por diferentes factores de transcripción, por ejemplo, por NF- κ B o AP-1 (activador proteín-1). Este último es un complejo formado por la proteína c-Fos y c-Jun. Estos factores son capaces de regular la producción de citocinas pro y antiinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IL-10) (Aderem & Ulevitch, 2000). Es un estudio de inflamación en vías aéreas realizado en células ASM de humano encontraron que cuando hay una estimulación con TNF- α , IL-1 β , IL-5 e IL-6 la expresión del RNA de c-fos aumenta (Mckay et al., 2001).

En el presente estudio, se encontró un aumento significativo de H3S28p en el promotor de c-fos de los pacientes con quemaduras. Este resultado es consistente con el reporte de Lau y sus colaboradores, quienes proponen que MSK1 al fosforilar a la H3S28 en el promotor de c-Fos provoca una activación de la transcripción. El mecanismo propuesto por estos autores describe que la H3S28p provoca que el complejo de silenciamiento Polycomb (PRC) se desensamble y se remueva la marca H3K27me3, con lo cual, hay un reclutamiento de acetiltransferasas que hacen el cambio de la trimetilación de la lisina adyacente (K27) a acetilación. La bivalencia de H3K27ac/H3S28p puede atraer a reguladores de la transcripción (Lau & Cheung, 2011). Otro

estudio realizado en macrófagos de ratas estimulados con LPS, también describió que MSK1/2 indirectamente es capaz de modificar la estructura de la cromatina a través de la fosforilación de factores de transcripción (p300/CBP y p65) y la fosforilación de la serina 28 en la histona 3. Lo anterior dio como resultado una activación de genes que median la inflamación (Ifnb1, Il-27, Cxcl10, Tnf e Il12) (Josefowicz et al., 2016).

Aunque también se estudió la fosforilación de la serina 28 en H3 en el promotor del microRNA-21 (miR-21), esta no mostró ningún cambio significativo, sólo una ligera tendencia a aumentar. miR-21 a pesar de no ser un mediador muy caracterizado de la inflamación se ha visto implicado en ella. Feng y cols. reportaron en un modelo de aterosclerosis que hay aumento de miR-21 que regula negativamente la secreción de IL-6 que se acompaña de un aumento de IL-10 (Feng et al., 2014). Casi el mismo hallazgo, pero en un modelo de peritonitis, describe que cuando miR-21 está elevado, disminuye la concentración de TNF- α y se eleva la de IL-10 (Barnett et al., 2016).

Teniendo conocimiento de esto y relacionándolo con los aumentos más significativos y consistentes de citocinas (especialmente IL-6) en plasma de pacientes con quemaduras severas, se esperaba una disminución significativa de la fosforilación que pudiera estar regulando negativamente la activación transcripcional de este RNA no codificante, al menos durante las primeras 24 horas después de la lesión. No obstante, posiblemente pueda estar siendo regulado por otros mecanismos.

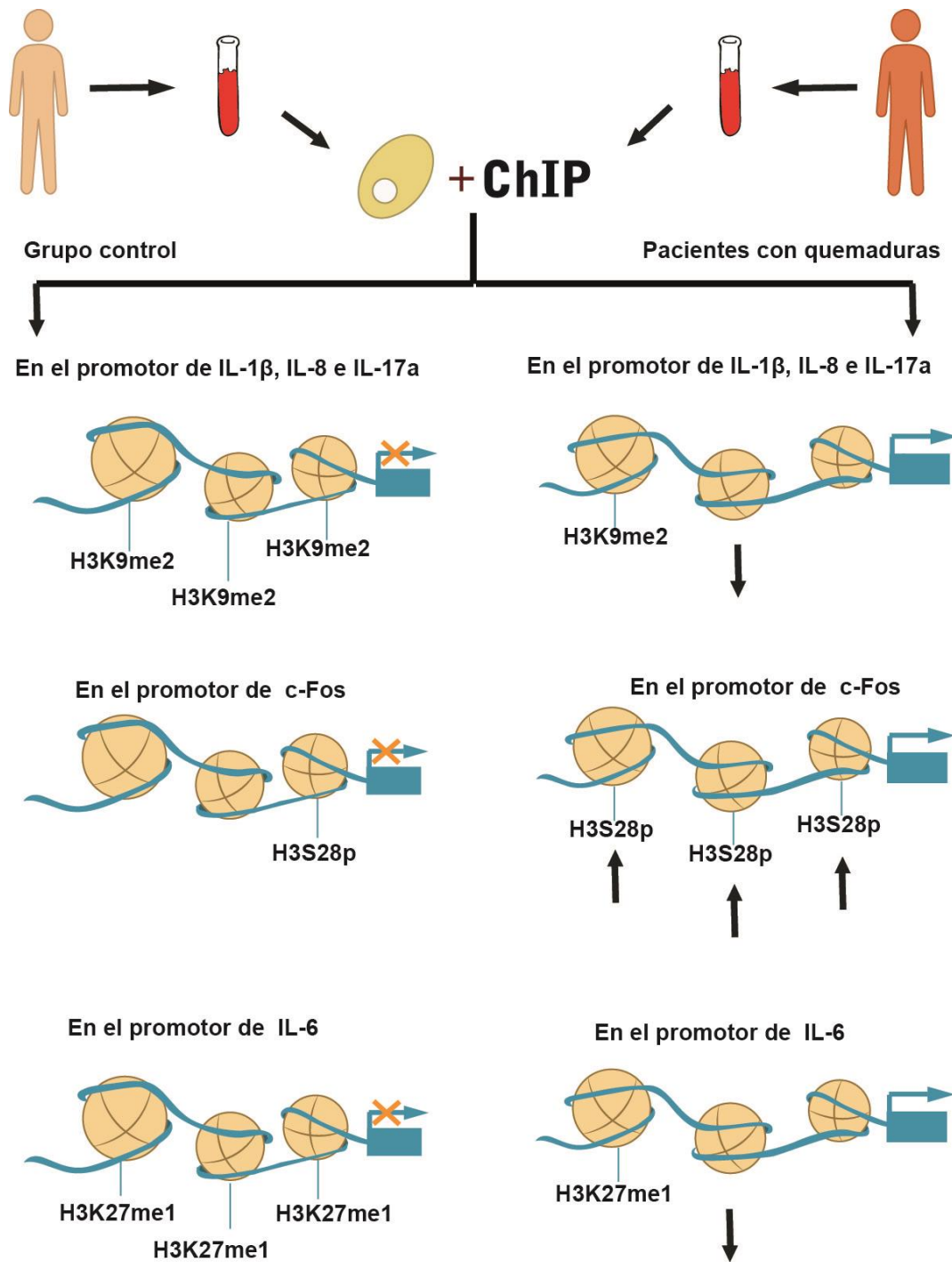


Figura 18. Alteraciones epigenéticas en loci específicos debido a quemaduras severas.

Los resultados muestran una disminución de la marca represiva H3K9me2 en el promotor de IL-1 β , IL-8 e IL-17a que posiblemente esté provocando la activación de estos genes en los pacientes con quemadura. Un aumento de H3S28p en el promotor de c-Fos y una disminución de H3K27me1 en el promotor de IL-6 que podrían estar regulando el aumento de la expresión de estos genes cuando se presenta una quemadura severa.

Conclusiones

Este trabajo es el primer estudio donde se determinan algunas alteraciones epigenéticas por quemaduras en *loci* específicos en leucocitos circulantes. Entre las asociaciones que se observaron están:

- A pesar de que la marca de activación H3K4me3 está disminuida en leucocitos de pacientes con quemaduras, no parece tener un papel relevante en la activación de la transcripción de los genes analizados.
- H3K9me2 es una marca de represión que está disminuida en los pacientes respecto a los controles, particularmente en las regiones promotoras de los genes IL-1 β , IL-8 e IL-17a. Esta disminución de la represión podría estar influyendo en el aumento de la expresión de estas citocinas.
- H3S28p es una marca de activación aumentada en el promotor de c-Fos de los leucocitos de los pacientes que podría estar regulando a la alta la expresión de este gen.
- H3K27me1 posiblemente está actuando como una marca de represión en el promotor del gen de IL-6, y al estar disminuida en los pacientes con quemaduras, podría estar contribuyendo en el aumento de la expresión de esta citocina.

Las asociaciones de las modificaciones de histonas que se encontraron pueden ayudar a determinar los posibles mecanismos moleculares que estén modulando la remodelación de la cromatina y, así, los procesos inflamatorios a causa de una lesión por quemadura severa.

Perspectivas

Realizar más estudios en los que se demuestre una regulación funcional de las asociaciones que se lograron establecer de las marcas de histonas en *loci* específicos involucrados con inflamación, lo que permitirá determinar blancos terapéuticos que proporcionen un mejor tratamiento, así como, marcadores que ayuden a establecer un mejor pronóstico en pacientes con quemaduras severas.

Anexos

Anexo 1. Cartas de consentimiento informado

A) 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 Ceniaq, 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. Así mismo, 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. Así mismo, 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. Así mismo, 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, 6º piso del Ceníaq, Instituto Nacional de Rehabilitación; tel. 59991000 ext 14710, Dr. Oscar Hernández Hernández, Laboratorio de Medicina Genómica, 6º piso del Ceníaq, 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:

- o Relación con el participante: _____
- o 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: _____

B) 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 Ceniaq, 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. Así mismo, 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. Así mismo, 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. Así mismo, 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, 6º piso del Ceniaq, Instituto Nacional de Rehabilitación; tel. 59991000 ext 14710, Dr. Oscar Hernández Hernández, Laboratorio de Medicina Genómica, 6º 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:

- o Relación con el participante: _____
- o 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: _____

Anexo 2. Curvas melt o de fusión que demuestran que sólo hay un producto de reacción para los diferentes oligonucleótidos que se ocuparon al observarse un punto de inflexión (Paneles izquierdos) o un solo pico cuando se efectúa una derivada (paneles derechos).

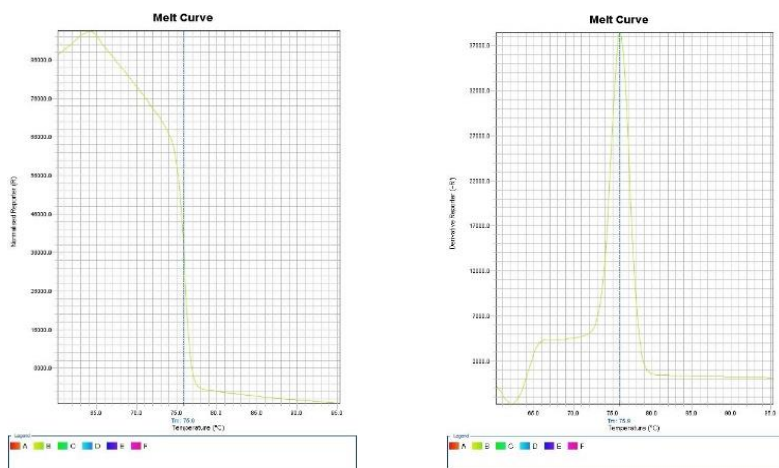


Figura 19. Melt curves de IL-1 β .

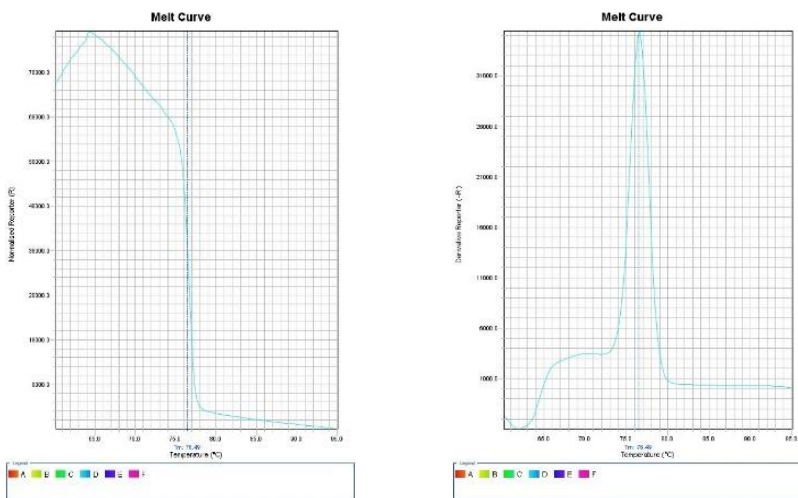


Figura 20. Melt curves de IL-6.

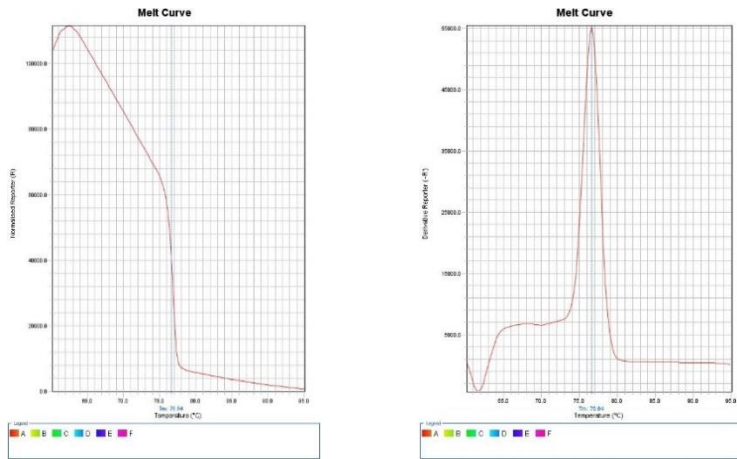


Figura 21. Melt curves de IL-17a.

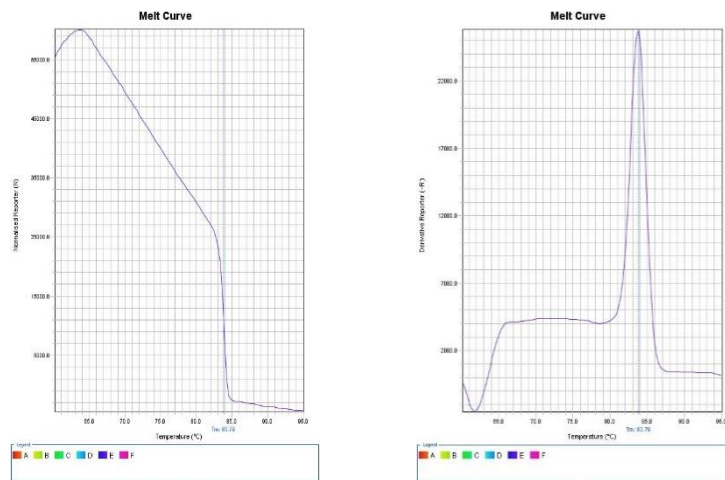


Figura 22. Melt curves de TNF-α.

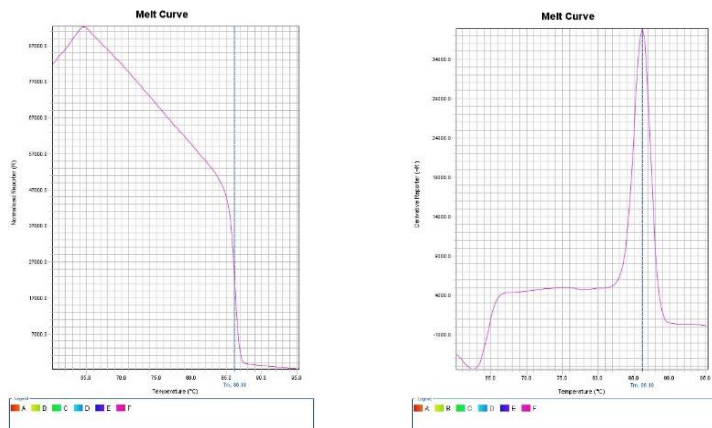


Figura 23. Melt curves de cFos.

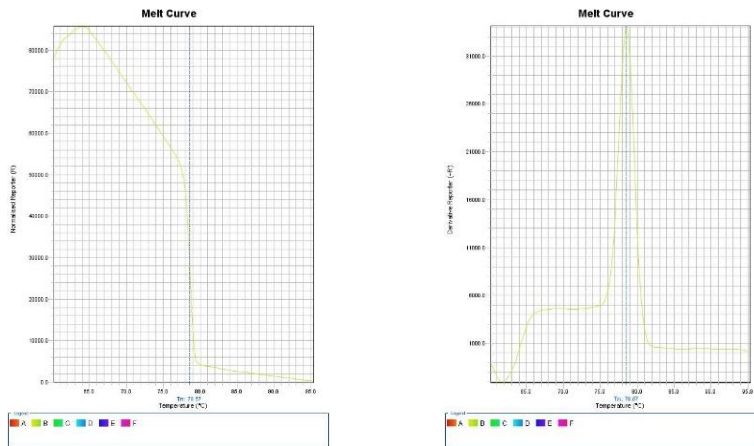


Figura 24. Melt curves de miR-21.

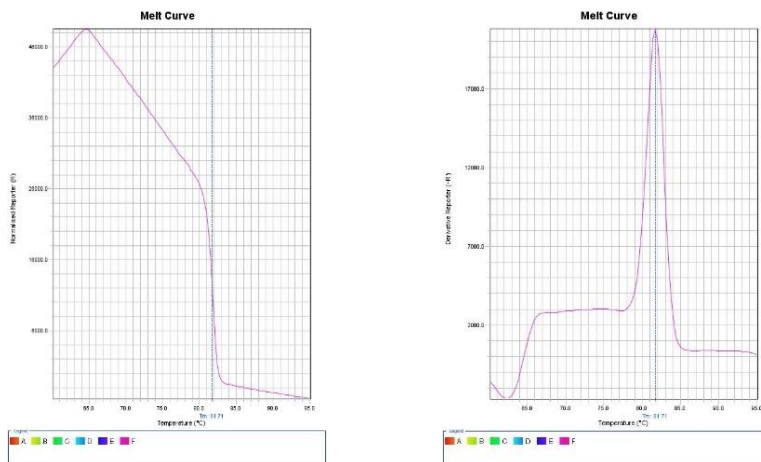


Figura 25. Melt curves de IL-8.

Tabla 10. Programa de termociclado para las curvas de disociación.

Paso	Ramp Rate	Temperatura	Tiempo
1	-----	95°C	15 seg
2	-----	60°C	1 min
3	0.3°C/seg	95°C	15 seg

Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2012). *Inmunología celular y molecular* (7ª edición). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-84-8086-916-4/00025-1>
- Abdullahi, A., Chen, P., Stanojcic, M., Sadri, A.-R., Coburn, N., & Jeschke, M. G. (2017). IL-6 Signal From the Bone Marrow is Required for the Browning of White Adipose Tissue Post Burn Injury. *Shock*, 47(1), 33–39. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000749>
- Aderem, A., & Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406 (August).
- Alberts B., Johnson A., & Lewis J. (2015). *Molecular Biology of The Cell* (6ª edición). Garland Science.
- Allis, C. D., Caparros, M., Jenuwein, T., & Reinberg, D. (2015). *Epigenetics* (2ª edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Angrisano, T., Pero, R., Peluso, S., Keller, S., Sacchetti, S., Bruni, C. B., ... Lembo, F. (2010). LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-172>
- Antignano, F., & Burrows, K. (2014). Methyltransferase G9A regulates T cell differentiation during murine intestinal inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 1–11. <https://doi.org/10.1172/JCI69592.epithelial>
- Arturson, G. (1996). Pathophysiology pharmacological lecture. *Elsevier*, 22(4), 255–274.
- Asimes, A. D., Torcaso, A., Pinceti, E., Kim, C. K., Zeleznik-Le, N. J., & Pak, T. R. (2017). Adolescent binge-pattern alcohol exposure alters genome-wide DNA methylation patterns in the hypothalamus of alcohol-naïve male offspring. *Alcohol*, 60, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2016.10.010>
- Balk, R. A. (2014). Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): Where did it come from and is it still relevant today? *Virulence*, 5(1), 20–26. <https://doi.org/10.4161/viru.27135>
- Barnett, R. E., Conklin, D. J., Ryan, L., Keskey, R. C., Ramjee, V., Sepulveda, E. A., ... Cheadle, W. G. (2016). Anti-inflammatory effects of miR-21 in the macrophage response to peritonitis, *Journal of Leukocyte Biology*, 99(February), 1–11. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A1014-489R>
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T., Schones, D. E., & Wang, Z. (2007). Resource High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome, *Cell*, 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- Bekkering, S., van den Munckhof, I., Nielen, T., Lamfers, E., Dinarello, C., Rutten, J., ... Riksen, N. P. (2016). Innate immune cell activation and epigenetic remodeling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo. *Atherosclerosis*, 254, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.019>
- Brehove, M., Wang, T., North, J., Luo, Y., Dreher, S. J., Shimko, J. C., ... Poirier, M. G. (2015). Histone Core Phosphorylation Regulates DNA Accessibility, *Journal of Biological Chemistry*, 290(37), 22612–22621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661363>
- Burmeister, D. M., McIntyre, M. K., Baker, B. A., Rizzo, J. A., Brown, A., Natesan, S., ... Christy, R. J. (2016). Impact of Isolated Burns on Major Organs: A Large Animal Model Characterized. *Shock*, 46(3S), 137–147. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000662>

- Carson, W. F., & Kunkel, S. L. (2017). *Regulation of Cellular Immune Responses in Sepsis by Histone Modifications. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 106). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2016.08.004>
- Chen, X., El Gazzar, M., Yoza, B. K., & McCall, C. E. (2009). The NF- κ B factor RelB and histone H3 lysine methyltransferase G9a directly interact to generate epigenetic silencing in endotoxin tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 284(41), 27857–27865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000950>
- Chen, X., Xia, Z., Wei, D., Han, S., Ben, D., & Wang, G. (2003). Role of p38 mitogen-activated protein kinase in Kupffer cell secretion of the proinflammatory cytokines after burn trauma. *Elsevier*, 29, 533–539. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(03\)00147-5](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(03)00147-5)
- Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., & Lindsay, R. (2006). Burn wound infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 403–434. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.403>
- Ciarlo, E., Savva, A., & Roger, T. (2013). Epigenetics in sepsis: Targeting histone deacetylases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(SUPPL.1), S8–S12. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.004>
- Colín-Castro, C., Chávez-Heres, T., Magaña, J. J., & Franco-Cendejas, R. (2017). Microorganismos bacterianos asociados a infección del torrente sanguíneo en pacientes con quemaduras de un centro de referencia de la Ciudad de México. *Investigación en Discapacidad*, 6(2), 50–56.
- Dandona, P., Aljada, A., & Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology*, 25(1), 4–7.
- De Groote, M. L., Verschure, P. J., & Rots, M. G. (2012). Epigenetic Editing: Targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic Acids Research*, 40(21), 10596–10613. <https://doi.org/10.1093/nar/gks863>
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., & Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: Protein lysine methyltransferases. *Genome Biology*, 6(8). <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-227>
- Drost, A. C., Burleson, D. G., Cioffi, W. G., Jordan, B. S., Mason, A. D., & Pruitt, B. A. (1993). Plasma cytokines following thermal injury and their relationship with patient mortality, burn size, and time postburn. *The Journal of Trauma*, 35(3).
- Eder, C. (2009). Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology*, 214(7), 543–553. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.007>
- Evers, L. H., Bhavsar, D., & Mailänder, P. (2010). The biology of burn injury. *Experimental Dermatology*, 19(9), 777–783. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x>
- Feng, J., Li, A., Deng, J., Yang, Y., Dang, L., Ye, Y., ... Zhang, W. (2014). miR-21 attenuates lipopolysaccharide-induced lipid accumulation and inflammatory response: potential role in cerebrovascular disease. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-27>
- Ferrari, K. J., Scelfo, A., Jammula, S., Cuomo, A., Barozzi, I., & Stu, A. (2014). Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity. *Cell*, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.030>
- Finnerty, C. C., Herndon, D. N., Przkora, R., Pereira, C. T., Oliveira, H. M., Queiroz, D. M. M., ... Jeschke, M. G. (2006). Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients. *Shock*,

26(1), 13–19. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000223120.26394.7d>

- Finnerty, C. C., Jeschke, M. G., Qian, W. J., Kaushal, A., Xiao, W., Liu, T., ... Herndon, D. N. (2013). Determination of burn patient outcome by large-scale quantitative discovery proteomics. *Critical Care Medicine*, 41(6), 1421–1434. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31827c072e>
- Finnerty, C. C., Przkora, R., Herndon, D. N., & Jeschke, M. G. (2010). Cytokine expression profile over time in burned mice. *Cytokine*, 45(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.10.005>.
- Foster, S. L., Hargreaves, D. C., & Medzhitov, R. (2007). Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, 447(7147), 972–978. <https://doi.org/10.1038/nature05836>
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., ... Esteller, M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins, *PNAS*, 102(30), 10–15.
- García-Alonso, I. (1995). Quemaduras. *Traumatismos por agentes físicos: quemaduras*. (1–7).
- Gauglitz, G. G., Song, J., Herndon, D. N., Finnerty, C. C., Boehning, D., Barral, J. M., & Jeschke, M. G. (2008). Characterization of the Inflammatory Response During Acute and Post-Acute Phases After Severe Burn. *Shock*, 30(5), 503–507. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31816e3373>
- Geovanni, H., Teresa, M., & Jaimes, A. (2015). Características inmunológicas claves en la fisiopatología de la sepsis. *Elsevier*, 19(1), 40–46.
- Gorla, R., Erbel, R., Eagle, K. A., & Bossone, E. (2018). *Systemic inflammatory response syndromes in the era of interventional cardiology*. *Vascular Pharmacology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.04.003>
- Greenhalgh, D. G. (2017). Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population, *Burns & Trauma*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s41038-017-0089-5>
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G., & Vallabhapurapu, S. (2009). Article IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Elsevier*, 15, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.001>
- Guo, A., Gu, H., Zhou, J., Mulhern, D., Wang, Y., Lee, K. A., ... Comb, M. J. (2014). Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(1), 372–387. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.027870>
- Hazeldine, J., Hampson, P., & Lord, J. M. (2016). The diagnostic and prognostic value of systems biology research in major traumatic and thermal injury: a review. *Burns & Trauma*, 4(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s41038-016-0059-3>
- Hettiaratchy, S. (2004). Pathophysiology and types of burns. *Bmj*, 328(7453), 1427–1429. <https://doi.org/10.1136/bmj.328.7453.1427>
- Hirose, T., Virnicchi, G., Tanigawa, A., Naganuma, T., Li, R., Kimura, H., ... Pierron, G. (2014). NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Molecular Biology of the Cell*, 25(1), 169–183. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0558>
- Hoffmann, R. D., & Palmgren, M. G. (2013). Epigenetic Repression of Male Gametophyte-Specific Genes in the Arabidopsis Sporophyte. *Molecular Plant*, 6(4), 1176–1186. <https://doi.org/10.1093/mp/sst100>
- Hur, J., Yang, H. T., Chun, W., Kim, J. H., Shin, S. H., Kang, H. J., & Kim, H. S. (2015). Inflammatory cytokines and their prognostic ability in cases of major burn injury. *Annals of Laboratory Medicine*,

35(1), 105–110. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.1.105>

- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(4), e324-22. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>
- Hyun, N. C., Everts, V., & Ampornaramveth, R. S. (2017). Histone desacetylases and their roles in mineralized tissue regeneration. *Bone reports*, 7, 33-40.
- Isidro-Kekliklián, R. & Virginia-Coronel, A. (2018). Microbioma y Epigenética en Perinatología: 1000 días que pueden cambiar destinos. *Microbioma, Epigenética y Prevención en Perinatología*. (pp. 139–178).
- Ito, K. (2007). Impact of post-translational modifications of proteins on the inflammatory process. *Biochemical Society Transactions*, 35(2), 281–283. <https://doi.org/10.1042/BST0350281>
- Jeltsch, A., & Jurkowska, R. Z. (2014). New concepts in DNA methylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(7), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.05.002>
- Jeschke, M. G., Chinkes, D. L., Finnerty, C. C., Kulp, G., Suman, O. E., Norbury, W. B., ... Herndon, D. N. (2008). The Pathophysiologic Response To Severe Burn Injury. *Annals fo Surgery*, 248(3), 387–401. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181856241>.THE
- Jeschke, M. G., Gauglitz, G. G., Kulp, G. A., Finnerty, C. C., Williams, F. N., Kraft, R., ... Herndon, D. N. (2011). Long-term persistence of the pathophysiologic response to severe burn injury. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021245>
- Josefowicz, S. Z., Shimada, M., Armache, A., Li, C. H., Miller, R. M., Lin, S., ... Allis, C. D. (2016). Chromatin Kinases Act on Transcription Factors and Histone Tails in Regulation of Inducible Transcription. *Molecular Cell*, 64(2), 347–361. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.026>
- Kim, A., Lang, T., Xue, M., Wijewardana, A., Jackson, C., & Vandervord, J. (2017). The Role of Th-17 Cells and $\gamma\delta$ T-Cells in Modulating the Systemic Inflammatory Response to Severe Burn Injury. *International Journal of Molecular Science*, 2, 1–6. <https://doi.org/10.3390/ijms18040758>
- Lau, P. N. I., & Cheung, P. (2011). Histone code pathway involving H3 S28 phosphorylation and K27 acetylation activates transcription and antagonizes polycomb silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2801–2806. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012798108>
- Lenz, A., Franklin, G. A., & Cheadle, W. G. (2007). Systemic inflammation after trauma. *Injury*, 38(12), 1336–1345. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.10.003>
- Li, J., Xu, J., Qin, X., Yang, H., Han, J., Jia, Y., ... Gao, F. (2018). Acute pancreatic beta cell apoptosis by IL-1 β is responsible for postburn hyperglycemia: Evidence from humans and mice. *BBA - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.005>
- Li, M., Gong, A., Zhang, X., Wang, Y., Mathy, N. W., Martins, G. A., ... Chen, X. (2018). Induction of a Long Noncoding RNA Transcript, NR_045064, Promotes Defense Gene Transcription and Facilitates Intestinal Epithelial Cell Responses against Cryptosporidium Infection. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800566>
- Li, Y., Reddy, M. A., Miao, F., Shanmugam, N., Yee, J. K., Hawkins, D., ... Natarajan, R. (2008). Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF- κ B-dependent inflammatory genes: Relevance to diabetes and inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), 26771–26781. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802800200>
- Liu, L., Li, X., Yang, J., Chai, J., Yu, Y., Duan, H., ... Du, J. (2015). Comparison of systemic inflammation

response and vital organ damage induced by severe burns in different area. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6367–6376.

- Lloyd, E. C. O., Rodgers, B. C., Michener, M., & Williams, M. S. (2012). Outpatient Burns: Prevention and Care, 25–32.
- Lord, J. M., Midwinter, M. J., Chen, Y. F., Belli, A., Brohi, K., Kovacs, E. J., ... Lilford, R. J. (2014). The systemic immune response to trauma: An overview of pathophysiology and treatment. *The Lancet*, 384(9952), 1455–1465. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60687-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60687-5)
- Manning, J. (2018). Sepsis in the Burn Patient. *Critical Care Nursing Clinics of NA*. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2018.05.010>
- Marmorstein, R., & Zhou, M. (2015). Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Epigenetics*, 117–142. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>
- Mazzio, E. A., & Soliman, K. F. (2012). Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*, 7(2), 119–130. <https://doi.org/10.4161/epi.7.2.18764>
- McKay, S., Bromhaar, M. M. G., Jongste, J. C. De, & Hoogsteden, H. C. (2001). Pro-inflammatory cytokines induce c-fos expression followed by IL-6 release in human airway smooth muscle cells. *Mediators of Inflammation*, 10, 135–142. <https://doi.org/10.1080/09629350120072707>
- Medzhitov, R., & Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature Reviews Immunology*, 9(10), 692–703. <https://doi.org/10.1038/nri2634>
- Miao, F., Smith, D. D., Zhang, L., Min, A., Feng, W., & Natarajan, R. (2008). Lymphocytes From Patients With Type 1 Diabetes Display a Distinct Profile of Chromatin Histone H3 Lysine 9 Dimethylation. *Diabetes*, (C), 2005–2008. <https://doi.org/10.2337/db08-0645>.
- Moctezuma-Paz, L. Páez-Franco, I., Sánchez-Flores, A. Y., Xellic, N., & Riva, A. (2015). Epidemiología de las quemaduras en México. Epidemiology of burns in Mexico. *Rev Esp Méd Quir*, 20(20), 78–82. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2015/rmq151m.pdf>
- Niu, J., Shi, Y., Tan, G., Yang, C. H., Fan, M., Pfeffer, L. M., & Wu, Z. H. (2012). DNA damage induces NF-κB-dependent MicroRNA-21 up-regulation and promotes breast cancer cell invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 21783–21795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.355495>
- Oryan, A., Alemzadeh, E., & Moshiri, A. (2017). Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. *Wound Care*, 26(1), 5–19.
- Ozturk, G., Ozturk, N., & Aksoy, H. (2009). Hepatocellular Damage Following Burn Injury Demonstrated by a More Sensitive Marker: Alpha-Glutathione S -Transferase. *Journal of Burn Care y and Research*, 711–716. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e3181abfd65>
- Perišić, O., Colleparado-Guevara, R., & Schlick, T. (2010). Modeling studies of chromatin fiber structure as a function of DNA linker length. *Journal of Molecular Biology*, 403(5), 777–802. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.057>
- Peters, A. H. F. M., Kubicek, S., Mechtler, K., Sullivan, R. J. O., Derijck, A. A. H. A., Perez-burgos, L., ... Jenuwein, T. (2003). Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Cell*, 12, 1577–1589.
- Pham, T. X., & Lee, J. Y. (2017). Epigenetic regulation of adipokines. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms18081740>

- Puchner, A., & Blüml, S. (2014). IL-6 blockade in chronic inflammatory diseases, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10354-014-0321-x>
- Quénet, D., McNally, J. G., & Dalal, Y. (2012). Through thick and thin: The conundrum of chromatin fibre folding in vivo. *EMBO Reports*, 13(11), 943–944. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.143>
- Rae, L., Fidler, P., & Gibran, N. (2016). The Physiologic Basis of Burn Shock and the Need for Aggressive Fluid Resuscitation. *Critical Care*, <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2016.06.001>
- Rani, M., Zhang, Q., & Schwacha, M. G. (2015). Burn Wound γδ T-Cells Support a Th2 and Th17 Immune Response Meenakshi. *Journal of Burns Care*, 35(1), 46–53. <https://doi.org/10.1097/01.bcr.0000440705.91099.cc.Burn>
- Rios, E. C. S., Szczesny, B., Soriano, F. G., Olah, G., & Szabo, C. (2015). Hydrogen sulfide attenuates cytokine production through the modulation of chromatin remodeling. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(6), 1741–1746. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2176>
- Rollins, B. B. J. (1997). Chemokines. *Blood*, 90(3), 909–929.
- Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation. A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7(10), 1098–1108.
- Sasaki, J. R., Qiong Z., & Schwacha, M. G. (2012). Burn Induces a Th-17 Inflammatory Response at the Injury Site. *Burns*, 37(4), 646–651. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.01.028>.Burn
- Schett, G. (2018). Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. *Rheumatology*, (August 2017), 43–50. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex513>
- Secretaría de Salud/STCONAPRA. (2016). *Modelo para la Prevención de Quemaduras en Grupos Vulnerables en México*.
- Serizay, J., & Ahringer, J. (2018). Genome organization at different scales: nature, formation and function. *Cell Biology*, 52, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.009>
- Shi, D. Q., Ali, I., Tang, J., & Yang, W. C. (2017). New insights into 5hmC DNA modification: Generation, distribution and function. *Frontiers in Genetics*, 8(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00100>
- Srirangan, S., & Choy, E. H. (2010). The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2(5), 247–256. <https://doi.org/10.1177/1759720X10378372>
- Stanojcic, M., Abdullahi, A., Rehou, S., Parousis, A., & Jeschke, M. G. (2016). Pathophysiological Response to Burn Injury in Adults. *Annals of Surgery*, XX(XX), 1–9. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002097>
- Tessarz, P., & Kouzarides, T. (2014). Histone phosphorylation. A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Nature Publishing Group*, 15(11), 703–708. <https://doi.org/10.1038/nrm3890>
- Urahama, T., Harada, A., Maehara, K., Horikoshi, N., Sato, K., Sato, Y., ... Kimura, H. (2016). Histone H3 . 5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics & Chromatin*, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0051-y>
- Warner, D. S., & Martyn, J. A. J. (2015). Acute and Perioperative Care of the Burn-injured Patient. *Anesthesiology*, 122(2), 448–464.

- Weiterer, S., Uhle, F., Lichtenstern, C., Siegler, B. H., Bhujra, S., Jarek, M., ... Weigand, M. A. (2015). Sepsis induces specific changes in histone modification patterns in human monocytes. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121748>
- Wilson, A. G. (2008). Epigenetic Regulation of Gene Expression in the Inflammatory Response and Relevance to Common Diseases. *Journal of Periodontology*, *79*(8s), 1514–1519. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080172>
- Xiao, W., Mindrinos, M. N., Seok, J., Cuschieri, J., Cuenca, A. G., Gao, H., ... Tompkins, R. G. (2011). A genomic storm in critically injured humans. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(13), 2581–2590. <https://doi.org/10.1084/jem.20111354>
- Xu, J., Ma, H., Jin, J., Uttam, S., Fu, R., Huang, Y., & Liu, Y. (2018). Super-Resolution Imaging of Higher-Order Chromatin Structures at Different Epigenomic States in Single Mammalian Cells Article Super-Resolution Imaging of Higher-Order Chromatin Structures at Different Epigenomic States in Single Mammalian Cells. *CellReports*, *24*(4), 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.085>
- Xu, S., Kamato, D., Little, P. J., & Nakagawa, S. (2018). Targeting epigenetics and non-coding RNAs in atherosclerosis: From mechanisms to therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.003>
- Zhou, Z., Lin, Z., Pang, X., Tariq, M. A., Ao, X., & Wang, J. (2018). Epigenetic regulation of long non-coding RNAs in gastric cancer, *9*(27), 19443–19458.