



Instituto Nacional
de Rehabilitación
Luis Guillermo Ibarra Ibarra



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MÉXICO



Posgrado en
Biología Experimental



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biología Experimental

“El papel de los microRNAs en el proceso de cicatrización de quemaduras de piel”

TESIS

Para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

José María Hidalgo Sánchez

Matricula: 2233804023

josemariahs18@gmail.com

Director:

Dra. Edna Ayerim Mandujano Tinoco

Codirector:

Dr. Héctor Fernando Serrano

Asesor:

Dr. Aarón Vázquez Jiménez

JURADO

Presidente:

Dr. Gerardo Blancas Flores

Secretario:

Dr. René Fernando Abarca Buis

Vocal:

Dr. Aarón Vázquez Jiménez

Vocal:

M.C.S. José Francisco González García

Iztapalapa, Ciudad de México a 1 de diciembre 2025

El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de CONAHCYT, registrado 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Concejo, clave 2003IMPTNNN0020.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM–Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONAHCYT, con un número de becario 4013937 / CVU 1249244, en el periodo Diciembre 2023–Noviembre 2025.

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, bajo la dirección de la Dra. Edna Ayerim Mandujano Tinoco. Además del laboratorio de Biología Molecular y Regulación Endócrina, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa., bajo la dirección del Dr. Héctor Fernando Serrano. Y el laboratorio de Biología de Sistemas enfocado a Enfermedades Humanas del Instituto Nacional de Medicina genómica., bajo la dirección del Dr. Aarón Vázquez Jiménez.

Declaración de originalidad

El que suscribe **José María Hidalgo Sánchez** alumno del posgrado en **Biología Experimental** de la División en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis titulada **"El Papel de los microRNAs en el proceso de cicatrización de quemaduras de piel"**

Declaro que:

1. La tesis que presento ante H. Jurado para la obtención de grado de Maestra en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a surgir en esta alumna persona física o moral que se le adjudique sobre dicho bien, respecto a la originalidad de este trabajo y, de esta manera, sobre las consecuencias económicas y jurídicas a esta le resulten de mi creación.

La presente declaración de originalidad es firmada en la Ciudad de México el 1 de diciembre del 2025.

Atentamente



Bio.Exp. José María Hidalgo Sánchez

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académico del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis titulada **"El Papel de los microRNAs en el proceso de cicatrización de quemaduras de piel"** que presenta José María Hidalgo Sánchez con fecha de examen 1 de diciembre de 2025.

Firmas

Dr. Gerardo Blancas Flores
Presidente



UAM-I Departamento de Ciencias de la Salud DCBS.
gera@xanum.uam.mx

Dr. René Fernando Abarca Buis
Secretario



Instituto Nacional de Rehabilitación
rabarca@inr.gob.mx

Dr. Aarón Vázquez Jiménez
Vocal



Instituto Nacional de Medicina Genómica
avazquez@inmegen.gob.mx

M.C.S. José Francisco González García
Vocal



Instituto Nacional de Rehabilitación
jeik79@hotmail.com

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA EXTERNA

Dra. Edna Ayerim Mandujano Tinoco. Laboratorio de Tejido Conjuntivo, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra"

emandujano@inr.gob.mx, Tel. 55 5999 1000, Ext. 14706

DIRECTOR INTERNO

Dr. Héctor Fernando Serrano. Laboratorio de Biología Molecular y Regulación Endócrina, Dpto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

hser@xanum.uam.mx, Tel. 5539300413.

ASESOR

Dr. Aarón Vásquez Jiménez. Laboratorio de Biología de Sistemas enfocado a Enfermedades Humanas, Instituto Nacional de Medicina genómica.

avazquez@inmegen.gob.mx, Tel.5553501900, Ext. 1553

AGRADECIMIENTOS

En principio, quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Edna Ayerim Mandujano Tinoco, quien siempre me apoyó para llevar de la mejor manera mi proceso en la maestría. La Dra. Edna me confirmó que las distancias no son un impedimento cuando dos personas muestran interés por igual; realmente fue justo lo contrario, esta ha sido una de las etapas de mi vida en las que más me he sentido acompañado. Siempre estuvo en los momentos más determinantes. Nunca conocí a una persona tan entusiasta y comprometida con su trabajo. Gracias a todo ese apoyo y motivación pude crecer de manera profesional y como persona a lo largo de estos dos años. De nuevo, muchas gracias, Dra. Edna.

Al Dr. Aarón Vázquez Jiménez, por todo su apoyo en mi etapa de aprendizaje. Gracias a usted pude dar el paso y perder el miedo a programar. Espero que este proyecto sea el inicio de muchos en los que siga utilizando todo ese aprendizaje que adquirí en su laboratorio, gracias.

Al Dr. Héctor Fernando Serrano, por toda su calidad humana. No terminaré de agradecer todo lo que hizo por mí. Gracias por toda la paciencia y disponibilidad, por todos los consejos y propuestas respecto al proyecto y a mi vida en general. La mejor manera de recompensarle es intentar ser mejor cada día, muchas gracias.

Al Posgrado en Biología Experimental, por todo el aprendizaje que adquirí. Sin duda es un programa de mucha calidad, gracias.

Al CONAHCYT (número de becario 4013937/CVU 1249244), que me permitió mantenerme económicamente, lo cual me permitió concluir en tiempo y forma la maestría.

Al Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación, específicamente al M.C.B. Francisco González García y al Dr. René Abarca Buis, que desde el primer día que llegué al laboratorio siempre mostraron una gran gentileza y un gran apoyo a mi persona. Fueron de mucha ayuda para lograr concretar partes fundamentales de mi proyecto.

Al M.B.E. José Edwin Dolores García, por todo su apoyo para enseñarme varias técnicas en biología molecular, principalmente la PCR en tiempo real.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Esta tesis de maestría está dedicada a toda mi familia, compuesta por mi padre, José Adrián Hidalgo García; mi madre, Luciana Sánchez Sánchez, y mi hermano, Diego Adriel Hidalgo Sánchez, quienes siempre han sido mis mayores motores para continuar con todos mis propósitos en la vida. A pesar de las adversidades que hemos pasado juntos, el amor que nos caracteriza ha sido lo suficientemente fuerte para seguir adelante. Principalmente, gracias, mamá, porque por muchas razones, si no fuera por ti, nunca habría logrado todo lo que hasta hoy he podido vivir.

Por otro lado, agradezco a Dios y a la sintonía de la vida por permitir que todo esto se haya logrado.

No suelo hacer esto, pero gracias a mí, por toda la resiliencia que mostré durante estos años de maestría. Nunca había vivido solo; fue complejo iniciar una etapa así. Sin embargo, espero que sea el comienzo de una etapa próspera de independencia que me permita seguir creciendo en todos los contextos. Gracias, Chema.

RESUMEN

Antecedentes. Las quemaduras profundas de segundo grado constituyen una de las lesiones cutáneas más graves y representan un desafío clínico por su asociación con alteraciones del microambiente tisular que favorecen la formación de cicatrices hipertróficas. La cicatrización por quemaduras es un proceso dinámico que integra fases de inflamación, proliferación y remodelación, reguladas por señales químicas y mecánicas que coordinan la respuesta celular. Los microRNAs (miRNAs), moduladores postranscripcionales de la expresión génica, participan en múltiples procesos de reparación tisular; sin embargo, los análisis globales de miRNAs en el contexto específico de quemaduras profundas siguen siendo escasos.

Métodos. Se desarrolló un modelo murino de quemadura profunda de segundo grado en ratones Balb/c. A las 24 horas post-lesión se obtuvo tejido sano y lesionado para la extracción de RNA total enriquecido en miRNAs. Se realizó secuenciación de RNAs pequeños (sRNA-seq) y se aplicaron flujos bioinformáticos para el procesamiento, cuantificación y análisis de expresión diferencial. Adicionalmente, se efectuaron análisis *in silico* para identificar rutas biológicas relevantes y explorar el papel potencial de miRNAs clave en procesos asociados con la cicatrización.

Resultados. Se identificaron nueve miRNAs sobreexpresados en muestras de piel con quemadura profunda de segundo grado. Entre ellos, mmu-miR-21a-3p, mmu-miR-223-5p y mmu-miR-144-5p destacaron por regular una mayor proporción de genes diana, asociados con procesos de inflamación, reorganización del citoesqueleto, adhesión y migración celular. El análisis funcional sugiere que la sobreexpresión de mmu-miR-21a-3p podría disminuir la actividad de Arhgap35, favoreciendo una activación sostenida de la vía Rho/ROCK1/2, eje involucrado en la motilidad celular y en respuestas inflamatorias que pueden contribuir al desarrollo de cicatrices hipertróficas.

ABSTRAC

Background. Deep second-degree burns represent one of the most severe forms of cutaneous injury and pose a clinical challenge due to alterations in the wound microenvironment that promote the development of hypertrophic scars. Burn wound healing is a dynamic process involving overlapping phases of inflammation, proliferation, and remodeling, all regulated by chemical and mechanical signals that coordinate the cellular response. MicroRNAs (miRNAs), post-transcriptional regulators of gene expression, participate in multiple tissue repair processes; however, global analyses of miRNAs in the specific context of deep burns remain limited.

Methods. A murine model of deep second-degree burn was established in Bulb/c mice. At 24 hours post-injury, healthy and burned skin samples were collected for the extraction of total RNA enriched in miRNAs. Small RNA sequencing (sRNA-seq) was performed, followed by bioinformatic workflows for processing, quantification, and differential expression analysis. Additionally, silico analyses were conducted to identify relevant biological pathways and explore the potential regulatory roles of key miRNAs in wound-healing processes.

Results. Nine miRNAs were found to be overexpressed in deep second-degree burned skin. Among them, mmu-miR-21a-3p, mmu-miR-223-5p, and mmu-miR-144-5p showed the highest number of predicted target genes related to inflammation, cytoskeletal remodeling, adhesion, and cell migration. Functional analysis suggests that the overexpression of mmu-miR-21a-3p may reduce Arhgap35 activity, promoting sustained activation of the Rho/ROCK1/2 signaling pathway, a key regulator of cell motility and inflammatory responses, potentially contributing to the development of hypertrophic scarring.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRAC	9
1. ABREVIATURAS	14
2.1. Estructura de la piel	16
2.2. Quemaduras y su clasificación de acuerdo con la profundidad del daño	18
2.3. Reparación de heridas por quemaduras Graves	21
2.4. Complicaciones de las quemaduras profundas.	24
2.5. miRNAs y su participación en el proceso de cicatrización de quemaduras.	25
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	34
5. HIPÓTESIS	34
6. OBJETIVO GENERAL	35
6.1. Objetivos Particulares	35
7. MÉTODOS	35
7.1. Diseño Experimental	36
7.2. Modelo Murino de quemadura y condiciones de manejo	37
7.3. Recolección y almacenamiento de muestras de piel.....	39
7.4. Histología de tejido con quemadura profunda de segundo grado.....	39
7.5. Extracción de miRNAs	40
7.6. Secuenciación de RNAs pequeños (sRNA-seq)	42
7.7. Procesamiento Bioinformático de los datos de sRNA-seq	42
7.8. Análisis de la expresión diferencial.....	43
7.9. Análisis de Enriquecimiento Funcional.....	44
8. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> PARA COMPRENDER EL PAPEL DE LOS MIRNAS EN LA CICATRIZACIÓN DE QUEMADURAS DE PIEL.....	45
9. RESULTADOS	45

9.1. Quemadura profunda de segundo grado y definición del área de estudio	46
9.2. Aislamiento y secuenciación de miRNAs de piel de ratón con y sin quemadura profunda de segundo grado.	47
9.3. Análisis bioinformático para la cuantificación e identificación del perfil de miRNAs en piel de ratón con y sin quemadura profunda de segundo grado.	49
9.4. Análisis de enriquecimiento funcional e interacción con genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados en piel con quemadura profunda de segundo grado.	53
9.5. Selección de miRNAs candidatos para su posible validación y análisis <i>in silico</i>	58
9.6. Análisis <i>in silico</i> para determinar el papel de los miRNAs en el proceso de cicatrización por quemaduras profundas de segundo grado en la piel.	59
10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
11. CONCLUSIÓN	73
12. PERSPECTIVAS	73
13. REFERENCIAS	75
14. ANEXOS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. microRNAs asociados a distintas etapas de la cicatrización cutánea.	29
Tabla 2. Control de calidad de RNA total enriquecido en RNAs pequeños... 47	
Tabla 3. Control de calidad de las bibliotecas de secuenciación	48
Tabla 4. Fragmento representativo de la matriz de concepto generada con miRge3.0.	51
Tabla 5. Sistema de puntuación integral para priorizar miRNAs diferencialmente expresados en piel con quemadura profunda de segundo grado.	58
Tabla A.1. Valores detallados empleados para la asignación de puntaje a los miRNAs diferencialmente expresados.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la piel y sus principales tipos celulares.	17
Figura 2. Clasificación de las quemaduras según la profundidad del daño.....	20
Figura 3. Fases del proceso de cicatrización cutánea en quemaduras.	23
Figura 4. Biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs.	27
Figura 5. Regulación de miRNAs en la cicatrización de quemaduras.....	31
Figura 6. Flujo de trabajo para la secuenciación de RNAs pequeños (sRNA-seq).....	33
Figura 7. Esquema general del diseño experimental y análisis bioinformático para el estudio de los miRNAs en la cicatrización de quemaduras de piel.....	37
Figura 8. Modelo Murino de Quemadura Profunda de segundo grado.	38
Figura 9. Zonas de Jackson en el modelo murino de quemadura profunda de segundo grado.	39
Figura 10. Pipeline bioinformático y matriz de conteos generados por miRge3.0.	43
Figura 11. Histología de ratón con quemadura profunda de segundo grado.	47
Figura 12. Electroferogramas de RNA total enriquecido en RNAs pequeños.	48

Figura 13. Electroferogramas del control de calidad de librerías de small RNA.....	49
Figura 14. Perfiles de calidad de las lecturas Fastq antes y después del filtrado.	50
Figura 15. Heatmap de los miRNAs diferencialmente expresados entre piel sana y piel con quemadura.	52
Figura 16. Volcano plot de miRNAs diferencialmente expresados entre piel quemada y control.	53
Figura 17. Enriquecimiento funcional de genes diana de miRNAs diferencialmente expresados.....	54
Figura 18. Red de interacción miRNA-gen para genes asociados a la vía de NF-K β	56
Figura 19. Red de interacción miRNA-gen para genes asociados a procesos relacionados con la reparación de heridas.	56
Figura 20. UpSet plot de la red asociada a la vía de NF- κ B, mostrando la distribución de genes diana regulados individualmente o de forma compartida por los miRNAs diferencialmente expresados.....	57
Figura 21. UpSet plot de procesos relacionados con la reparación de heridas, indicando los genes diana regulados por uno o múltiples miRNAs seleccionados.	58
Figura 22. Redes de interacción génica generadas en GeneMANIA.	60
Figura 23. Enriquecimiento funcional de los genes implicados en procesos de cicatrización de heridas.....	61
Figura 24. Integración de la regulación miRNA-mRNA con interacciones proteína-proteína.	62
Figura 25. Regulación conservada de genes diana por hsa-miR-21-3p y hsa-miR-223-5p en humano. El eje Y muestra el Context++ Score (más negativo = mayor represión).	63
Figura 26. Conservación ortóloga de interacciones miRNA-gen entre ratón y humano. Se muestran los genes GABPA, GUCY1A2, ARHGAP35 y SRSF1 como dianas comunes	63
Figura 27. Esquema de la interacción miR-21a-3p-ARHGAP35 y su conexión con la vía RhoA-ROCK	65
Figura A.1. Parámetros principales para ejecutar a miRge3.	85

1. ABREVIATURAS

AGO: Argonauta (familia de proteínas que forman parte del complejo RISC).

RNA: Ácido ribonucleico.

RNA_m: ARN mensajero.

cDNA: ADN complementario

CICUAL: Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

COX: Ciclooxygenasa.

COX-2: Ciclooxygenasa-2.

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño.

dpq: Día post-quemadura.

EMT: Transición epitelio-mesénquima.

FDR: Tasa de descubrimiento falsos positivos.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.

FGFR2: Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos.

GLM: Modelo lineal generalizado.

IL: Interleucina.

MEC: Matriz extracelular.

miRNA: microARN.

miRISC: Complejo de silenciamiento inducido por microARN (complejo RISC cargado con el miRNA).

MMPs: Metaloproteinasas de matriz.

MRE: Elemento de respuesta a microARN.

NF- κ B: Factor nuclear kappa B.

NLRs: Receptores tipo NOD.

NOM-062-ZOO-1999: Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qRT-PCR: PCR en tiempo real con retrotranscripción

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por ARN

sRNA-seq: Secuenciación de ARN pequeño.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TLRs: Receptores tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

2. INTRODUCCIÓN

La piel es considerada el órgano más grande del cuerpo humano; su superficie varía entre 1.5 y 2 m², lo que representa alrededor del 15 % del peso total corporal. Está constituida por diversas capas que albergan distintos linajes celulares y otros componentes esenciales para su estructura y función (Figura 1). Esta organización compleja le permite actuar como la principal barrera de defensa frente al entorno y desempeñar funciones fundamentales, tales como la regulación de la temperatura corporal, la protección frente a agentes externos, la prevención de la pérdida de agua, la percepción sensorial del ambiente y la defensa frente a la radiación ultravioleta (UV) (Tavakoli et al., 2022).

2.1. Estructura de la piel

Epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel, sirve de barrera física contra agentes externos. Está compuesta por un epitelio escamoso estratificado queratinizado, formado principalmente por queratinocitos. Se organiza en cuatro capas, desde la más profunda hacia la superficie: capa basal, capa espinosa, capa granulosa y capa córnea. A nivel basal, otras células presentes son los melanocitos, responsables de la síntesis de melanina, y células de Merkel, asociados a la percepción de estímulos. Conforme los queratinocitos se diferencian, ascienden a través de la capa espinosa, donde se establecen uniones intercelulares. Además, la epidermis también alberga células de Langerhans, distribuidas en la capa espinosa, actuando como presentadoras de antígenos ante linfocitos T (Yousef et al., 2024).

Dermis

La dermis es la capa intermedia de la piel, situada justo debajo de la epidermis, a la cual se encuentra unida a través de la membrana basal. Es la capa más gruesa de la piel y está constituida principalmente de tejido conectivo, un tipo de tejido que brinda soporte estructural, resistencia mecánica y elasticidad. Este tejido se organiza en dos regiones: la dermis papilar (justo por debajo del estrato basal de la epidermis) y dermis reticular (más profunda). Ambas contienen matriz extracelular

(MEC) rica en colágeno tipo I, elastina y glucosaminoglicanos (GAGs). En su interior albergan diversas células, como los fibroblastos y células del sistema inmunológico entre ellas macrófagos, monocitos, células dendríticas y linfocitos, importantes para la defensa, respuesta y colaboradores en el proceso de reparación del tejido. Además, también contiene otros elementos necesarios como anexos cutáneos, glándulas sudoríparas y folículos pilosos, fibras musculares lisas, terminaciones nerviosas sensoriales y una red vascular para proveer de nutrientes y oxígeno al tejido (Milner, 2023).

Hipodermis

Debajo de la dermis, se encuentra la hipodermis o tejido subcutáneo, es la capa más profunda de la piel. Está constituida principalmente de tejido adiposo vascularizado y tejido conectivo laxo que actúa como enlace entre la piel y las estructuras subyacentes, como el músculo. Además, contribuye significativamente a las propiedades termorreguladoras y mecánicas de la piel (Jiao et al., 2024).

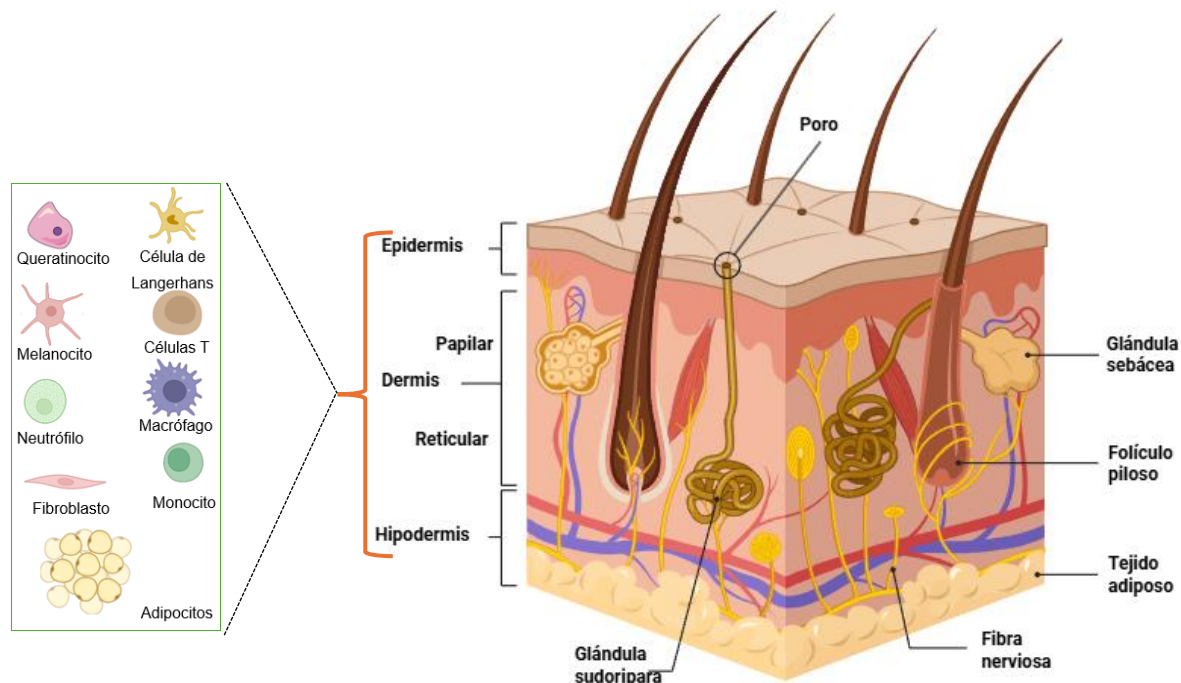


Figura 1. Esquema de la piel y sus principales tipos celulares.

Representación de la piel humana constituida por capas epidermis, dermis e hipodermis. También se denotan algunos elementos que forman parte de estas capas como sus células, apéndices, vascularización. Modificado de (Milner, 2023). Creada con BioRender.com.

Al ser la piel la principal interfaz entre el cuerpo humano y el medio ambiente se encuentra constantemente expuesta a diversos agentes químicos, físicos y biológicos potencialmente dañinos, como la radiación, quemaduras, ácidos, cortes o microorganismos patógenos, entre otros. Cuando estos agentes superan el límite de resistencia de la piel, pueden provocar lesiones que alteran su integridad y comprometen la homeostasis del organismo.

En este contexto, las quemaduras profundas constituyen una de las formas más severas de daño cutáneo, ya que afectan tanto la estructura como la función de la piel, dificultando su reparación. Como consecuencia, el riesgo de complicaciones sistémicas aumenta significativamente, lo que puede traducirse en un incremento de las tasas de mortalidad y en la prolongación de los procesos de recuperación.

2.2. Quemaduras y su clasificación de acuerdo con la profundidad del daño

Las quemaduras son una lesión en la piel u otro tejido adyacente causado en su mayoría por líquidos calientes, sólidos o fuego (Yakup et al., 2022). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que anualmente se producen 11 millones de casos de quemaduras de todo tipo en el mundo, de los cuales cerca de 180 000 personas fallecen por complicaciones. Además, el 90% de estos ocurren en poblaciones de medios y escasos recursos (Mulholland et al., 2017). En México, se estima que aproximadamente 128 000 mil personas sufren quemaduras anualmente, de las cuales 42 000 corresponde a población infantil (Secretaría de Salud, 2024). La mayoría de las quemaduras graves representan un enorme reto clínico, y la recuperación del paciente depende en gran medida de la etiología de la quemadura, la gravedad del daño y su tratamiento. En este sentido, se han establecido diversas clasificaciones clínicas en quemaduras, dentro de las que la clasificación respecto a la profundidad del daño es de las más utilizadas (Figura 2).

Según la profundidad hay tres tipos de quemaduras:

Primer grado

Este tipo de quemaduras compromete únicamente la epidermis, dañando principalmente a elementos importantes como los queratinocitos. Se caracteriza por enrojecimiento local, dolor de intensidad moderada y ausencia de ampollas. Generalmente, la curación ocurre sin complicaciones en un plazo de 3 a 5 días, sin dejar cicatriz.

Segundo Grado

Las quemaduras de segundo grado se subdividen en superficiales y profundas, según la profundidad del daño dérmico.

I. Segundo grado superficial

Estas lesiones comprometen a la epidermis y a la porción más superficial de la dermis (dermis papilar). Son consideradas quemaduras leves, que causan enrojecimiento y dolor, ya que en estas regiones hay presencia de terminaciones nerviosas que son sensibles al daño térmico. No se generan ampollas ni daño profundo y la recuperación suele ser rápida y sin cicatriz.

II. Segundo grado profundo

En este tipo de quemadura se afecta tanto a la epidermis como a la totalidad o casi toda la dermis. Suelen ser heridas menos dolorosas debido a la destrucción de las terminaciones nerviosas. Es frecuente observar la formación de una escara seca, dura y de color oscuro, indicativa de necrosis tisular en el sitio del daño. Debido a que el proceso de reparación tisular es lento y complejo, la pérdida de una porción considerable del tejido viable limita significativamente la capacidad reparadora de la piel, lo que retrasa el cierre de la herida.

Además del daño local, si este tipo de quemaduras son de gran extensión, desencadenan una de las respuestas hipermetabólicas más intensas, la cual puede mantenerse durante semanas o incluso años tras el evento inicial. Esta respuesta sistémica se caracteriza por un incremento significativo en el consumo de oxígeno, el gasto energético y la producción de calor, alcanzando hasta un 45 % por encima de los niveles basales. Está mediada por la liberación sostenida de catecolaminas, glucocorticoides, glucagón y dopamina, hormonas que inducen un profundo estado catabólico caracterizado por gluconeogénesis, proteólisis y lipólisis exacerbadas. Estos procesos metabólicos favorecen la pérdida de masa muscular, alteran el balance energético y contribuyen a la disfunción multiorgánica, lo que impacta directamente en la reparación tisular y aumenta el riesgo de complicaciones graves e incluso de mortalidad (Garnica Escamilla et al., 2021)

En los casos que logran estabilizar a los pacientes, la reepitelización puede extenderse durante varias semanas, y con frecuencia resulta en cicatrices hipertróficas, caracterizadas por un exceso de matriz extracelular e incremento celular.

Tercer grado

Este tipo de quemaduras se caracteriza por la destrucción completa de la epidermis, la dermis, con frecuencia la hipodermis y el músculo. La reparación de este tipo de heridas es prácticamente inexistente, por lo que requiere intervención quirúrgica (Jeschke et al., 2020).

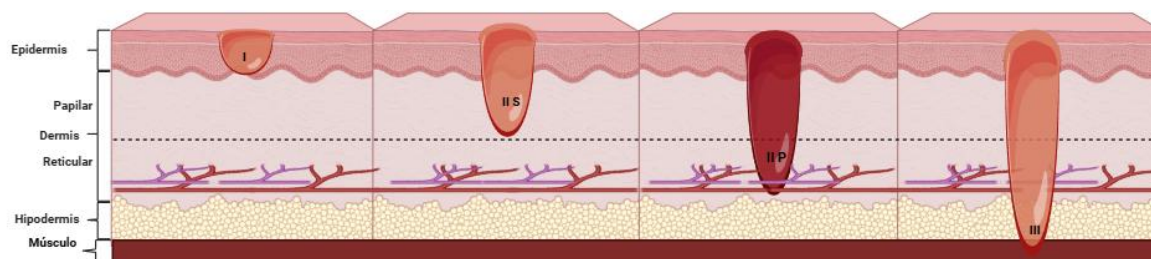


Figura 2. Clasificación de las quemaduras según la profundidad del daño.

Las quemaduras de primer grado afectan únicamente la epidermis. Las de segundo grado superficial (II S) alcanzan la dermis papilar, mientras que las de segundo grado profundo (II P) comprometen la dermis reticular. Las de tercer grado (III) dañan todo el espesor cutáneo y pueden extenderse hasta la hipodermis y estructuras subyacentes como el músculo. Modificado de (Milner, 2024). Creada con BioRender.com.

2.3. Reparación de heridas por quemaduras Graves

Las quemaduras profundas de segundo grado desencadenan una respuesta biológica compleja que busca restablecer la integridad cutánea tras un daño. Este tipo de lesiones comprometen por completo la epidermis y, en la mayoría de los casos, gran parte de la dermis papilar y reticular, lo que genera un microambiente tisular caracterizado por intensa inflamación, pérdida estructural, alteración de la función barrera y activación de múltiples vías celulares y moleculares. Debido a la magnitud del daño, el organismo inicia una respuesta inmediata encaminada a reparar el tejido lesionado. Este proceso ocurre en fases superpuestas y altamente coordinadas que incluyen la inflamación, la proliferación y diferenciación celular, y la remodelación del tejido (Jeschke et al., 2020). La adecuada progresión de estas etapas es esencial para restaurar la función de la piel y evitar complicaciones como infecciones, cicatrices patológicas o retraso en el cierre de la herida.

Inflamación

Tras una quemadura profunda, el tejido dañado libera factores endógenos como los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs); además, en caso de que exista colonización microbiana en el sitio de daño, pueden detectarse patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Estas señales de daño son reconocidas por células residentes de la piel, como los queratinocitos o los macrófagos, a través de los receptores de reconocimiento de patrón (PPRs), como los tipos Toll (TLRs) o los tipos NOD (NLRs). Este reconocimiento desencadena vías de señalización intracelular, que principalmente inducen la liberación de citosinas (IL-1, TNF- α , IL-6), quimiocinas (CXCL1, CXCL8, CCL2, CX3CL) y factores de crecimiento (TGF- β , IGF, PDGF, VEGF). Estos mediadores generan un microambiente inflamatorio que favorecen el reclutamiento de células del sistema inmunitario como los neutrófilos, monocitos y macrófagos, los cuales llegan al sitio de daño a través del aumento de la vasodilatación inflamatoria, un proceso que incrementa el flujo sanguíneo local y facilita la diapédesis (paso de células inmunitarias a través del endotelio) y la transvasación (migración de estas células

hacia el tejido lesionado). Este fenómeno permite que neutrófilos, monocitos y macrófagos se acumulen rápidamente en la zona afectada, donde ejercen funciones esenciales como la fagocitosis de restos celulares y microorganismos, y la liberación de mediadores proinflamatorios que amplifican la respuesta inmunitaria. Los neutrófilos son guiados por quimiocinas como CXCL1 y CXCL8; respecto a los monocitos, son atraídos por CCL2 y CX3CL1, que posteriormente en el tejido diferencian en macrófagos inflamatorios. Una vez infiltrados, su objetivo principal es remover el tejido dañado y prevenir infecciones (Figura 3a). Estas acciones permiten dejar listo el sitio de daño e iniciar la reparación (Gospodarek et al., 2022).

Proliferación

En esta etapa, el reclutamiento y la activación de fibroblastos y queratinocitos en el sitio de la herida son procesos esenciales para restaurar la integridad del tejido cutáneo. Inicialmente, el restablecimiento de la perfusión vascular resulta fundamental para asegurar el suministro de oxígeno y nutrientes al área dañada. A continuación, las células endoteliales son estimuladas por factores de crecimiento como VEGF, HGF y FGF, lo que desencadena la angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Esta neovascularización crea un microambiente rico en oxígeno y nutrientes que favorece la formación del tejido de granulación, un tejido provisional altamente vascularizado y compuesto principalmente por colágeno tipo III secretado por los fibroblastos. Dicho tejido actúa como un andamio estructural que facilita la migración celular y sustenta el crecimiento del nuevo tejido, contribuyendo de manera decisiva a la reparación cutánea (Jeschke et al., 2020).

De manera vertical, los fibroblastos comienzan a diferenciarse en miofibroblastos bajo la influencia de mediadores como TGF- β y PDGF; estas células desempeñan la contracción del tejido y síntesis de la matriz extracelular (MEC), se alinean en los bordes de la herida y contribuyen a su cierre mediante la contracción tisular. Al mismo tiempo, los queratinocitos proliferan y migran hacia el centro de la herida, favoreciendo la reepitelización y la restitución de la barrera epidérmica (Figura 3b).

Remodelación

La fase de remodelación (Figura 3c) constituye la resolución tisular y se caracteriza por la maduración del tejido de granulación. En este proceso hay recambios como la matriz extracelular provisional. Específicamente el colágeno tipo III, es degradado y reemplazado por colágeno tipo I. Esto brinda más resistencia mecánica al tejido reparado. Lo anterior es posible gracias a la activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs), encargadas de la degradación de los componentes de la MEC, y sus inhibidores tisulares (TIMPs), que regulan dicha actividad de degradación excesiva. Factores de crecimiento como TGF- β , PDGF y FGF-2 también participan en la regulación de esta etapa, promoviendo la síntesis de nuevo colágeno y la correcta organización de las fibras. En paralelo, la red vascular experimenta un proceso de regresión, para dejar vascularización únicamente necesaria para dar apoyo al nuevo tejido. Los miofibroblastos, tras cumplir su función en la contracción de la herida y en la deposición de matriz extracelular, entran en apoptosis. Finalmente, el epitelio superficial adquiere una organización más estable y funcional, reconstruyendo parcialmente las capas epidérmicas y consolidando la barrera cutánea, aunque sin la recuperación completa de los otros anexos cutáneos como folículos pilosos o glándulas (Peña & Martin, 2024).

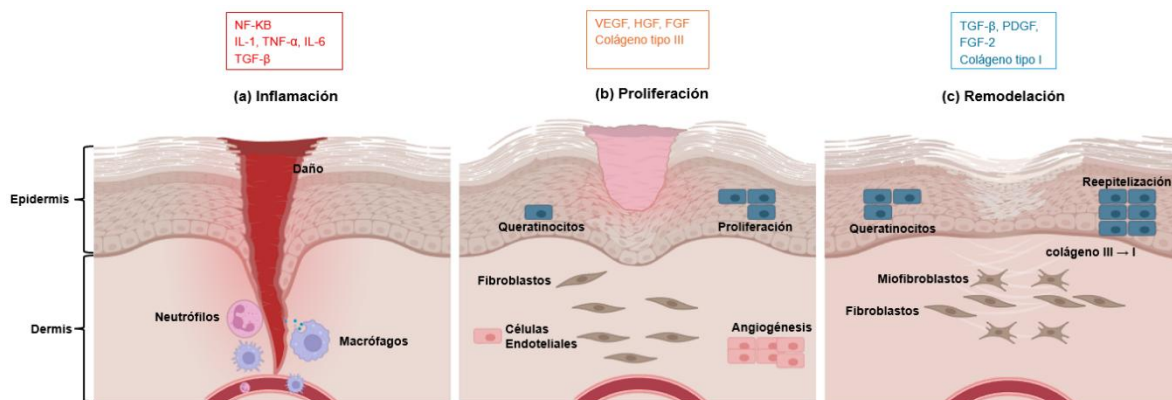


Figura 3. Fases del proceso de cicatrización cutánea en quemaduras.

La reparación de heridas en quemaduras, es un proceso superpuesto que comprende a (a) la inflamación, (b) proliferación y (c) remodelación. Modificado de (Wang et al., 2024). Construido en BioRender.com.

2.4. Complicaciones de las quemaduras profundas.

La reparación tisular ocurre a través de una secuencia organizada y coordinada de fases superpuestas, que incluyen inflamación, proliferación y remodelación, cada una con funciones específicas orientadas a restaurar la integridad del tejido. Sin embargo, en el contexto de las quemaduras profundas, este desarrollo ideal puede verse comprometido debido a la magnitud del daño y a la complejidad de la respuesta biológica que desencadena. Estas lesiones se caracterizan por generar alteraciones inmunológicas, inflamación exacerbada y sostenida, hipovolemia, shock distributivo y cambios metabólicos significativos, como la respuesta hipermetabólica, que pueden culminar en una falla multiorgánica e infecciones graves que ponen en riesgo la vida del paciente (Jeschke et al., 2020).

Si el paciente logra estabilizarse de las etapas críticas de la quemadura, la recuperación del tejido también suele verse afectada. Una cicatrización correcta depende en gran medida de una epitelización ordenada y de la contracción efectiva de la herida. Sin embargo, en el caso de las quemaduras profundas, es frecuente ver una resolución deficiente de la cicatrización, que se manifiesta en la formación de cicatrices hipertróficas, lo que resulta en consecuencias estéticas y funcionales. (Hettiaratchy & Dziewulski, 2004). Las cicatrices hipertróficas se desarrollan durante la fase de remodelación y se caracterizan por una síntesis excesiva de colágeno, acumulación de matriz extracelular e hipercelularidad debido a un aumento de fibroblastos por alteraciones en la señalización como el eje TGF- β /Smad y una inflamación prolongada mediada por citocinas como IL-6, IL-1 β , IL-4 e IL-13, junto con una deficiencia funcional de moléculas antiinflamatorias como la IL-10. Además, la persistencia de miofibroblastos y la tensión mecánica del tejido resultan en una contracción anómala y la acumulación desorganizada de matriz, dando lugar a un microambiente profibrótico que interfiere con una remodelación y reparación del tejido (Mony et al., 2023).

2.5. miRNAs y su participación en el proceso de cicatrización de quemaduras.

Aunque el proceso de cicatrización de piel ha sido ampliamente estudiado, los mecanismos moleculares que regulan este proceso siguen siendo un área de investigación. Con el avance de la ciencia y la tecnología es posible conocer nuevos actores involucrados, es así como en los últimos diez años los miRNAs han emergido como reguladores importantes de la cicatrización (Ross, 2021), aunque aún son escasos los reportes que estudian su participación en la reparación de quemaduras profundas (Siu et al., 2023).

Los miRNAs son un tipo de RNA pequeño no codificante (~22 nt) que regula la expresión génica a nivel postranscripcional promoviendo I) la degradación del RNA mensajero (RNAm) blanco o II) la inhibición de la traducción temprana del RNAm blanco (Mulholland et al., 2017). La relevancia de los miRNAs radica en que regulan positiva o negativamente procesos celulares como la apoptosis, la proliferación, migración, vía de señalización de estrés, inflamación y angiogénesis, que son esenciales para que ocurra la cicatrización de quemaduras profundas de la piel (O'Brien et al., 2018).

Biogénesis

La biogénesis de los miRNAs inicia en el núcleo celular (Figura 4), en donde los genes de los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II en un transcrito primario (pri-miRNA). El transcrito es reconocido por el complejo microprocesador, el cual está conformado por Drosha y DGCR8, que lo recorta y produce un precursor en forma de horquilla conocido como pre-miRNA. El pre-miRNA es exportado al citoplasma por Exportina-5 (XPO5), donde la enzima Dicer lo corta en un dúplex de RNA de cadena corta. Una de las hebras (guía) se incorpora a proteínas de la familia Argonauta (AGO) para conformar el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA), mientras que la hebra pasajera es degradada (Heydarzadeh et al., 2021).

Función de los miRNAs

Clásicamente, se ha descrito que el complejo RISC-miRNA (miRISC) reconoce secuencias complementarias en la región 3'UTR del ARNm blanco. Sin embargo, actualmente se sabe que los miRNAs no requieren una complementariedad total con sus genes diana. La región semilla (2–8 nucleótidos del extremo 5' del miRNA) es la principal responsable del reconocimiento, mientras que las regiones 3' suplementarias contribuyen a la estabilidad del apareamiento. Además, se ha demostrado que los miRNAs también pueden establecer interacciones en otras regiones del ARNm, como las regiones exónicas o la 5'UTR, así como en regiones promotoras. Finalmente, se han identificado elementos sensibles a miRNA (MRE) en el ARNm que sirven como sitios alternativos de unión para los complejos miRISC, ampliando así el espectro de regulación postranscripcional ejercido por los miRNAs (Nalbant & Akkaya-Ulum, 2024)

Existen dos principales mecanismos de acción:

Degradación del ARNm

- Cuando la complementariedad es alta, RISC recluta GW182 necesarios para reclutar a otras proteínas como complejos de Poli-A-deadenilasa PAN2, PAN3 Y CCR4-NOT, que promueven desadenilación (pérdida de la cola poliA). Esto desencadena la remoción del cap 5' (m⁷G) mediada por el complejo DCP1/DCP2 y la posterior degradación del ARNm por nucleasas como XRN1 o el exosoma (Bartel, 2018).

Represión traduccional:

- Cuando la complementariedad es parcial, el ARNm no se degrada, pero la traducción se bloquea. Esto ocurre mediante el reclutamiento de GW182, CCR4-NOT y DDX6, que interfieren con la iniciación ribosomal e impiden la síntesis de proteínas (Jonas & Izaurralde, 2015).
- El complejo RISC, a través de GW182, interfiere con el reconocimiento del cap 5' por el complejo de iniciación eIF4F, impidiendo el reclutamiento

correcto de la subunidad ribosomal 40S y bloqueando así el inicio del proceso (Fukaya et al., 2014)

- El complejo RISC cargado con el miRNA se asocia al ribosoma durante la traducción. A través del reclutamiento de ubiquitin ligasas y componentes del proteasoma, el complejo marca el péptido nascente para su degradación mientras aún está siendo sintetizado. De esta manera, aunque el ARNm se está traduciendo activamente, el producto proteico resultante es degradado inmediatamente, anulando efectivamente la producción de la proteína funcional (Djuranovic et al., 2012).

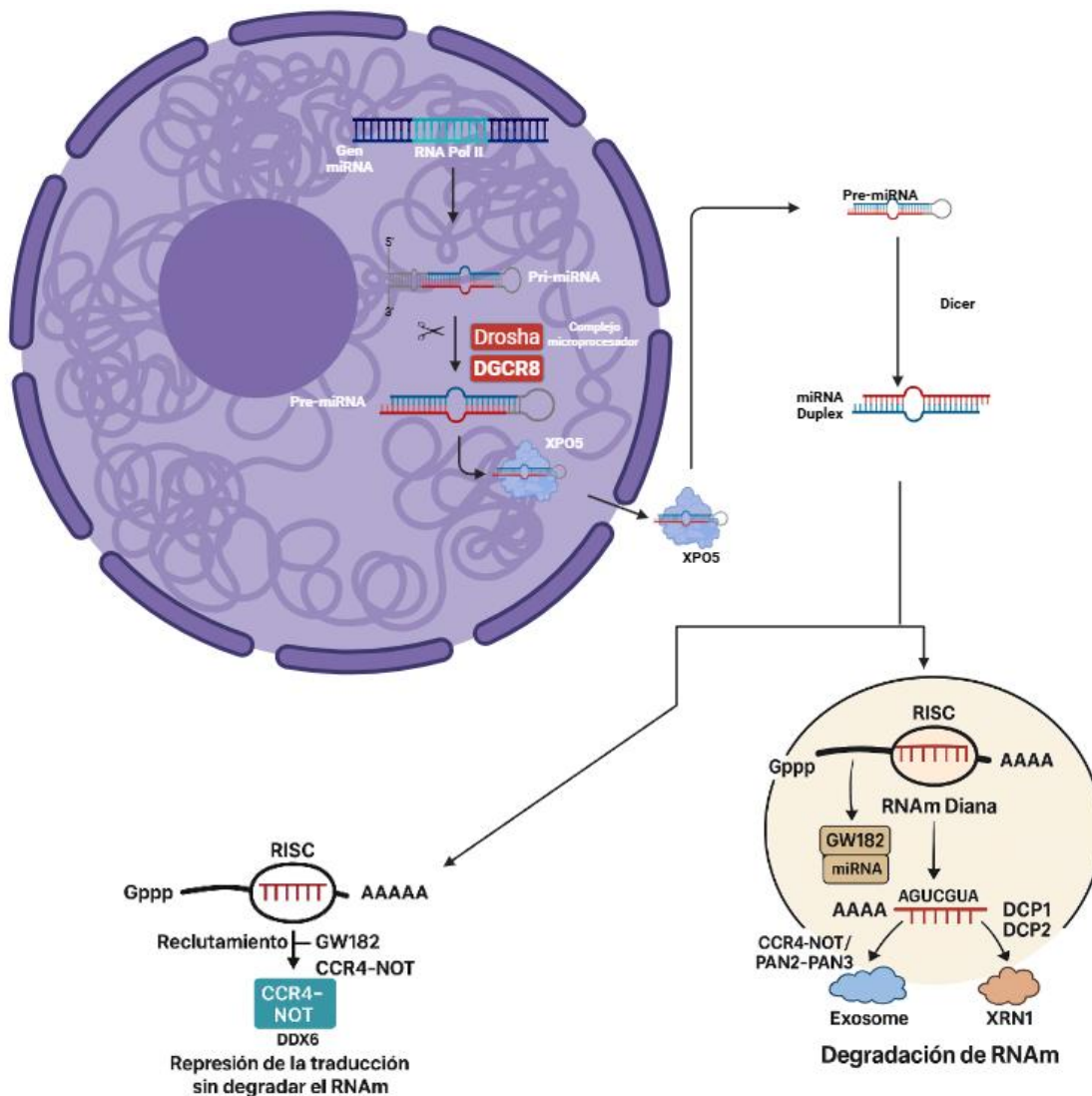


Figura 4. Biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs.

Tras ser procesados en el núcleo y citoplasma, los miRNAs se incorporan al complejo RISC junto a proteínas AGO. Este complejo regula la expresión génica promoviendo la degradación del ARNm o la inhibición de su traducción, según el grado de complementariedad de bases. Modificado de (Mulholland et al., 2017). Imagen creada en BioRender.com

Se ha reportado que los miRNAs son cruciales no solo en procesos patológicos, sino en el mantenimiento de la homeostasis de la piel, siendo algunos de los más expresados miR-203 que restringe la proliferación e impulsa la diferenciación de los queratinocitos mediante la represión de RAN y RAPH1; miR-205 se ha visto que promueve la migración y proliferación celular al inhibir el regulador negativo SHIP2 y activar la vía de PI3K/AKT, y miR-125 atenúa la respuesta inflamatoria al modular TNF- α y regula la proliferación celular a través de FGFR2. En conjunto coordinan la renovación epitelial y la integridad estructural de la piel (Mulholland et al., 2017). Evidencia obtenida principalmente de modelos de heridas excisionales y úlceras crónicas ha establecido que su participación es fundamental en la regulación fina de todas las etapas del proceso de reparación. Por ejemplo, en heridas agudas, miRNAs como el miR-21, miR-155 y miR-146a modulan la fase inflamatoria mediante el silenciamiento de mediadores clave como PTEN, PDCD4, IRAK y COX-2, así como de interleucinas como IL6, IL-1 β e IL-12 (Mulholland et al., 2017).

En estudios de angiogénesis, se ha observado que miRNAs proangiogénicos como el miR-126 (regulando el VEGF) y el miR-200b son esenciales para la formación de nuevos vasos sanguíneos (Chan et al., 2012). Asimismo, estudios *in vitro* en queratinocitos demuestran que una baja expresión de miR-210 es fundamental para su migración y proliferación durante la reepitelización. Finalmente, estudios de remodelación y fibrosis han identificado que la familia miR-29 y el miR-192 ejercen un control directo sobre la síntesis de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, determinando la calidad del tejido cicatricial (Ver Tabla 1) (Banerjee & Sen, 2013)

Tabla 1. microRNAs asociados a distintas etapas de la cicatrización cutánea.

Etapa	miRNAs	Función clave	Tipo de herida / modelo	Referencia
Homeostasis cutánea	miR-203, miR-205, miR-34a, miR-125b	Regulación basal de queratinocitos y mantenimiento de la epidermis	Piel normal, modelos de homeostasis	Mulholland et al., 2017
Inflamación	miR-21, miR-155, miR-146a, miR-146b	Modulan mediadores inflamatorios (PTEN, PDCD4, citocinas e ILs)	Heridas agudas, úlceras crónicas	Mulholland et al., 2017; Banerjee & Sen, 2013
Proliferación / Reepitelización	miR-210, miR-31, miR-132	Migración y proliferación de queratinocitos, formación de epitelio	Modelos de heridas excisionales	Banerjee & Sen, 2013; Pastar et al., 2012
Angiogénesis	miR-126, miR-200b, miR-200c, miR-378	Regulación de VEGF, formación de vasos sanguíneos	Modelos murinos de heridas, isquemia	Mulholland et al., 2017; Chan et al., 2012
Remodelación y fibrosis	miR-29, miR-192, miR-133b, miR-18a	Regulación de síntesis de colágeno y matriz extracelular (MEC)	Modelos de fibrosis	Banerjee & Sen, 2013; Li et al., 2015

Dado que los miRNAs regulan procesos clave como la inflamación, proliferación, migración, angiogénesis y remodelación en heridas agudas y crónicas, resulta imperativo considerar su papel en lesiones de mayor complejidad biológica, como las quemaduras. Sin embargo, a diferencia de otros tipos de heridas, los estudios que han evaluado la participación de los miRNAs específicamente en la reparación de quemaduras profundas de segundo grado son escasos.

Aunque varios estudios han perfilado miRNAs a través tecnologías como microarreglos y qPCR, estos métodos analizan únicamente miRNAs predefinidos, por lo que, se vuelven en herramientas muy dirigidas. Al tener en cuenta que las quemaduras profundas de segundo grado representan un microambiente único con daño tisular extenso, hipoxia y desregulación inflamatoria, tecnologías como la secuenciación de ARN de pequeño, proporciona un enfoque imparcial capaz de detectar todos los miARN expresados y sus variantes, lo que la convierte en la estrategia más adecuada para descubrir reguladores previamente desconocidos

que intervienen en la reparación de heridas inducidas por quemaduras (Siu et al., 2023). A pesar de esto, se han reportado miRNAs clave con roles potenciales; en las fases tempranas de la reparación cutánea (24 h a 3 días post-quemadura), se ha observado que miR-132 media críticamente la transición de la inflamación a la proliferación, inducida por TGF- β en queratinocitos, suprime la vía NF-KB para atenuar la respuesta inflamatoria mientras activa STAT3/ERK para promover la proliferación y migración celular, siendo esencial para un cierre eficiente de la herida. De manera similar, miR-31 emerge como un regulador pro-proliferativo en queratinocitos, inducido por TGF- β 2 para mejorar la migración y proliferación mediante la represión de su gen diana EMP-1 (Figura 5a) (Li et al., 2015). En el proceso de remodelación (Figura 5c), se ha reportado que en fibroblastos derivados de cicatrices hipertróficas ocurre un eje disfuncional entre miR-21 y miR-200b. Por un lado, miR-21 se encuentra sobreexpresado en cicatrices hipertróficas, donde suprime la expresión de Smad7 (un inhibidor de TGF- β), lo que resulta en una exacerbación de la señalización profibrótica y una mayor expresión de colágeno tipo I, fibronectina y α -SMA (Zhou et al., 2015; Li et al., 2014). Por otro lado, En fibroblastos dérmicos aislados de cicatrices hipertróficas, la desregulación de miR-200b induce la sobreexpresión de Zeb1, promoviendo la transición epitelio-mesénquima (EMT) que favorece la fibrosis y el exceso de matriz extracelular (Zhou et al., 2015). Adicionalmente, en el nicho específico de la dermis dañada por calor, se reporta a miR-23b (Figura 5b) como regulador negativo de la proliferación y migración de fibroblastos al dirigirse a Smad3. Su desregulación posterior a la quemadura permite la activación de las vías de TGF- β y Notch, facilitando así la reparación del tejido (Zhang et al., 2015).

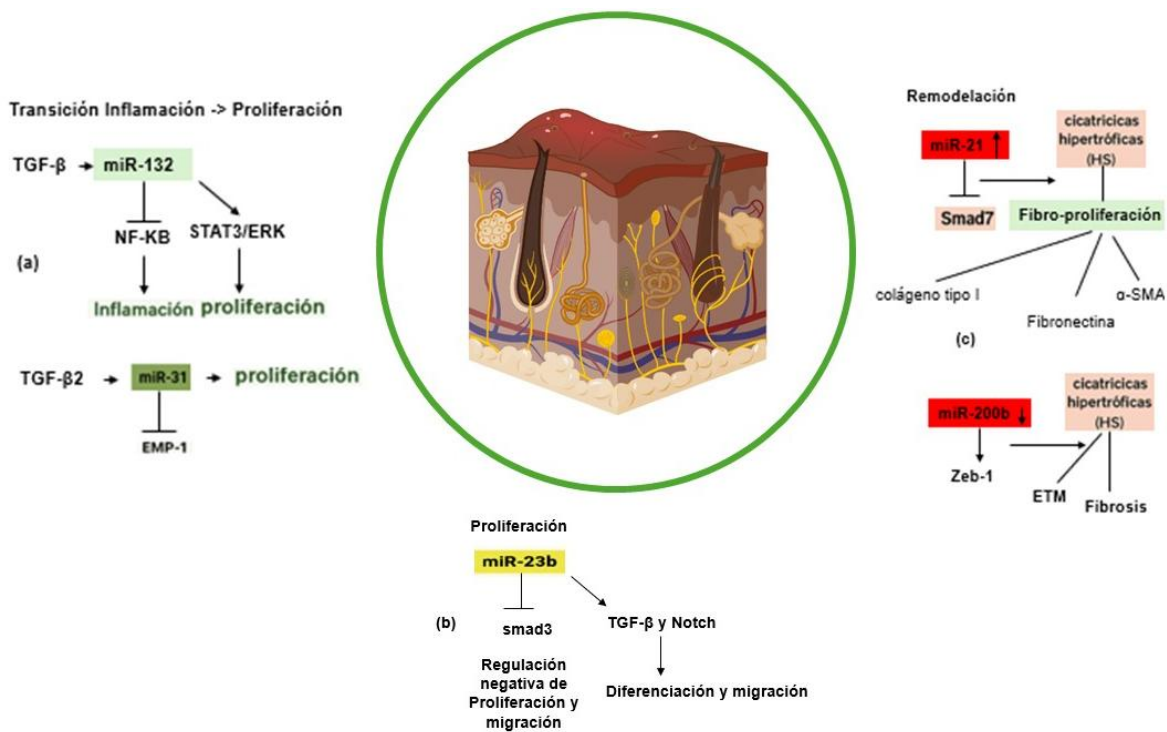


Figura 5. Regulación de miRNAs en la cicatrización de quemaduras.

En la transición de inflamación a proliferación (a) participan miR-132 y miR-31; durante la fase de proliferación (b) interviene miR-23b; y en la etapa de remodelación (c) se encuentran implicados miR-21 y miR-200b. Imagen con BioRender.com

En conjunto, estos estudios proveen evidencia sólida de que miRNAs específicos son actores cruciales en la respuesta a quemaduras. No obstante, esta visión puede tener ciertas limitaciones por las tecnologías empleadas. La dependencia de los microarreglos significa que nuestro conocimiento actual está sesgado hacia miRNAs previamente caracterizados en otras patologías, dejando una brecha significativa en la comprensión del panorama completo del transcriptoma de miRNAs en la quemadura (Liang et al., 2012). Si bien los estudios transcriptómicos previos en cicatrización han proporcionado ideas valiosas, algunas de estas aproximaciones se basan en modelos con limitaciones conocidas para capturar la complejidad de una herida por quemadura. Por ejemplo, los cultivos celulares no recrean el microambiente tisular de una quemadura en un modelo *in vivo* (Sarian et al., 2023). Asimismo, los modelos de heridas artificiales, como el ensayo de raspadura “scratch assay”, son ampliamente utilizados para evaluar la capacidad de migración celular. Sin embargo, no reproducen la complejidad del microambiente

tisular de una quemadura ni reflejan la dinámica de un tejido vivo (Choudhary et al., 2024).

En el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” se ha utilizado un modelo murino de quemadura profunda de segundo grado bajo condiciones experimentales controladas. Dicho modelo reproduce características histopatológicas incluyendo el daño tisular en la epidermis y dermis, así como la desnaturalización de proteínas de la matriz extracelular. Esta aproximación experimental resulta particularmente útil para el estudio de las quemaduras graves, pues permite recapitular de forma controlada la evolución temporal del proceso de cicatrización, el cual se organiza en fases definidas: una fase inflamatoria (alrededor del día 3 post-quemadura) caracterizada por un intenso infiltrado celular; una fase proliferativa (día 7) en la que se observa formación de tejido de granulación y epitelización inicial; y una fase de remodelación (día 14) asociada al establecimiento de un epitelio continuo y a la deposición activa de colágeno (González, 2017).

De manera vertical, en el laboratorio de tejido conjuntivo, se han desarrollado investigaciones utilizando a la cepa Balb/c para implementar un modelo de lesión cutánea, y estudiar el trasplante de piel de ratón. En sus investigaciones con este modelo, han evaluado la participación de miRNAs como miR-31, miR-155 y miR-221 en procesos de reparación tisular, tales como la respuesta inflamatoria, la activación fibroblástica y la remodelación de la matriz extracelular. Sus hallazgos demuestran que la modulación de miRNAs es un componente clave de la respuesta biológica frente al daño cutáneo severo, influyendo en una mejor integración del injerto de piel. (Mandujano-Tinoco et al., 2022).

La evidencia generada del modelo del injerto de piel evidencia como en otros contextos de lesión cutánea los miRNAs son esenciales. Por lo que, en el modelo murino de quemadura profunda de segundo grado, puede proporcionar un marco controlado, temporal y espacial óptimo para el desarrollo de estudios transcriptómicos, asociados a la reparación tisular.

En este sentido, resulta pertinente incorporar una aproximación global que permita caracterizar de manera amplia el repertorio de miRNAs implicados. La secuenciación de sRNA-seq es una tecnología idónea para este propósito, ya que permite identificar y cuantificar de manera global moléculas de RNA pequeños, generalmente menores de 200 nucleótidos, entre los que se incluyen miRNAs, siRNAs y snoRNAs. Como se mencionó anteriormente, a diferencia de metodologías convencionales como los microarreglos o la qRT-PCR que dependen de sondas prediseñadas y conocimiento previo de las secuencias, la sRNA-seq permite detectar y cuantificar tanto miRNAs conocidos como nuevos, así como variantes de secuencia (isomiRs), proporcionando un panorama completo de la expresión de RNA pequeños.

El flujo experimental de esta técnica (Figura 6) comprende la extracción de RNA total, preservando las fracciones pequeñas, seguida de la preparación de bibliotecas mediante la ligación de adaptadores en los extremos 3' y 5', la retrotranscripción a DNA complementario (cDNA) y la amplificación por PCR. Posteriormente, las bibliotecas se secuencian en plataformas de alto rendimiento, como Illumina, generando millones de lecturas cortas que representan los distintos RNA pequeños presentes en la muestra. Finalmente, se realiza un procesamiento bioinformático de las lecturas para su filtrado, alineamiento y cuantificación, lo que permite determinar los niveles relativos de expresión y detectar miRNAs previamente no anotados (Benesova et al., 2021)

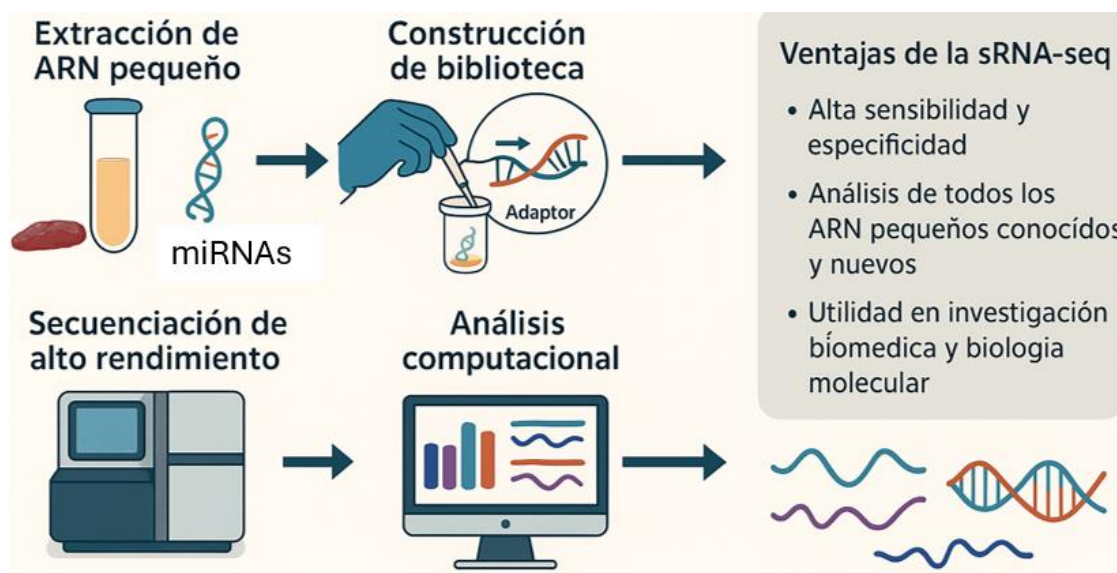


Figura 6. Flujo de trabajo para la secuenciación de RNAs pequeños (sRNA-seq).

Imagen creada a partir de (Benesova et al., 2021). Creada en BioRender.com

3. JUSTIFICACIÓN

El proceso de recuperación por quemaduras profundas de segundo grado puede prolongarse durante años y generar complicaciones como la generación de cicatrices hipertróficas, afectando drásticamente la calidad de vida del paciente, derivando en problemas psicológicos por la apariencia y físicos, por la permanente presencia de dolor, picazón y pérdida de morbilidad por contracturas. Aunque en los últimos años se ha avanzado en la caracterización de ciertos miRNAs implicados en procesos de cicatrización cutánea, los reportes enfocados específicamente en quemaduras profundas siguen siendo escasos y, en su mayoría, se han basado en técnicas dirigidas como microarreglos o qRT-PCR, que limitan la detección a miRNAs previamente conocidos. En este contexto, el uso de secuenciación de nueva generación aplicada a un modelo murino de quemadura profunda de segundo grado ofrece la posibilidad de identificar de manera global y no sesgada los cambios en la expresión de miRNAs. Con ello, este proyecto busca contribuir a la identificación de biomarcadores clave en el proceso de cicatrización, proporcionando conocimientos fundamentales para mejorar las aproximaciones de quemaduras de segundo grado profundo.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué grupos de miRNAs muestran un cambio en su expresión ante una quemadura profunda de segundo grado en la piel y cuál es su participación en el proceso de cicatrización de la herida?

5. HIPÓTESIS

La quemadura profunda de segundo grado en un modelo murino producirá cambios en la expresión de miRNAs que se asocian con las fases de inflamación, proliferación y remodelación del proceso de cicatrización de heridas, observados a través de análisis de expresión diferencial.

6. OBJETIVO GENERAL

Comparar el perfil de expresión global de miRNAs entre muestras de tejido sano y aquellos que cursen con la cicatrización de quemaduras profundas de segundo grado profundo en la piel.

6.1. Objetivos Particulares

- Caracterizar el perfil de expresión diferencial de miRNAs en la piel de ratones con quemadura profunda de segundo grado a 1dpq.
- Identificar los mRNAs blanco y las vías biológicas y/o funciones celulares reguladas por los miRNAs que cambian su expresión en los ratones con quemadura de segundo grado profundo.
- Inferir el posible papel de los miRNAs en el proceso de cicatrización

7. MÉTODOS

El presente proyecto de investigación tuvo un diseño experimental y exploratorio. Los datos para este proyecto derivaron de la aplicación de un modelo murino de quemadura profunda de segundo grado, previamente estandarizado y descrito en el laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación, México (INR) (González, 2017). Se emplearon ratones hembra de la cepa Balb/c, en los cuales se generaron quemaduras dorsolaterales bajo condiciones controladas. Se recolectaron muestras de piel en dos condiciones experimentales: tejido sano (control) y tejido quemado. Las biopsias se obtuvieron en 1 día post-quemadura (dpq) con el fin de analizar la expresión de los miRNAs en la fase más aguda del proceso cicatricial.

El RNA total, incluyendo fracciones pequeñas, fue extraído de cada muestra para la obtención de perfiles de expresión de miRNAs. Posteriormente, se realizaron análisis comparativos de expresión diferencial entre las muestras de piel sana y aquellas afectadas por la quemadura.

No se administraron analgésicos en el periodo post-quemadura, debido a que la inflamación es una de las primeras respuestas tras el daño por quemadura, y es

importante conocer la expresión de los miRNAs sin modulación farmacológica. Se ha reportado que los analgésicos de uso común, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los opioides, alteran significativamente los procesos inflamatorios y de cicatrización al inhibir vías clave como la ciclooxigenasa (COX) y la liberación de citoquinas proinflamatorias (Langford et al., 2010) & (Danzi et al., 2016).

Sin embargo, previo a la aceptación del uso del modelo murino de quemadura profunda de segundo grado, en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo se evaluaron las Escalas de Muecas de Dolor en el modelo murino. Esta práctica evalúa de manera confiable los estados del dolor agudo mediante la observación de cambios faciales. Esta práctica toma en cuenta criterios como presencia de signos de dolor severo, postura encorvada, reducción significativa de ingesta de alimento y agua (Langford et al., 2010), así como el peso y el tiempo de recuperación (González, 2017; Rodríguez, 2023).

Los experimentos fueron aprobados por el Comité Interno para el cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), para el protocolo de registro 60-62, en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

7.1. Diseño Experimental

El diseño experimental (Figura 7) consiste en inducir la quemadura profunda de segundo grado en modelo murino. A las 24 horas post-quemadura se obtienen las muestras de tejido para la extracción de RNA total enriquecido en fracciones de RNAs pequeños. Posteriormente la Unidad de Secuenciación de Alta tecnología del Instituto Nacional de Medicina genómica (INMEGEN) realiza el procesamiento de las muestras desde la evaluación de calidad, construcción de bibliotecas genómicas y el proceso de la secuenciación de sRNA. Los datos resultantes fueron analizados mediante una suite de herramientas bioinformáticas para obtener una matriz de conteo y otros análisis como el análisis de expresión diferencial y el análisis de enriquecimiento. Por último, se validó la expresión de alguno de los miRNAs de interés bajo técnicas experimentales como la RT-qPCR.

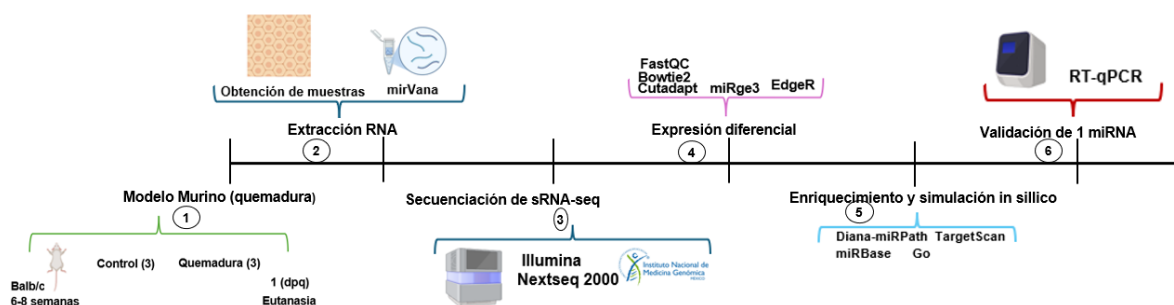


Figura 7. Esquema general del diseño experimental y análisis bioinformático para el estudio de los miRNAs en la cicatrización de quemaduras de piel.

7.2. Modelo Murino de quemadura y condiciones de manejo

Se utilizaron ratones hembra de la cepa Balb/c, de entre 6 a 8 semanas de edad y un peso promedio de 25 gramos al momento del experimento. Los animales fueron proporcionados por el Dr. José Rene Escalona Mugica del laboratorio de Embriología y Genética de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se mantuvieron en aclimatación en el laboratorio una semana antes de los experimentos, bajo condiciones controladas de temperatura ambiente 22 °C, en cajas de policarbonato con cama estéril, con acceso libre a alimento y agua, y ciclos de 12 x 12 horas de luz-oscuridad.

Distribución de los ratones

El diseño experimental contempló distribuir a los animales en un grupo control (ratones sanos, sin quemadura) y en grupo experimental (1 dpq) para secuenciación de miRNAs y validación. Cada grupo incluyó un mínimo de tres animales para garantizar la representatividad de los datos.

Inducción de la quemadura profunda de segundo grado

Los animales fueron anestesiados por administración combinada de xilacina (10 µl) vía intramuscular y Ketamina (10 µl) vía intraperitoneal. Tras el efecto de la anestesia, se procedió a rasurar la región dorsolateral derecha del animal. La quemadura se indujo con un cautín previamente calentado a 95°C, el cual posee una plancha metálica circular de superficie aproximada de 1.8 cm de diámetro. Este

se presionó por 2 segundos en el área rasurada del ratón para inducir específicamente la quemadura profunda de segundo grado (Gonzales, 2017). Esta lesión representa aproximadamente el 8% de la superficie corporal total del ratón.

Para el proceso de recuperación los animales se mantuvieron en una temperatura de 35-37°C para minimizar el riesgo de hipotermia. Después de la quemadura, los animales se mantuvieron en cajas de policarbonato con cama limpia y estéril, con acceso libre a alimento y agua, y ciclos de 12 x 12 horas de luz-oscuridad.

Modelo murino de quemadura de segundo grado profundo

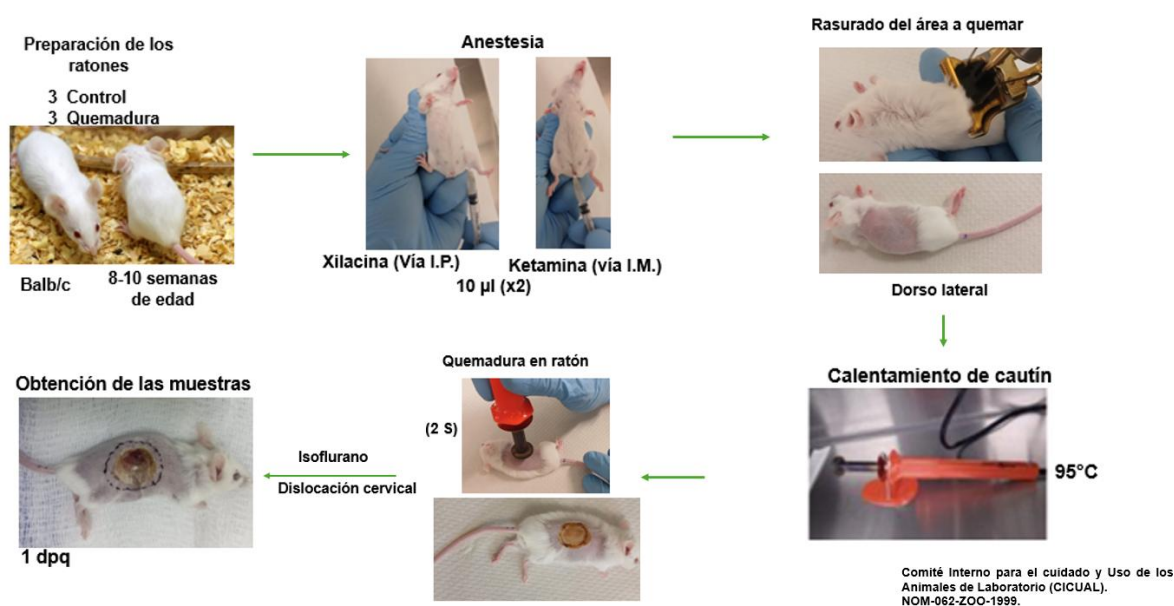


Figura 8. Modelo Murino de Quemadura Profunda de segundo grado.

Procedimiento experimental de inducción de quemadura en ratones Balb/c y obtención de muestras a 1 dpq.

Eutanasias

En todos los grupos, los ratones fueron sometidos a eutanasia en el día correspondiente post-quemadura o controles (sin lesión), utilizando isoflurano como anestésico. Tras el efecto de la analgesia, se empleó la técnica de dislocación cervical, para inducir las eutanasias.

7.3. Recolección y almacenamiento de muestras de piel.

Las muestras se obtuvieron bajo condiciones estériles, tras rasurar completamente el área de interés para exponer el tejido y facilitar la biopsia. En los grupos experimentales, el tamaño de la biopsia (Figura 9) fue de 2cm de diámetro correspondiente a 1.8cm de diámetro de la plancha del cautín, más 2 mm tomados del borde de la quemadura hacia la periferia, con el fin de abarcar las zonas de Jackson (necrosis, estasis e hiperemia) (Hettiaratchy & Dziewulski, 2004).

Las biopsias de los grupos control (piel sana) se extrajeron con dimensiones equivalentes a las de su homólogo experimental.

Las muestras se obtuvieron con sacabocados metálicos inoxidables y material de disección estéril, y se mantuvieron hidratadas en PBS 1X frío hasta eliminar el exceso de tejido adiposo. Finalmente, fueron transferidas a buffer de lisis (miRVana™ miRNA Isolation Kit, Ambion/Thermo Fisher Scientific) y almacenadas en hielo hasta su procesamiento posterior.

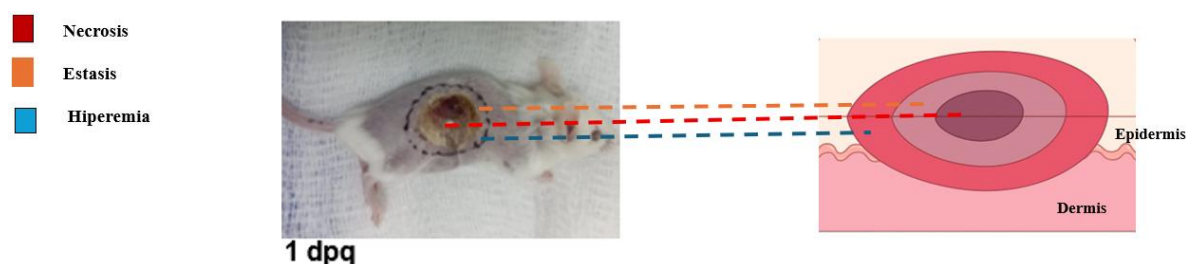


Figura 9. Zonas de Jackson en el modelo murino de quemadura profunda de segundo grado.

A la izquierda, imagen representativa de la lesión a las 24 hrs post-quemadura (1dpq) en la región dorso lateral derecha. En ella se delimitan las zonas de concéntricas definidas por Jackson (zona de necrosis, estasis e Hiperemia). A la derecha una imagen que esquematiza las mismas zonas.

7.4. Histología de tejido con quemadura profunda de segundo grado.

Las biopsias cutáneas con quemadura profunda de segundo grado se fijaron en Safefix II (24 h, temperatura ambiente) para preservar la arquitectura tisular. Posteriormente se sometieron a deshidratación progresiva mediante alcohol etílico en concentraciones de 50%, 70%, 85%, 96% y 100%, seguida de un proceso de

aclaramiento en xilol e inclusión en parafina fundida (60°C). De los bloques obtenidos se realizaron cortes de 5 µm en micrótopo rotatorio, montados en portaobjetos y secados a 37 °C.

La tinción histológica se llevó a cabo con el método convencional de Hematoxilina y Eosina (H&E). Tras el desparafinado en xilol y rehidratación a través de alcoholes descendentes (100%, 96%, 70%) hasta agua, se aplicó hematoxilina de Harris para la tinción nuclear y eosina acuosa como contraste citoplasmático. Finalmente, los tejidos se deshidrataron, aclararon nuevamente en xilol y se montaron permanentemente con resina sintética (DPX) bajo cubreobjetos.

7.5. Extracción de miRNAs

El proceso de extracción de miRNAs se realizó a partir de las muestras de tejido previamente recolectadas, utilizando 100-200 ng de tejido por muestra. Se empleó el kit miRVana™ miRNA Isolation kit (Ambion/Thermo Fisher Scientific, Cat. No. AM1560), siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando materiales libres de RNAsas, guantes y superficies descontaminadas con RNaseZap™.

Determinación del peso del tejido

Los fragmentos de tejido fueron colocados en tubos gentleMACS™ previamente pesados. Tras añadir el tejido, se obtuvo el peso neto haciendo el cálculo por diferencia gravimétrica. Este ajuste permitió aplicar volúmenes de reactivos proporcionales a la masa del tejido.

Lisis y homogeneización

Cada muestra se suspendió en 1 ml de amortiguador de lisis y se disgregó utilizando un disociador de tejidos GentleMACS, con el programa preconfigurado h-tumor-01 (duración ≈ 37 s, por 2 ciclos de disociación) asegurando la completa ruptura celular. El tampón de lisis promovió la desnaturalización de proteínas y la liberación de ácidos nucleicos.

Extracción orgánica

Al homogenizado se le adicionaron 300 μ l del aditivo de homogeneización específico para miRNA, para favorecer la preservación de moléculas pequeñas, y se incubó la mezcla en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se agregó 1 ml de ácido-fenol: cloroformo, se dio vortex por 60 segundos y se centrifugó a 10,000 rpm durante 13 minutos a temperatura ambiente. Esto para la separación de las fases: fase orgánica inferior rica en proteínas y lípidos, una interfase donde se concentran restos de ADN y proteínas, y una fase acuosa superior que contiene el RNA. La fase acuosa fue cuidadosamente transferida a un nuevo tubo, evitando arrastrar material de la interfase.

Fijación y filtración en columnas

A la fase acuosa se añadieron 500 μ L de etanol absoluto a temperatura ambiente, lo que facilita la unión del RNA a la matriz de sílica de los cartuchos de filtración del kit. La mezcla se aplicó al cartucho y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos, reteniendo los ácidos nucleicos en la membrana de la columna y descartando el sobrenadante.

Lavados de purificación

Los cartuchos se sometieron a lavados sucesivos con las soluciones de limpieza incluidas en el kit: primero 700 μ L de solución de lavado 1 y posteriormente dos rondas con 500 μ L de la solución de lavado 2/3, cada una seguida de centrifugación a 10,000 rpm. Estos pasos eliminaron proteínas residuales, sales y otros contaminantes. Un centrifugado adicional de 1 minuto a 10,000 rpm permitió eliminar restos de etanol.

Elución del RNA

El cartucho se transfirió a un tubo limpio y se adicionaron 100 μ L de agua libre de nucleasas precalentada a 95 °C directamente sobre la membrana, con el fin de liberar el RNA retenido. Tras centrifugación a 1,000 rpm por 30 segundos, el RNA purificado se recuperó y fue almacenado a -80 °C hasta su análisis posterior.

El RNA extraído se cuantificó inmediatamente utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se registraron los valores de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm para estimar la pureza del RNA, considerando adecuados los valores cercanos a 2.0 y 2.2, respectivamente. Posteriormente las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

7.6. Secuenciación de RNAs pequeños (sRNA-seq)

En colaboración con la Unidad de Alta Tecnología (UAT) de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), se procesaron las muestras de RNA extraído para la construcción de bibliotecas y secuenciación. Para la evaluación de la calidad, la UAT estableció como parámetros de control la concentración de RNA (ng/μl), la cantidad total recuperada (μg) y el porcentaje de fracción correspondiente a miRNAs. Solo aquellas muestras que cumplieron los criterios establecidos fueron autorizadas para proceder a la construcción de librerías.

Las bibliotecas de secuenciación se construyeron utilizando el kit TruSeq Small RNA Library Prep (Illumina); y la secuenciación de RNA pequeño (sRNA-seq) se llevó a cabo en la plataforma de NextSeq 2000 Illumina con una configuración Single-end 1x150 pares de bases (pb), con una profundidad de 12M de lecturas por muestra. Al concluir la secuenciación, se obtuvieron archivos de salida en formato Fastq que contenían lecturas cortas representativas de los miRNAs expresados en cada muestra.

7.7. Procesamiento Bioinformático de los datos de sRNA-seq

Se realizó el análisis de control de calidad de las secuencias mediante FastQC, El parámetro principal evaluado fue Per-base sequence quality, que reporta el score de calidad Q (Phred) en cada posición de la lectura. Los valores Q se interpretaron según la escala de Phred: $Q \geq 30$ (calidad alta), $Q = 20-30$ (calidad aceptable), $Q < 20$ (calidad baja) (Andrews, 2010). Los archivos fastq que presentaron lecturas de baja calidad (Phred < Q20), fueron filtrados con Cutadapt para eliminar adaptadores y lecturas de baja calidad, garantizando las secuencias óptimas para los análisis posteriores.

Posteriormente, en un gestor de entornos Conda con Python, se implementó la herramienta bioinformática miRge3.0, un pipeline que constituye una suite de herramientas bioinformáticas para el análisis de datos de secuenciación de RNA-sea (Figura 10a) para la anotación de RNAs pequeños, en específicos los miRNAs. Entre las funciones principales se incluyeron la evaluación de la calidad de las secuencias en formato Fastq, el recorte de adaptadores mediante Cutadapt, el alineamiento contra genoma de referencia de *Mus musculus* (GRCm39) mediante Bowtie2 y la anotación de miRNAs utilizando la base de datos miRBase (Patil & Halushka, 2021). Finalmente, se obtuvo la matriz de conteo de miRNAs para su posterior análisis (Figura 10b).

MiRge3.0 para el análisis de sRNA-Seq

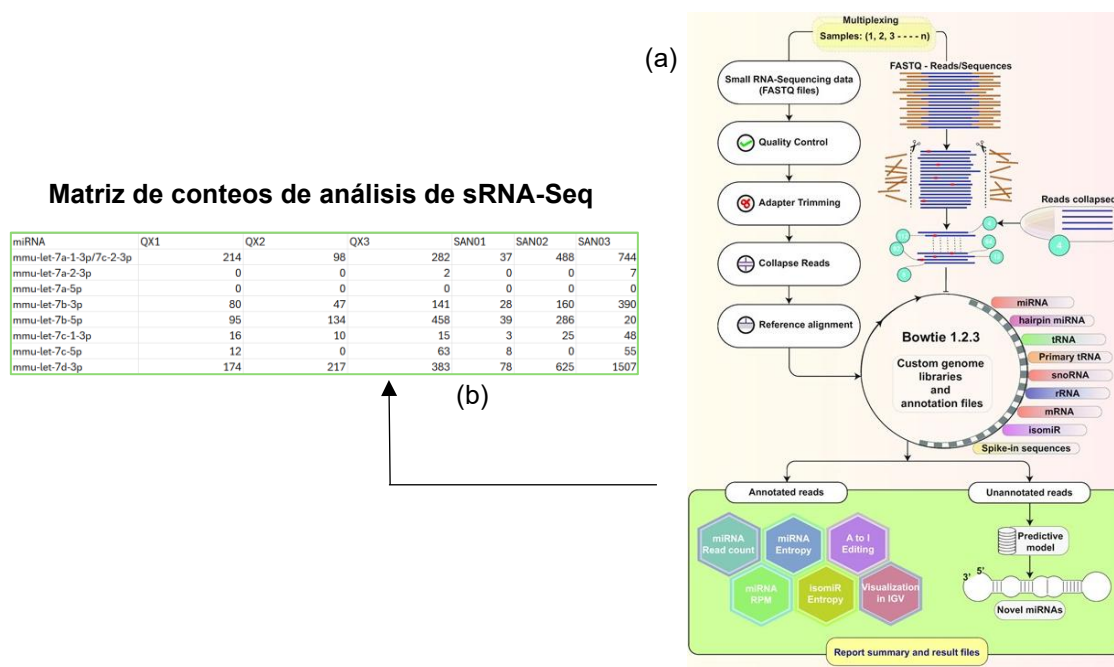


Figura 10. Pipeline bioinformático y matriz de conteos generados por miRge3.0.

(a) Flujo de análisis de sRNA-Seq mediante miRge3.0, incluye control de calidad, recorte de adaptadores, colapso de lecturas, alineamiento con Bowtie2 al genoma de referencia (GRCm39) y anotación de miRNAs utilizando miRBase. (b) Matriz de conteos de miRNAs obtenida a partir de las lecturas mapeadas. Imagen modificada de (Patil & Halushka, 2021)

7.8. Análisis de la expresión diferencial

Los conteos de miRNAs obtenidos de la matriz fueron analizados para identificar aquellos diferencialmente expresados entre el grupo control (tejido sano, extraído el

mismo día del muestreo; $n=3$) y el grupo experimental (1 dpq; $n=3$). El análisis se llevó a cabo en el entorno de R utilizando el paquete edgeR del proyecto Bioconductor, de acuerdo con lo descrito por Chen et al.(2024). Para ello, se aplicó un modelo lineal generalizado (GLM) con una distribución binomial negativa, ajustando el análisis al método de cuasi-verosimilitud (QL). Este enfoque permitió detectar con precisión los miRNAs expresados diferencialmente entre ambos grupos.

Con los resultados de expresión diferencial, los criterios aplicados para determinar los miRNAs diferencialmente expresados fueron:

- $FDR < 0.05$ (ajuste por Benjamin-Hochberg).
- $|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 1.5$, correspondiente a un cambio de expresión de al menos ~ 2.8 veces entre grupos.

7.9. Análisis de Enriquecimiento Funcional

El análisis de enriquecimiento funcional se realizó con la plataforma DIANA-miRPath v4.0, utilizando como entrada los miRNAs diferencialmente expresados obtenidos en los análisis previos y seleccionando como organismo de referencia *Mus musculus* (GRCm39). Esta herramienta integra tanto interacciones miRNA–mRNA validadas experimentalmente (TarBase, miRTarBase, CLIP-seq) como interacciones predichas in silico mediante algoritmos bioinformáticos (TargetScan, DIANA-microT-CDS). En este último caso, la predicción se basa en la complementariedad de secuencias entre el miRNA y la región 3'UTR del mRNA, considerando además la conservación evolutiva, temperatura de fusión y la accesibilidad estructural del sitio de unión (Tastsoglou et al., 2023). De igual manera mediante las listas de genes diana predichos, mediante miRPath se identificaron los procesos biológicos y vías de señalización reguladas por los miRNAs seleccionados. La significancia de los términos se evaluó mediante pruebas de enriquecimiento y los valores de p se ajustaron con el método de Benjamini–Hochberg, considerando como significativos aquellos con un $FDR < 0.05$.

8. ANÁLISIS *IN SILICO* PARA COMPRENDER EL PAPEL DE LOS MIRNAS EN LA CICATRIZACIÓN DE QUEMADURAS DE PIEL.

Redes de interacción génica

Para comprender mejor las redes funcionales en las que participan los genes blanco de los miRNAs de interés (mmu-miR-21a-3p, mmu-miR144-5p y mmu-miR223-5p), se generaron redes de interacción génica para comprender como podrían estarse vinculado los genes blancos con otros genes y pudieran tener implicación en el proceso de cicatrización de heridas por quemaduras en piel. Primero, integramos listas de genes diana de los miRNAs de interés en la plataforma GeneMANIA (Franz et al., 2018). Esta herramienta pondera e integra datos genómicos y transcriptómicos.

Los parámetros de búsqueda se configuraron para restringir los resultados únicamente a interacciones respaldadas por evidencia experimental directa, seleccionando las siguientes categorías de evidencia experimental:

- **Interacciones Físicas:** (ej.: complejos proteicos, uniones confirmadas por co-immunoprecipitation).
- **Co-expresión:** Perfiles de expresión génica correlacionados a través de múltiples condiciones experimentales.
- **Colocalización:** Compartir la misma localización subcelular.

9. RESULTADOS

Este trabajo muestra los resultados obtenidos del análisis experimental y bioinformático realizado en muestras de piel de ratón de la cepa Balb/c de los grupos control y experimental en ratones con daño por quemadura profunda de segundo grado. Como se menciona en metodologías, de las muestras de tejido se extrajo RNA total y posteriormente se realizó una secuenciación masiva de RNAs pequeños (sRNA-seq) con el objetivo de identificar el perfil de expresión de miRNAs en una

etapa aguda (24 hrs) después de que se genera el daño por quemadura de segundo grado profundo.

9.1. Quemadura profunda de segundo grado y definición del área de estudio.

Para confirmar que la lesión generada correspondía a una quemadura profunda de segundo grado, se realizaron cortes histológicos de la piel a las 24 hrs post-quemadura y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E). En la Figura 11 se muestra un corte longitudinal representativo donde se observan las diferentes zonas de la lesión por quemaduras descritas por Jackson (necrosis, estasis e hiperemia), además de la piel sana adyacente como referencia de tejido no lesionado.

- **Piel sana (S):** Presenta una estructura estratificada y definida, con epidermis, dermis e hipodermis intactas y sin daño organizacional.
- **Zona de hiperemia (H):** La epidermis conserva su continuidad, pero pierde la estructura de las invaginaciones características. La dermis aparece ligeramente engrosada pero los anexos cutáneos se observan intactos.
- **Zona de estasis (E):** Se observa la pérdida de integridad tisular en la epidermis, degeneración de anexos cutáneos y signos de alteración de la matriz extracelular en la dermis.
- **Zona de necrosis (N):** Se observa una completa destrucción de la epidermis. La arquitectura dermal está completamente desorganizada, se observa la desnaturalización de proteínas colágenas y degeneración de anexos cutáneos, pero la hipodermis se muestra intacta, lo que confirma la profundidad de la lesión.

Con base en estos hallazgos, se definieron las áreas de necrosis, estasis e hiperemia para la posterior extracción de RNA y secuenciación de miRNAs (sRNA-seq)

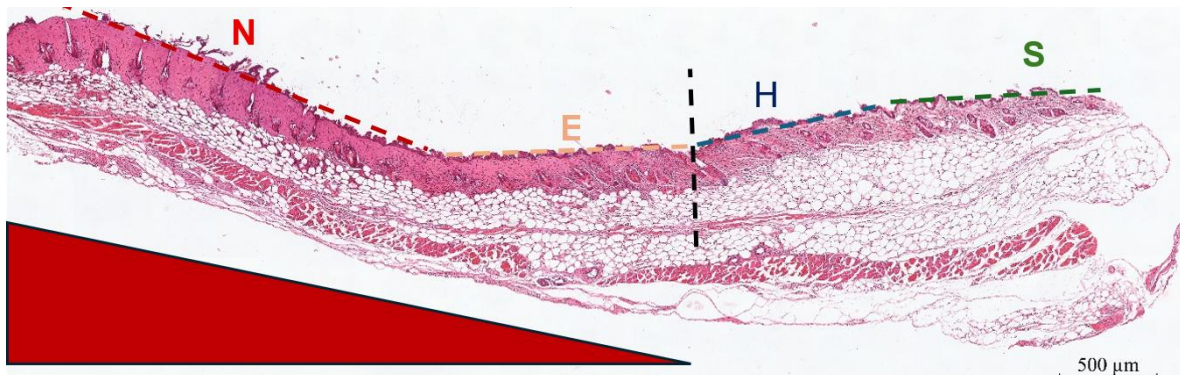


Figura 11. Histología de ratón con quemadura profunda de segundo grado. Corte histológico longitudinal de piel de ratón con quemadura profunda de segundo grado a 1dpq, teñido con H&E, (500 μ m de escala). Se aprecian las zonas concéntricas de la quemadura definidas por Jackson: N (necrosis), E (estasis), H (hiperemia) y S (piel sana adyacente). La figura geométrica indica que el mayor daño tras la quemadura se da en la necrosis y disminuye hacia estasis.

9.2. Aislamiento y secuenciación de miRNAs de piel de ratón con y sin quemadura profunda de segundo grado.

Tras la obtención de las muestras de tejido, se procedió a la extracción de RNA total, enriqueciendo la fracción de RNAs pequeños, como se describe en metodologías. En la tabla 2, se muestran los valores de concentración, volumen y porcentaje relativo de miRNAs obtenidos en 3 muestras independientes de piel no quemada (control) y 3 muestras independientes de piel con quemadura profunda de segundo grado a 1 dpq (experimental). Todas las muestras mostraron un porcentaje de miRNAs entre el 30% y el 52%, cumpliendo así con el criterio de calidad mínimo establecido ($\geq 30\%$) para ser consideradas aptas para la construcción de bibliotecas de secuenciación.

Tabla 2. Control de calidad de RNA total enriquecido en RNAs pequeños.

ID de la muestra	Grupo	Volumen Final (μ L)	Concentración (ng/ μ L)	Cantidad total (μ g)	%miRNA	Apto para biblioteca
SANO1	Sano	15	231	3.47	45%	Sí
SANO2	Sano	15	441.5	6.62	35%	Sí
SANO3	Sano	15	310.2	4.65	30%	Sí
QX1	Quemado	15	123	1.85	35%	Sí
QX2	Quemado	15	704	10.56	49%	Sí
QX3	Quemado	15	159.8	2.4	52%	Sí

Se muestran los valores de volumen final, concentración, cantidad total y porcentaje relativo de miRNAs obtenidos tras extracción y análisis con Agilent Bioanalyzer 2100/TapeStation (Small RNA kit). Las muestras con $\geq 30\%$ de miRNAs fueron consideradas aptas para la construcción de bibliotecas de secuenciación, resultando 6 muestras aceptadas en total.

La presencia de miRNAs en las muestras extraídas se evaluó mediante análisis de electroforesis en chip. Los electroferogramas obtenidos mostraron múltiples picos distribuidos entre 20 y 100 nucleótidos (nt), cuya abundancia relativa se reflejó en la intensidad de fluorescencia (FU). Dentro de este rango, la fracción de 20 a 40 nt correspondió a miRNAs, con un 30-45% en las muestras de piel sana y un 35-52%

en las muestras de piel quemada a 1 dpq. Además, se detectaron señales en regiones mayores a 60 nt, atribuibles a otras especies de RNA pequeño, como tRNAs o fragmentos de rRNA, lo que indicó diferencias en la composición global de RNA entre condiciones. Adicionalmente, se distinguieron picos en regiones mayores a 60 nt atribuibles a otras especies de RNA pequeño, como tRNAs o fragmentos de rRNA, lo que sugirió diferencias en la composición global de RNA entre las condiciones. En la Figura 12 se muestra un ferograma representativo de cada condición.

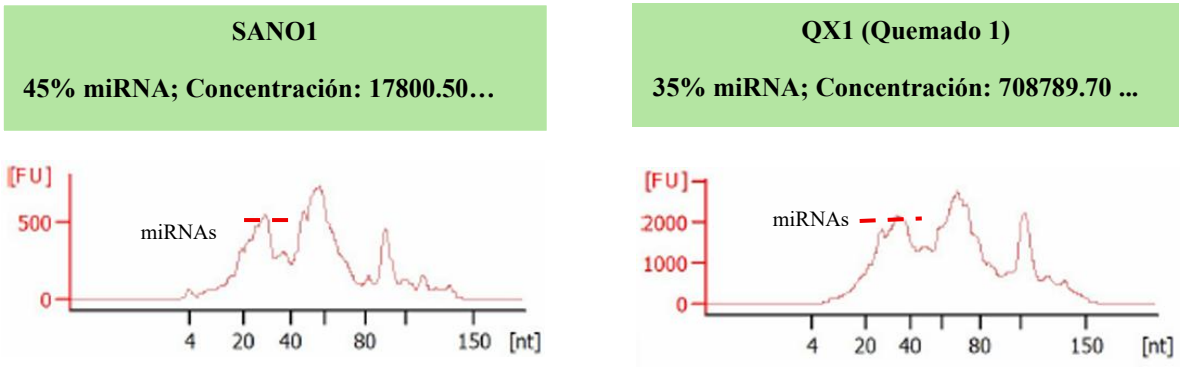


Figura 12. Electroferogramas de RNA total enriquecido en RNAs pequeños. Perfiles representativos de piel sana (SANO1) y quemada (QX1, 1 dpq). Los picos entre 20 y 40 (nt) correspondieron a miRNAs, con un 45% y 35% de abundancia relativa (FU),

Posteriormente, se evaluó la calidad de las librerías de secuenciación a partir de parámetros como la concentración, el tamaño promedio de los fragmentos y la molaridad. En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos, donde se observa que todas las librerías presentaron un tamaño constante de 150 pb, correspondiente al esperado tras la adición de adaptadores. Aunque las concentraciones y molaridades variaron entre muestras (1.1–4.5 ng/μL y 14–182 nM, respectivamente), todas fueron consideradas aptas para su secuenciación.

Tabla 3. Control de calidad de las bibliotecas de secuenciación				
Muestra	Concentración (ng/μL)	Tamaño promedio (pb)	Molaridad (nM)	Evaluación
SANO1	1.1	150	14	Apta
SANO2	3.8	150	172	Apta
SANO3	3.2	150	157	Apta
QX1	2.03	150	83	Apta
QX2	4.5	150	182	Apta
QX3	4.4	150	178	Apta

Valores de concentración, tamaño promedio y molaridad de cada muestra evaluada para determinar su aptitud de secuenciación.

En la Figura 13 se muestran los electroferogramas obtenidos con la plataforma TapeStation 4200 (Agilent) para verificar la calidad de las librerías preparadas para secuenciación. Cada trazo corresponde a una librería individual; El 1 es el ladder electrónico usado para la calibración de tamaño. El eje X indica el tamaño en pares de bases (pb) y el eje Y la intensidad de fluorescencia normalizada (FU). Todas las librerías presentaron un perfil limpio con un único pico centrado alrededor de 150 pb, consistente con el tamaño esperado tras la adición de adaptadores.

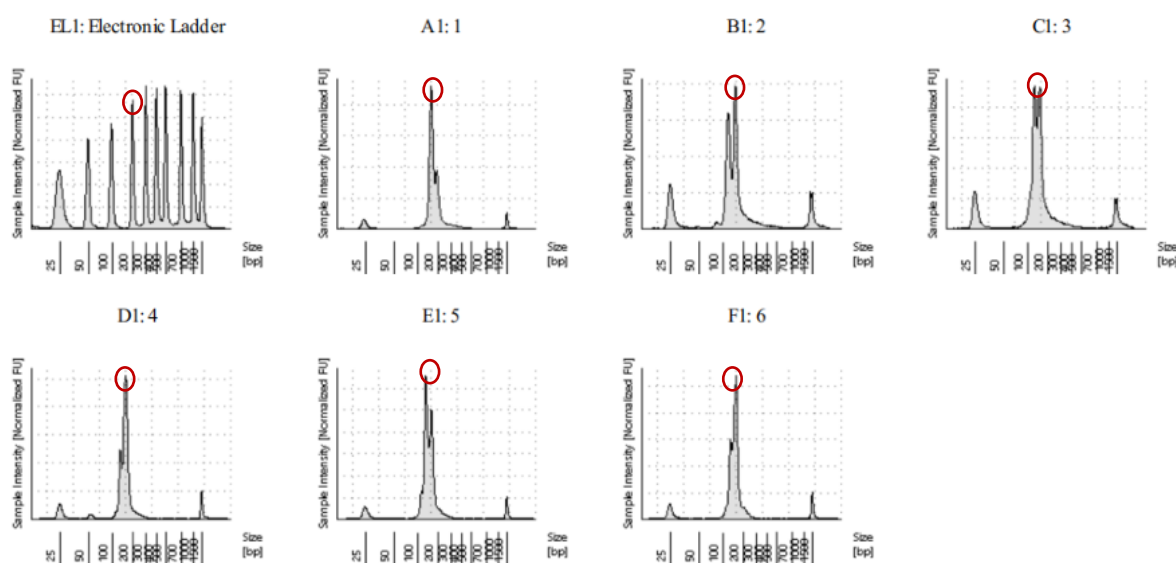


Figura 13. Electroferogramas del control de calidad de librerías de small RNA. Se muestran seis librerías (A1–F1) y el Ladder electrónico (EL1). Los perfiles exhibieron un único pico en ~150 pb (X = tamaño [pb]; Y = FU normalizada), tamaño esperado tras la preparación de librerías, por lo que se consideraron aptas para secuenciación.

Una vez que las bibliotecas de secuenciación pasaron los filtros de control de calidad, se realizó la secuenciación en la plataforma NextSeq (Illumina), como se describe en la sección de metodologías.

9.3. Análisis bioinformático para la cuantificación e identificación del perfil de miRNAs en piel de ratón con y sin quemadura profunda de segundo grado.

Control de calidad de las lecturas de secuenciación

Las lecturas crudas (Figura 14) presentaron una disminución marcada en la calidad hacia el extremo 3' tanto en el grupo sano (a) como en el grupo con quemadura (c),

con valores de Phred inferiores a Q20, indicativos de la presencia de adaptadores y bases de baja calidad. Después del filtrado con Cutadapt, los perfiles de calidad mejoraron en ambos grupos (b, d).

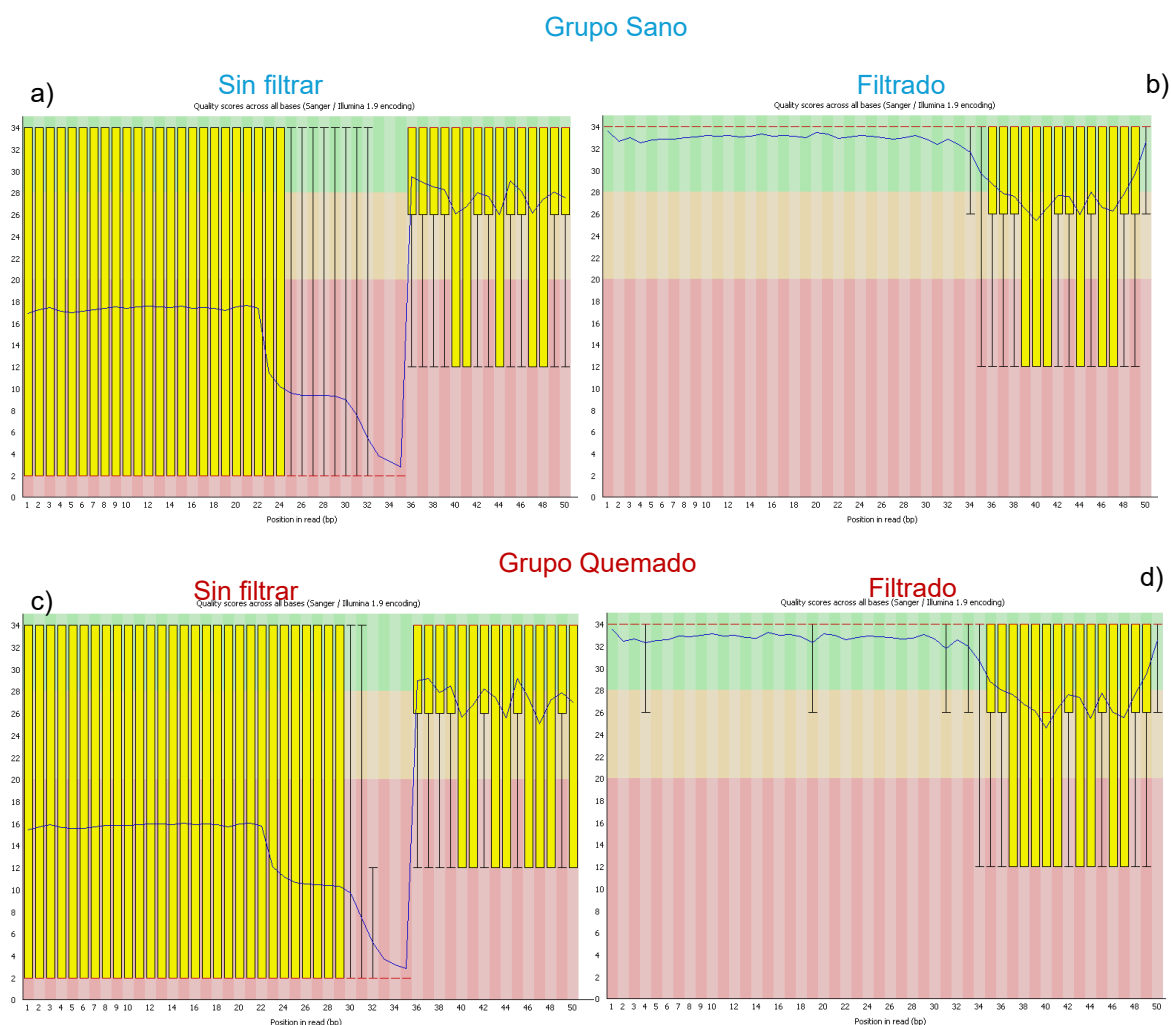


Figura 14. Perfiles de calidad de las lecturas Fastq antes y después del filtrado. El recorte con Cutadapt mejoró la calidad general y eliminó adaptadores.

Los archivos Fastq obtenidos se procesaron mediante el pipeline miRge3.0, utilizando el genoma de referencia del ratón (GRCm39). Como salida principal, este análisis generó una matriz de conteos crudos (no normalizados), que contiene el número de lecturas asignadas a cada miRNA en todas las muestras.

En la Tabla 4 se muestra un fragmento representativo de dicha matriz. La primera columna lista los identificadores de miRNAs, mientras que las columnas siguientes corresponden a cada muestra (tres con quemadura: QX1, QX2, QX3; y tres

controles: SANO1, SANO2, SANO3). Los valores reflejan el número de lecturas mapeadas a cada miRNA, lo cual representa su nivel de expresión antes de aplicar cualquier proceso de normalización.

Tabla 4. Fragmento representativo de la matriz de concepto generada con miRge3.0.

miRNA	QX1	QX2	QX3	SANO1	SANO2	SANO3
mmu-let-7a-1-3p/7c-2-3p	209	99	277	37	485	735
mmu-let-7a-2-3p	0	0	2	0	0	7
mmu-let-7a-5p	18508	16827	27615	7613	28306	62029
mmu-let-7b-3p	0	0	0	0	0	0
mmu-let-7b-5p	12431	8546	26451	4171	22211	70242
mmu-let-7c-1-3p	16	10	15	3	25	48
mmu-let-7c-5p	62698	54565	134327	23844	93116	273323
mmu-let-7d-3p	174	217	383	78	624	1509
mmu-let-7d-5p	1688	1035	2034	338	2387	6256
mmu-let-7e-3p	22	6	17	0	47	73
mmu-let-7e-5p/7k	1952	1498	2180	650	2691	6136
mmu-let-7f-1-3p	0	0	0	0	0	0
mmu-let-7f-2-3p	0	0	0	0	0	0
mmu-let-7f-5p	68962	58437	98678	22199	67345	156483
mmu-let-7g-3p	0	8	0	0	25	0
mmu-let-7g-5p	7400	4883	10795	1565	7918	17290

Se muestran los niveles de cuantificación para distintos miembros de las familias de los miRNAs.

La matriz de conteo fue procesada con el paquete EdgeR de Bioconductor para el análisis genómico. Se identificaron nueve miRNAs con expresión diferencial significativa entre los grupos de ratones sanos y quemados, aplicando como criterios de selección un valor de FDR < 0.05 y un $|\text{Log2FC}| \geq 1.5$.

En la Figura 15, se muestra el heatmap generado a partir de los valores de expresión normalizados de estos miRNAs, lo cual permite visualizar patrones de agrupamiento entre las muestras. Se observa una clara separación entre los grupos, donde las muestras con quemadura (QX) presentan una sobreexpresión consistente (colores rojos) en comparación con los controles sanos (colores verdes), evidenciando un perfil de expresión diferencial robusto y concordante con los criterios estadísticos aplicados.

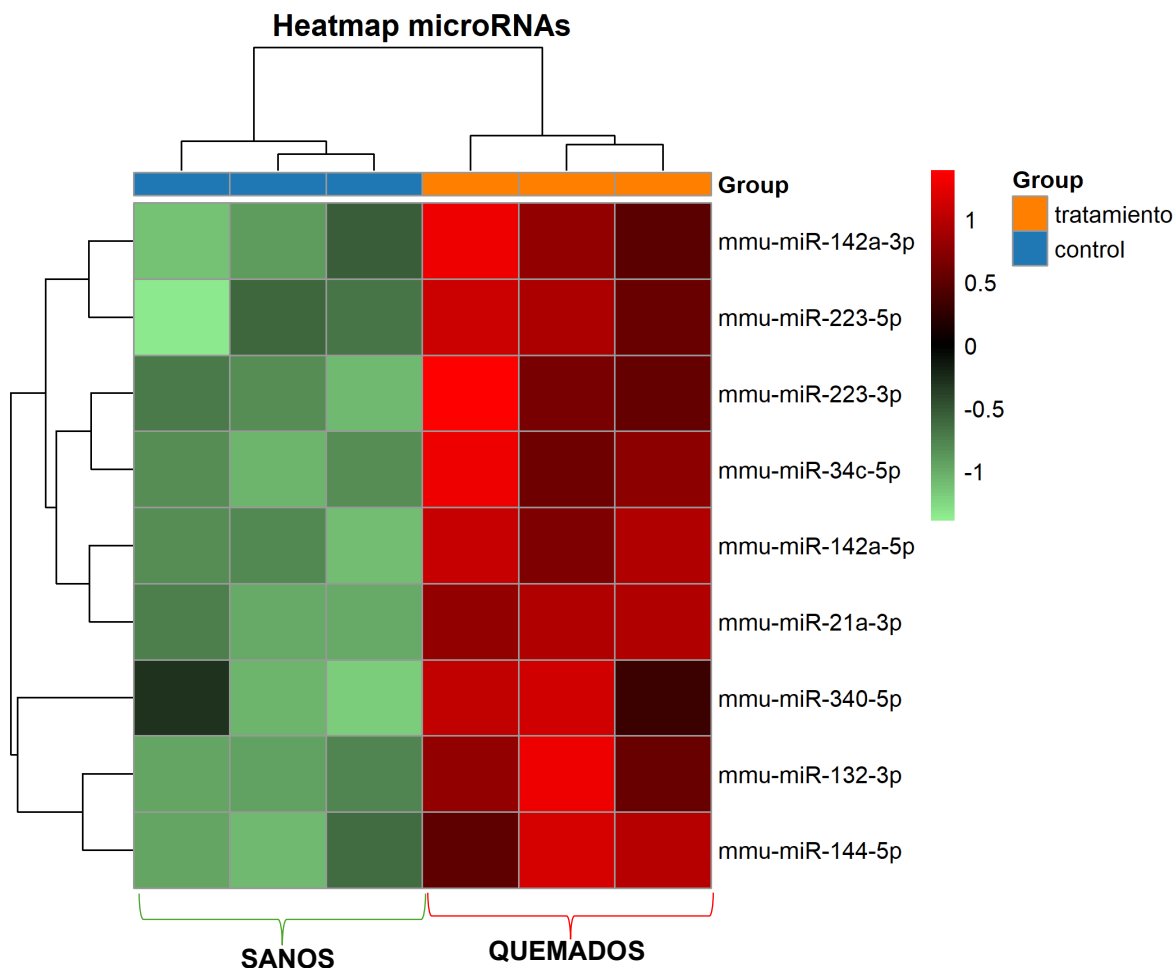


Figura 15. Heatmap de los miRNAs diferencialmente expresados entre piel sana y piel con quemadura. Se muestran los miRNAs con mayor diferencia de expresión entre los grupos. El color rojo indica mayor expresión relativa y el verde menor expresión. Las columnas corresponden a muestras individuales (3 controles sanos y 3 con quemadura); las filas representan cada miRNA.

Se construyó un volcano plot para representar gráficamente la relación entre la magnitud del cambio en la expresión ($\log_2$ Fold Change) entre las condiciones de grupo experimental y grupo control y la significancia estadística ($-\log_{10}$ del valor de FDR) de cada miRNA identificado (Figura 16). En la figura se observan en color rojo los 9 miRNAs significativamente sobreexpresados en las muestras con quemadura profunda de segundo grado, de acuerdo con los criterios estadísticos establecidos ($|\log_2\text{FC}| \geq 1.5$ y $\text{FDR} < 0.05$). No se identificaron miRNAs subexpresados de forma significativa en el grupo tratado. Los miRNAs diferencialmente expresados son: mmu-miR-21a-3p, mmu-miR-142a-3p, mmu-miR-142a-5p, mmu-miR-223-3p, mmu-miR-223-5p, mmu-miR-340-5p, mmu-miR-144-5p, mmu-miR-132-3p y mmu-miR-34c-5p.

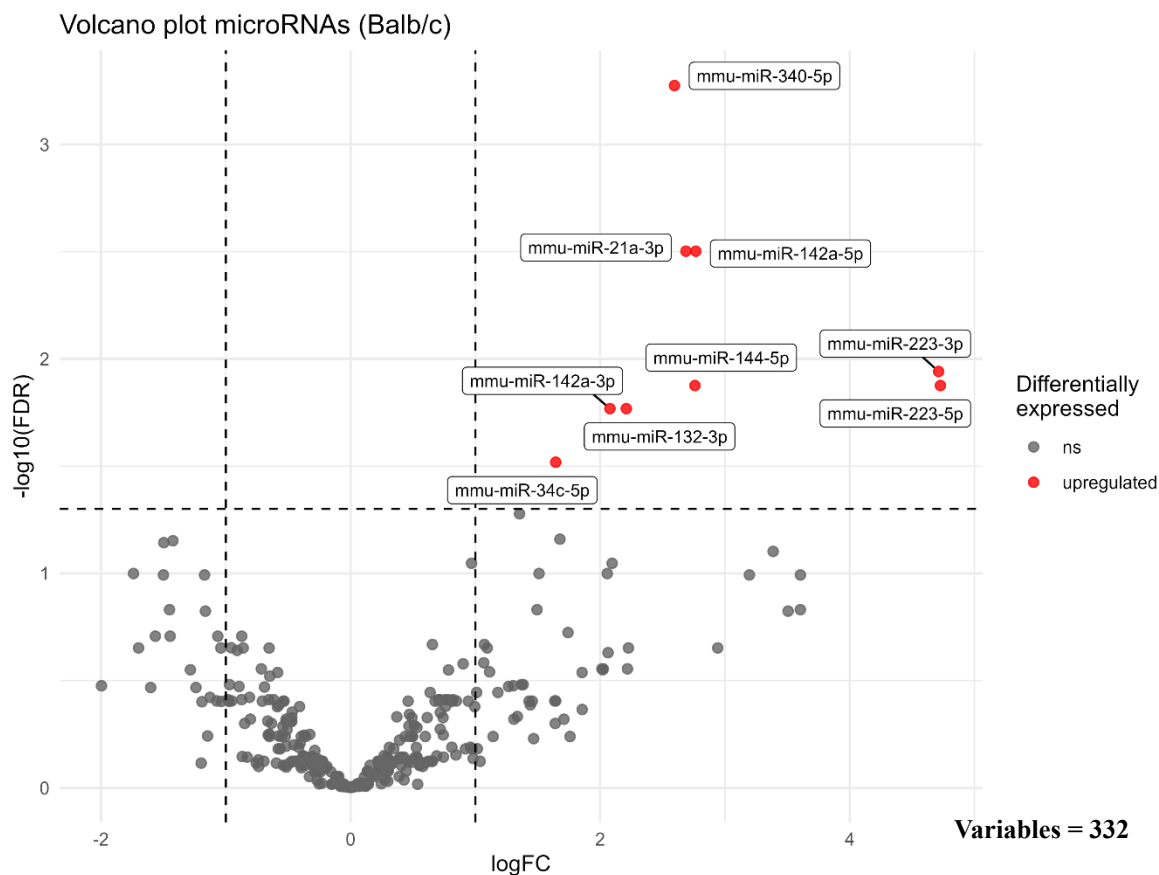


Figura 16. Volcano plot de miRNAs diferencialmente expresados entre piel quemada y control. Los puntos rojos indican miRNAs con expresión significativa ($FDR < 0.05$; $|\log_2FC| \geq 1.5$).

9.4. Análisis de enriquecimiento funcional e interacción con genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados en piel con quemadura profunda de segundo grado.

Se seleccionó la lista de los 9 miRNAs con cambio de expresión diferencial y se predijeron sus genes diana mediante la integración de la plataforma DIANA-miRPath v4.0. Para los análisis de enriquecimiento funcional se utilizaron anotaciones de Gene Ontology (GO) y KEGG pathways, aplicando criterios estadísticos de enriquecimiento por $FDR < 0.05$. El análisis de enriquecimiento funcional de los genes diana de los nueve miRNAs diferencialmente expresados

mostró un total de 25 vías de señalización significativamente enriquecidas (FDR < 0.05).

Estas vías se agruparon en categorías funcionales relacionadas con procesos clave de cicatrización, incluyendo inflamación (ej. NF- κ B, diferenciación de linfocitos Th1/Th2), proliferación celular (ej. PI3K-AKT, mTOR), migración (ej. regulación del citoesqueleto de actina, adhesión focal), así como estructura tisular y remodelación de matriz extracelular.

En conjunto, nuestros resultados evidencian que los miRNAs diferencialmente expresados tras la quemadura pueden tener un papel potencial en múltiples fases del proceso reparativo, desde la respuesta inflamatoria inicial hasta la proliferación celular y la reorganización estructural de la piel.

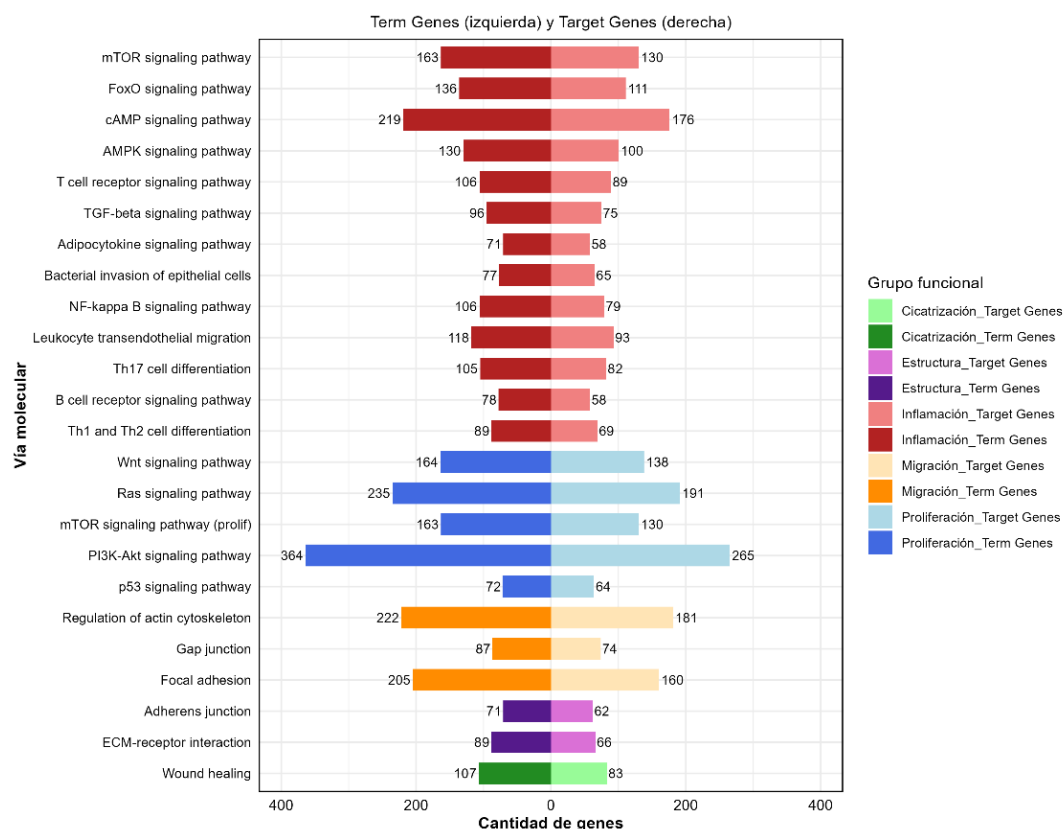


Figura 17. Enriquecimiento funcional de genes diana de miRNAs diferencialmente expresados. El análisis se realizó mediante miRPath V4.0, se basó en predicción de genes blanco y determinación de vías y procesos asociados a la cicatrización de heridas. El gráfico muestra las principales vías de señalización enriquecidas clasificadas por grupos funcionales (color) según la cantidad de genes implicados.

Con el objetivo de visualizar el grado de regulación que ejercen los miRNAs diferencialmente expresados sobre los genes diana previamente identificados en los análisis de enriquecimiento, se construyeron redes de interacción en Cytoscape. Estas redes permitieron observar qué tan conectado está cada miRNA y, en consecuencia, qué tan central podría ser en la regulación génica.

En la Figura 18 se aprecia un ejemplo de la red asociada a la vía de NF-KB, relacionada a la inflamación. En esta red los nodos azules representan los miRNAs diferencialmente expresados, mientras que los nodos naranjas corresponden a los genes diana. Los miRNAs forman interacciones con múltiples genes diana, destacando algunos miRNAs como mmu-miR-21a-3p, mmu-miR-223-5p y mmu-miR-144-5p, que aparecen asociados a un mayor número de genes en comparación con otros. Esta alta conectividad los posiciona como nodos centrales dentro de la red, lo que sugiere que tienen un potencial regulador más amplio.

De forma similar, en la Figura 19 se muestra la red de interacción asociada a procesos de cicatrización de heridas. En este caso, los nodos de color violeta representan a los miRNAs y los nodos verdes a los genes diana implicados en dichas funciones. Se observa que la organización de la red coloca nuevamente a los mismos tres miRNAs mencionados en la anterior red, como nodos centrales, regulando la mayoría de los grupos de genes asociados a procesos de cicatrización. La distribución de los nodos alrededor de estos miRNAs refuerza la idea de que actúan como reguladores clave frente a la quemadura, al estar vinculados con un mayor número de interacciones.

En conjunto, el análisis de redes no solo permitió confirmar la conectividad diferencial de los miRNAs seleccionados, sino también priorizar a aquellos que podrían tener mayor impacto en el control de la expresión génica durante el proceso de cicatrización.

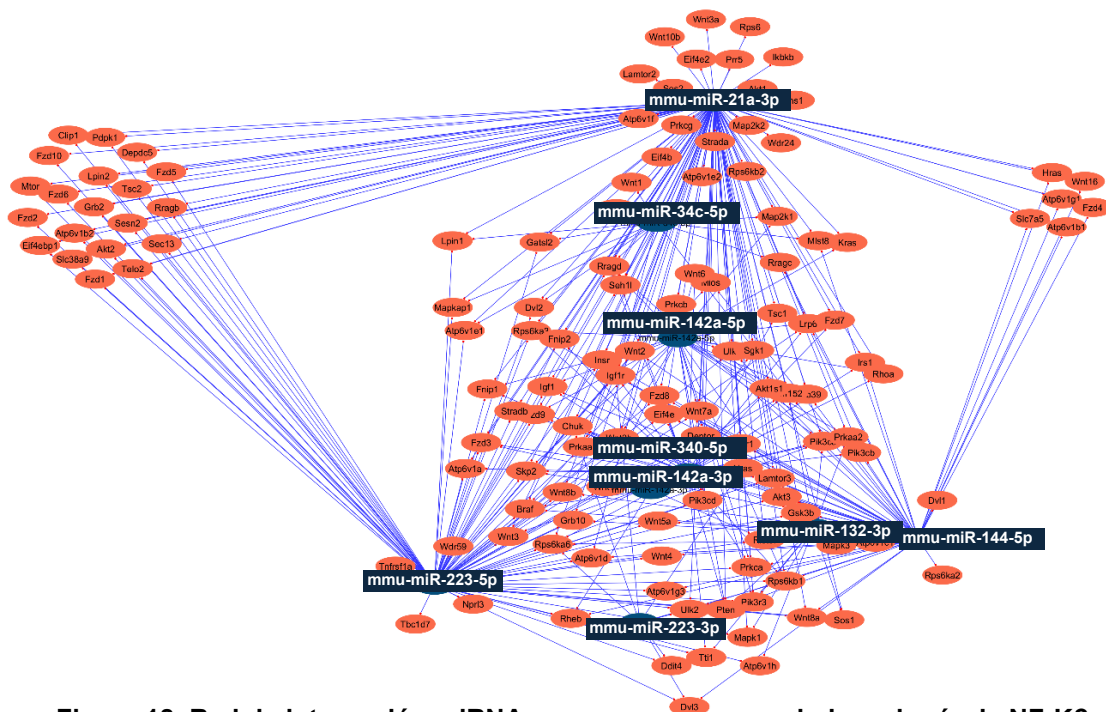


Figura 18. Red de interacción miRNA-gen para genes asociados a la vía de NF-Kβ.

Los miRNAs diferencialmente expresados (nodos azules oscuro) regulan múltiples genes diana (naranja), según la predicción de los análisis de enriquecimiento funcional en la vía de NF-Kβ asociada a la inflamación.

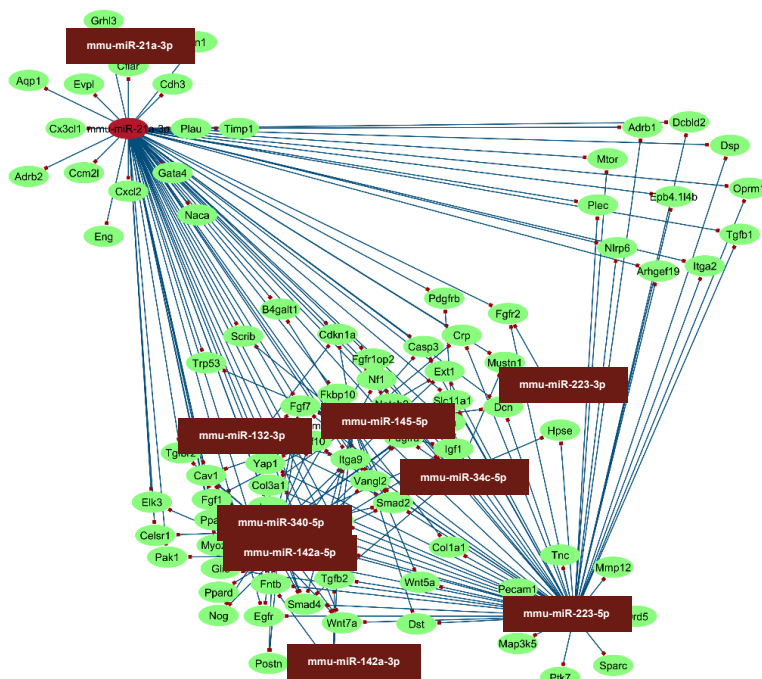


Figura 19. Red de interacción miRNA-gen para genes asociados a procesos relacionados con la reparación de heridas.

Los miRNAs diferencialmente expresados (nodos violetas oscuro) regulan múltiples genes diana (verdes), según la predicción de los análisis de enriquecimiento funcional en Gen ontology (GO) para procesos de reparación de heridas.

Interacción entre genes blanco y miRNAs en redes funcionales para complementar las redes de interacción, se realizó un análisis de solapamiento entre genes diana y miRNAs mediante representaciones tipo UpSet plot (Figuras 20 y 21). Estos gráficos permitieron cuantificar de manera precisa cuántos genes son regulados de forma exclusiva por un solo miRNA y cuántos son compartidos por múltiples miRNAs dentro de cada red analizada.

En el UpSet plot de la red de NF- κ B (Figura 19) se observó que varios genes diana son regulados simultáneamente por más de un miRNA, destacando mmu-miR-21a-3p, mmu-miR-223-5p y mmu-miR-144-5p como los principales reguladores con el mayor número de genes asociados. De forma similar, en el UpSet plot correspondiente a procesos de reparación de heridas (Figura 20), estos mismos miRNAs mostraron un patrón consistente de regulación sobre múltiples genes, reforzando su papel como nodos centrales dentro de las redes funcionales.

Estos resultados complementan la evidencia mostrada en las redes de Cytoscape, confirmando que ciertos miRNAs no solo regulan un número elevado de genes, sino que también comparten dianas clave, lo que sugiere un efecto coordinado en vías biológicas relacionadas con reparación tisular.

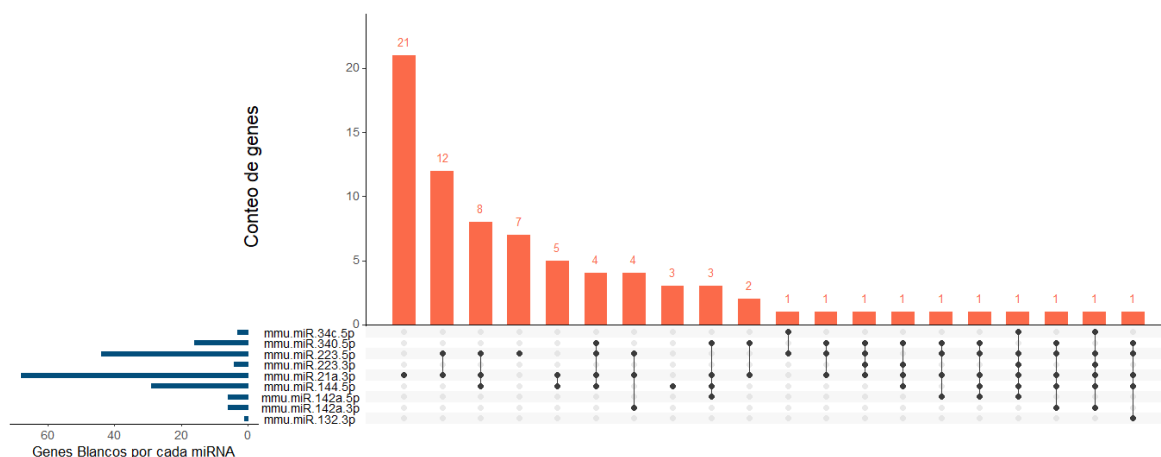


Figura 20. UpSet plot de la red asociada a la vía de NF- κ B, mostrando la distribución de genes diana regulados individualmente o de forma compartida por los miRNAs diferencialmente expresados.

miRNA ID	Significancia Estadística (DFR) (Max. 3 puntos)	Cambio de Expresión (Log2FC) (Max. 3 puntos)	Capacidad Predictiva (Max. 2 puntos)	Expresión Absoluta (Max. 1 punto)	Viabilidad Técnica (Max. 1 punto)	Suma Total (Max. 10 puntos)
mmu-miR-142a-5p	3	3	1	0	1	8
mmu-miR-21a-3p	3	3	2	0	1	9
mmu-miR-223-3p	2	3	1	1	1	8
mmu-miR-144-5p	2	3	2	1	1	9
mmu-miR-223-5p	2	3	2	1	1	9
mmu-miR-142a-3p	2	3	1	1	1	8
mmu-miR-132-3p	2	3	1	0	1	7
mmu-miR-34c-5p	2	2	1	1	1	7
mmu-miR-340-5p	3	2	1	1	1	8

9.6. Análisis in sillico para determinar el papel de los miRNAs en el proceso de cicatrización por quemaduras profundas de segundo grado en la piel.

Identificación de redes de interacción génica

Una vez definidos los miRNAs de interés (miR-21a-3p, miR-144-5p y miR-223-5p), se construyeron redes de interacción génica empleando la plataforma GeneMANIA, integrando los genes diana predichos con datos de genes con evidencia experimental basados en co-expresión, interacciones físicas y co-localización.

En la Figura 22a, se observa la red global generada, que refleja la complejidad de las interacciones moleculares asociadas. Posteriormente, se generaron subconjuntos de genes para cada miRNA: en el caso de mmu-miR-21a-3p (Figura 22b), mmu-miR-144-5p (Figura 22c) y mmu-miR-223-5p (Figura 22d). Para cada uno se identificaron alrededor de 20 genes adicionales (etiquetados como genes reguladores o interactuantes), que no estaban en la lista inicial de genes diana, pero que fueron conectados en la red por relaciones de homología funcional.

Estos resultados permitieron visualizar cómo los genes diana, no trabajan de manera aislada, sino que, también se encuentra en el centro de módulos de interacción más amplios, donde es probable saber la participación de más genes que comparten cierta homología funcional, y que también pueden estar implicados

al proceso de cicatrización en la piel, como respuesta al momento de recibir la quemadura.

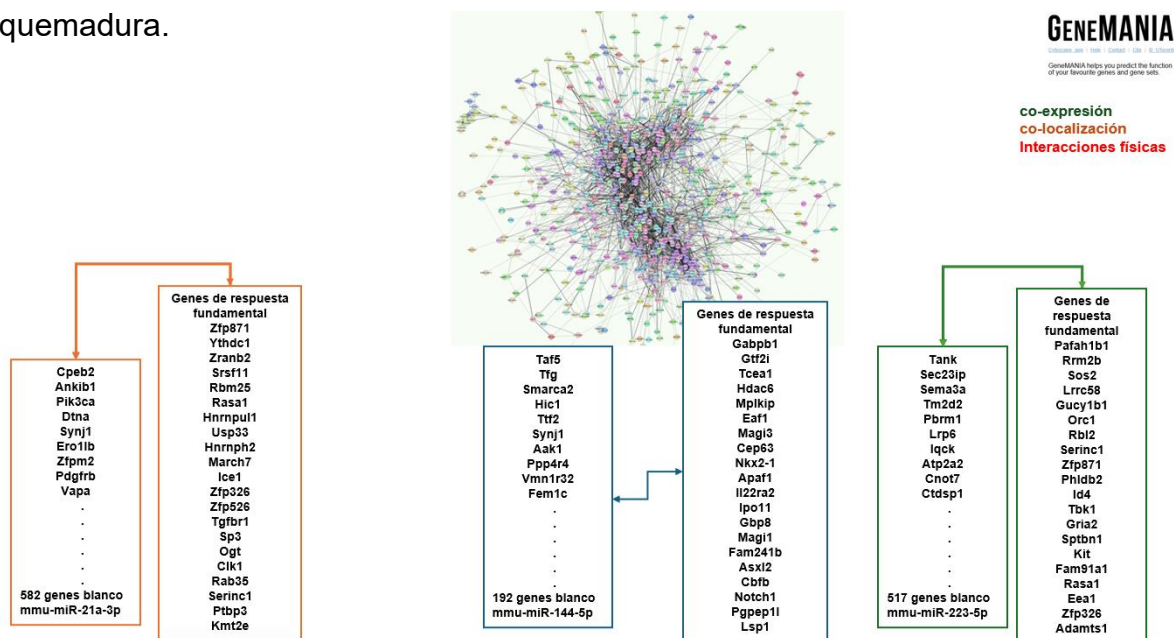


Figura 22. Redes de interacción génica generadas en GeneMANIA. (a) Red global de interacciones, (b) genes diana y reguladores asociados a miR-21a-3p, (c) miR-144-5p y (d) miR-223-5p.

Filtrado por relevancia biológica identifica 25 genes centrales enriquecidos en procesos clave de la cicatrización.

Para determinar la relevancia funcional de los 60 genes centrales identificados en la red de interacción génica, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional individual y una revisión exhaustiva de la literatura en bases como Ensembl, MGI y NCBI.

El filtrado permitió priorizar un conjunto de 25 genes con evidencia sólida en procesos asociados al proceso de reparación tisular. Como se observa en el dot plot de enriquecimiento funcional (Figura 23), estos genes se distribuyen principalmente en categorías de procesos biológicos relacionados con:

- Proliferación y migración celular
- Respuesta inflamatoria
- Angiogénesis.

- Remodelación de matriz extracelular

De manera destacada, RASA1 y RAB35 emergieron como genes prioritarios, con amplia evidencia de participación en proliferación, migración y angiogénesis.

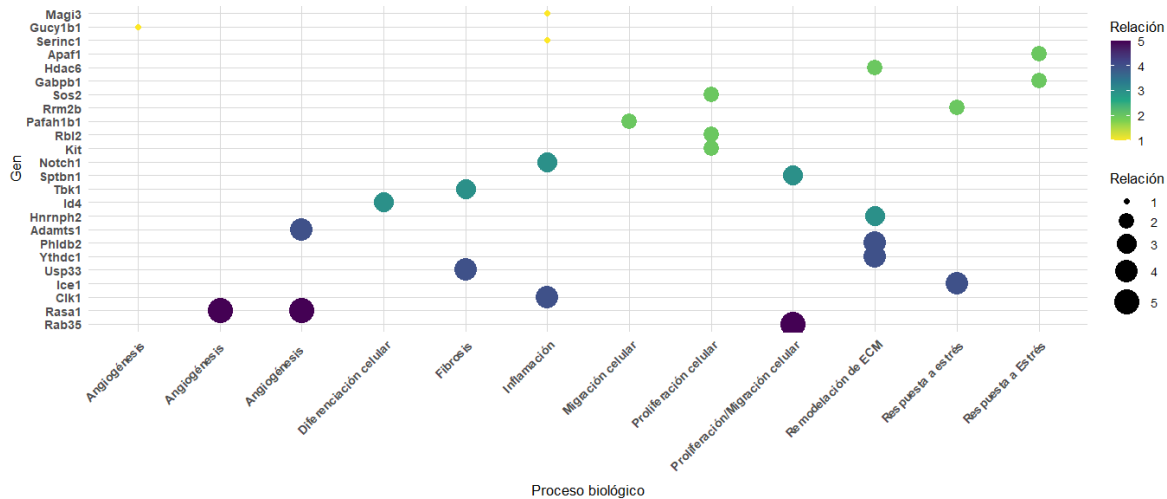


Figura 23. Enrichamiento funcional de los genes implicados en procesos de cicatrización de heridas.

Genes asociados a procesos biológicos clave en la cicatrización de heridas; el color y tamaño indica la intensidad de la relación funcional.

Validación de la interacción entre genes reguladores y genes diana.

Con el fin de integrar la relación funcional entre los miRNAs candidatos, sus genes diana y los genes reguladores identificados en la red de GeneMANIA con función relacionada a procesos de cicatrización de heridas (Figura 23), se realizó un análisis combinado que incorporó: (I) la fuerza de la inhibición miRNA–mRNA a través del Context++ score de TargetScan y (II) la evidencia de interacción proteína–proteína (gen diana – gen regulador) predicha en STRING.

En la Figura 24, se representan en la parte inferior horizontal los genes diana de los tres miRNAs candidatos (miR-21a-3p, miR-144-5p y miR-223-5p), junto con su valor de Context++ score (ubicado de manera vertical), donde valores más negativos reflejan una mayor probabilidad de represión eficiente. Los colores permiten identificar a qué miRNA corresponde cada gen diana. Asimismo, se destacan genes

reguladores (ej. RASA1, Rab35, HDAC6) que presentan interacciones experimentales con los genes diana. Por ejemplo, el gen regulador RASA1, uno de los genes reguladores priorizados en el enriquecimiento, interactúa directamente con Arhgap35, gen diana del miR-21a-3p, que además presenta uno de los valores más negativos de Context++ score (≈ -0.6).

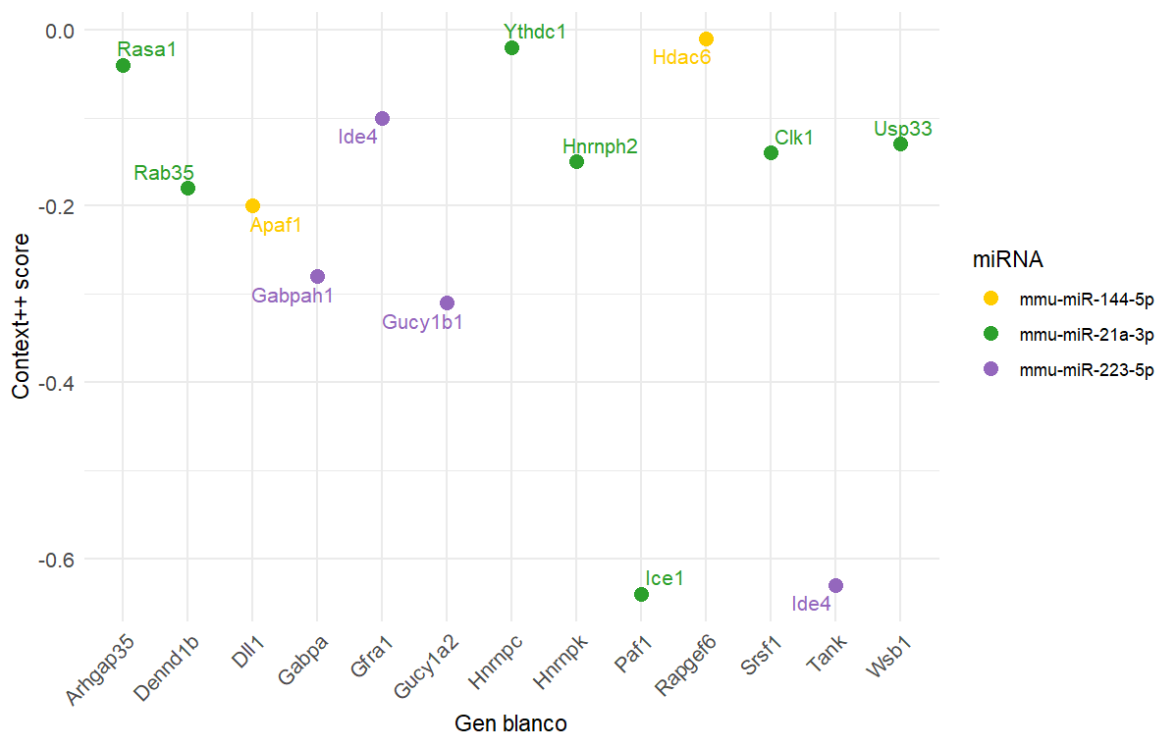


Figura 24. Integración de la regulación miRNA–mRNA con interacciones proteína–proteína.

Conservación traslacional: Identificación de dianas regulatorias conservadas entre ratón y humano.

Se realizó un análisis comparativo entre ratón (*Mus musculus*) y humano (*Homo sapiens*) con bases de datos como TargetScan y miRDB, para identificar genes diana ortólogos.

El análisis confirmó (Figura 25) que los miRNAs humanos hsa-miR-21-3p y hsa-miR-223-5p regulan un conjunto de genes diana con un Context++ Score negativo, lo que indica una represión post-transcripcional eficiente. Entre los genes regulados se identificaron GABPA, GUCY1A2, ARHGAP35 y SRSF1, los cuales presentan

represión conservada tanto en humano como en ratón mmu-miR-21a-3p y mmu-miR-223-5p.

La comparación directa evidenció que estas interacciones son ortológicamente conservadas en ambas especies, manteniendo la regulación por los mismos miRNAs (Figura 25). Este hallazgo refuerza la hipótesis de que los mecanismos regulatorios observados en el modelo murino podrían ser extrapolables a humanos, lo que consolida el potencial de miR-21a-3p y miR-223-5p como biomarcadores o dianas terapéuticas con relevancia clínica.

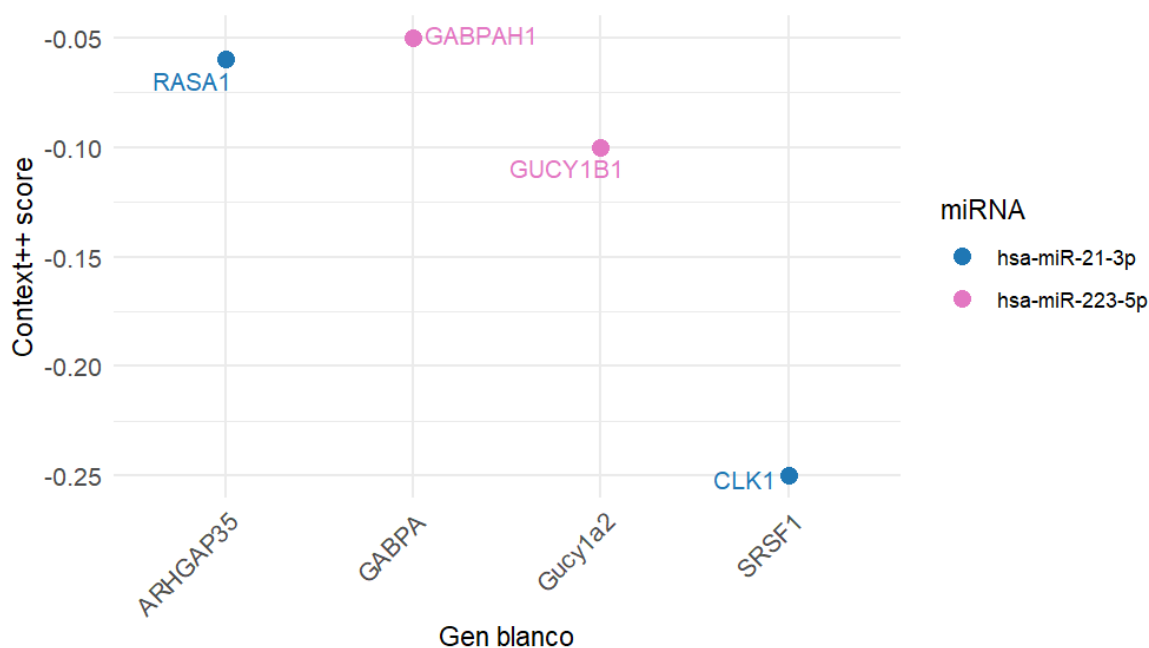


Figura 25. Regulación conservada de genes diana por hsa-miR-21-3p y hsa-miR-223-5p en humano. El eje Y muestra el Context++ Score (más negativo = mayor represión).

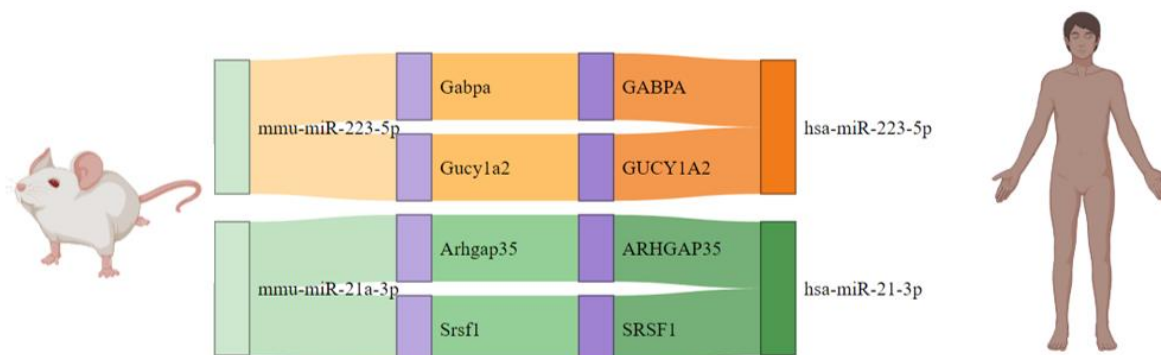


Figura 26. Conservación ortóloga de interacciones miRNA-gen entre ratón y humano. Se muestran los genes GABPA, GUCY1A2, ARHGAP35 y SRSF1 como dianas comunes

El análisis de interacciones génicas mostró que ARHGAP35 (p190-RhoGAP) presenta una posible asociación funcional con RASA1 (p120-RasGAP), mediada por los dominios SH2/SH3 de RASA1 y motivos ricos en prolina presentes en ARHGAP35. Esta relación sugiere una coordinación entre las rutas RAS/PI3K-AKT y RHOA/ROCK, integrando señales relacionadas con la proliferación y la migración celular.

A partir de esta relación funcional, se construyó un esquema integrador con el fin de representar gráficamente una propuesta de interacción entre miR-21a-3p y su gen diana ARHGAP35, así como las implicaciones de su represión sobre la vía de señalización RhoA-ROCK regulada por ARHGAP35 (Figura 26). En el modelo, la unión de miR-21a-3p al ARNm de ARHGAP35 se asocia con la inhibición de su expresión, lo que favorecería la activación de RhoA y, en consecuencia, la de sus efectores ROCK1/2. La activación de ROCK1/2 podría tener efectos importantes en la migración, contracción y remodelación del citoesqueleto, a través de distintos efectores como se muestra en el esquema.

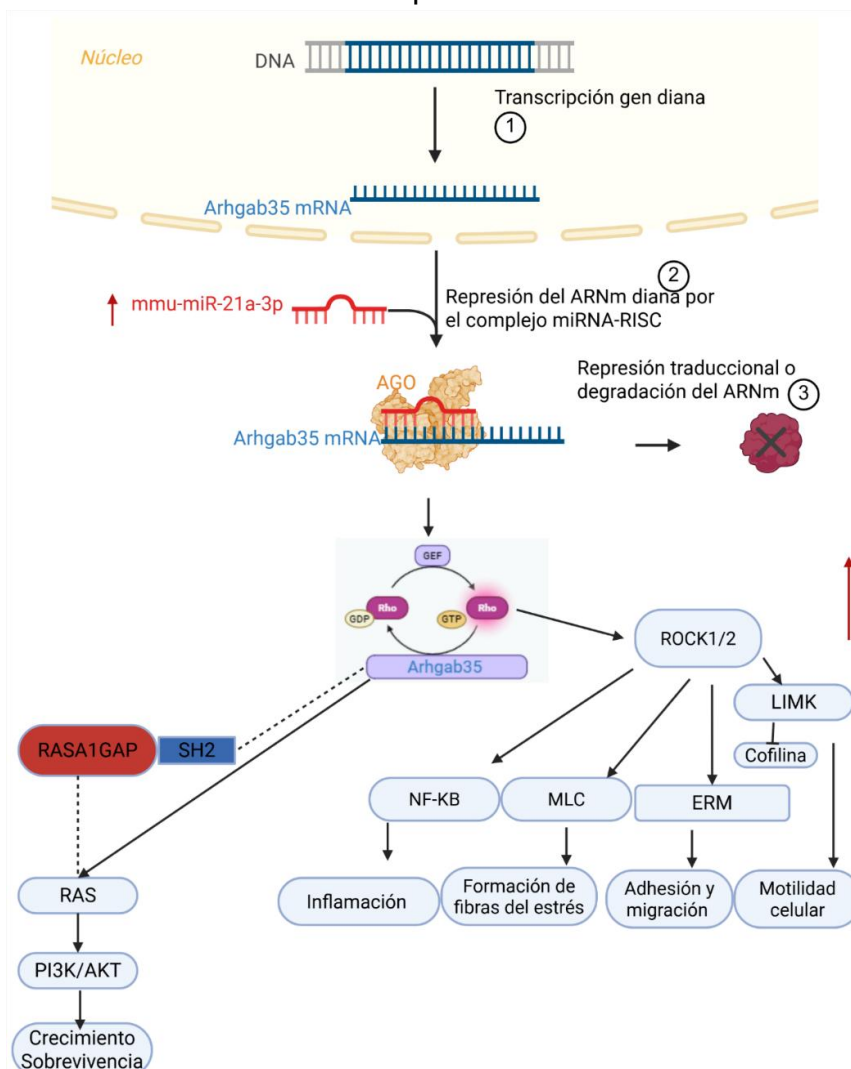


Figura 27. Esquema de la interacción miR-21a-3p–ARHGAP35 y su conexión con la vía RhoA-ROCK. El modelo resume la represión de ARHGAP35 por miR-21a-3p y su relación con la activación de RhoA y ROCK1/2, vinculados a procesos de remodelación del citoesqueleto y migración celular.

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las quemaduras profundas de segundo grado representan una lesión clínicamente relevante impactando significativamente la mortalidad y la morbilidad del paciente. Las respuestas de estrés sistémicas y locales, como la hipovolemia, el hipermetabolismo y la susceptibilidad a infecciones, contribuyen a la disfunción orgánica y aumentan el riesgo de muerte. Incluso cuando se logra la supervivencia, es muy frecuente la formación de cicatrices hipertróficas que afectan la morbilidad y estética del paciente (Milner, 2023). Se ha descrito que la reparación de la piel depende en gran medida de la integridad de la dermis papilar y reticular, ya que a este nivel están presentes la mayoría de las células y apéndices necesarios para la reepitelización (Rippa et al., 2019). Actualmente los tratamientos terapéuticos más utilizados son la escisión quirúrgica y el injerto de piel, sin embargo, su eficacia puede llegar a ser limitada (Jeschke et al., 2020). Por lo anterior, es imperativo seguir comprendiendo los mecanismos celulares y moleculares del proceso de cicatrización de heridas por quemaduras profundas, para brindar más estrategias terapéuticas.

Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que el proceso de cicatrización en quemaduras esta orquestado por moléculas que envían señales químicas y mecánicas que guían el comportamiento de las células para que realicen la reparación (Peña & Martin, 2024). Entre estas, los miRNAs han cobrado relevancia por ser reguladores de la expresión génica. Diversos estudios han demostrado que su papel es crucial en la cicatrización de heridas cutáneas, y su desregulación se ha asociado con resultados deficientes en la reparación (Banerjee & Sen, 2015). Sin embargo, en el contexto de las quemaduras profundas, la mayoría de las investigaciones se centran en biopsias resecables obtenidas en etapas tardías, lo que omite la exploración del panorama post-lesión temprana.

En este estudio, se realizó secuenciación de sRNA-seq, específicamente de los miRNAs presentes en muestras de tejido obtenidas de un modelo murino de quemadura profunda de segundo grado, con el objetivo de caracterizar los perfiles

globales de expresión durante la fase aguda de la lesión. Los resultados obtenidos permitieron integrar los datos de expresión de miRNAs con el enriquecimiento de vías y modelado de redes, como una aproximación para explicar su contribución en la regulación del proceso de cicatrización.

La correcta inducción de la quemadura en el modelo murino se verificó mediante análisis histológico con tinción de hematoxilina y eosina (H&E). En los cortes obtenidos se observó una marcada desorganización tisular tanto en la epidermis como en la dermis papilar y reticular. Además, fue posible delimitar regiones concéntricas correspondientes a las tres zonas descritas clásicamente por Jackson: necrosis, estasis e hiperemia, las cuales presentaron características distintivas como regiones necróticas, desnaturalización de proteínas colágenas, degeneración de anexos cutáneos, daño en las invaginaciones epiteliales y engrosamiento dérmico.

Estas observaciones son consistentes con lo reportado en otros modelos experimentales. Por ejemplo, Medina et al.,(2018) desarrollaron un modelo de quemadura profunda de segundo grado en ratones C57BL/6 mediante escaldadura con agua a 54 °C durante 20 s, en el cual detectaron una extensa desnaturalización del colágeno y apoptosis celular, evidenciada a través de tinciones con H&E, Masson y TUNEL. De forma similar, Zhang et al., (2014) indujeron quemaduras de la misma clasificación en ratones BALB/c mediante exposición a vapor a 98 °C durante 4 s, reportando necrosis parcial, desorganización estructural de la dermis y epidermis, así como desnaturalización de la colágena.

La correcta confirmación histológica de la lesión generada en este trabajo otorgó validez al modelo experimental, garantizando la fiabilidad de los análisis moleculares posteriores.

Para la secuenciación de miRNAs, se extrajeron muestras que incluyen el tejido correspondiente a las zonas de necrosis, estasis e hiperemia, debido a que cada una presenta un microambiente biológico distinto que permite capturar un panorama más amplio de los miRNAs involucrados en la respuesta temprana al daño térmico.

Previo a la secuenciación, la calidad del material genético se verificó en dos etapas esenciales: la extracción de ARN y la preparación de las bibliotecas de secuenciación. La utilización del kit miRVana™ permitió un enriquecimiento eficiente de la fracción de miRNAs, alcanzando valores entre 30 % y 52 % del ARN total. Este rendimiento concuerda con un estudio de Brown et al., (2018), donde evaluaron sistémicamente cinco métodos de extracción en múltiples tejidos murinos, identificando que miRVana produjo los mayores porcentajes de miRNAs en relación al RNA total, alcanzando valores entre 17.55% y 27.39% en hígado y pulmón, superando a otros kits comerciales, como miRNeasy (QIAGEN), que habitualmente logran rendimientos inferiores al 20%. Si bien Brown et al., (2018) no incluyeron tejido cutáneo en su análisis, los principios técnicos que subyacen a la superioridad de miRVana son aplicables a muestras de piel.

Considerando que el tejido cutáneo, especialmente en áreas con quemaduras, presenta desafíos técnicos, por ejemplo, en zonas de estasis, donde aún persisten células viables bajo condiciones de estrés por la inflamación activa, la liberación activa de RNAsas endógenas, puede incrementar la susceptibilidad del RNA a la degradación. Además, la matriz extracelular colagénica y parcialmente desnaturalizada dificulta la disgregación mecánica del tejido, por otro lado, retirar de manera óptima el tejido adiposo de la hipodermis puede demorar los tiempos vitales para tener la muestra de tejido en óptimas condiciones y puede interferir en una fase de purificación correcta (Medina et al., 2018).

Por lo anterior, la selección de miRVana representó una elección metodológica correcta para garantizar la integridad y representatividad de nuestro perfil de miRNAs en el contexto específico de la cicatrización de quemaduras.

En cuanto a la preparación de las bibliotecas de secuenciación, el tamaño promedio obtenido fue de aproximadamente 150 pb, valor que coincide estrechamente con el rango esperado para bibliotecas de ARN pequeño de alta calidad. De acuerdo con Vigneault et al.(2012), las bibliotecas de miRNAs correctamente construidas presentan un pico característico entre 145 y 160 pb, lo que refleja una ligación

exitosa de los adaptadores a miRNAs maduros y una mínima contaminación por ARN degradado o transcritos de mayor longitud.

Estas métricas de calidad fueron consistentes en todas las réplicas biológicas, lo que permitió proceder con la secuenciación de miRNAs. Posteriormente, se llevó a cabo el procesamiento de los archivos obtenidos de sRNA-seq para la construcción de una matriz de conteos y la realización de los análisis posteriores.

En principio realizamos análisis de expresión diferencial, este análisis reveló la presencia de nueve miRNAs significativamente sobre expresados a las 24 horas posteriores a la quemadura en comparación con el grupo control. Dichos miRNAs son mmu-miR-21a-3p, mmu-miR-223-3p/5p, mmu-miR-144-5p, mmu-miR-142a-5p/3p, mmu-miR-132-3p, mmu-miR-34c-5p y mmu-miR-340-5p. Algunos de estos miRNAs han sido previamente asociados con procesos involucrados con la cicatrización cutánea. En el caso del miRNA mmu-miR-21a-3p, correspondiente al brazo 3p del precursor miR-21, Xie et al. (2022), mostraron en un modelo murino de herida diabética que la sobreexpresión de miR-21-3p promovió la proliferación y supervivencia de fibroblastos, favoreciendo la deposición de colágeno III y la angiogénesis mediante la inhibición de SPRY1. miR-223, por su parte, modula la respuesta inflamatoria mediante el control de la activación de macrófagos y la producción de citocinas proinflamatorias (Dorhoi et al., 2013).

Respecto a la temporalidad, la comparación de nuestros resultados con reportes previos nos permite tener una idea de la dinámica de expresión de los miRNAs durante el proceso de reparación de una quemadura cutánea.

Por ejemplo, Foessl et al. (2021) utilizaron un modelo *ex vivo* de quemadura profunda de segundo grado, proveniente de piel extraída entre los 0 y 3 días, a partir de cirugías plásticas. Durante las primeras horas posteriores a una quemadura (1, 4 y 24 h) analizaron la expresión de miRNAs mediante qPCR utilizando kits miRCURY LNA (Qiagen) y observaron que la respuesta temprana estaba dominada por la represión de ciertos miRNAs, como miR-497-5p y miR-221-3p, lo que fue interpretado como un mecanismo que facilita la activación transcripcional de genes involucrados en inflamación y reparación durante las fases iniciales del daño. Esta

subexpresión de miRNAs es opuesta al cambio de expresión alta que nosotros encontramos a las 24 horas, lo que podría deberse a los contextos experimentales utilizados, ya que los modelos *ex vivo* carecen del microambiente fisiológico completo, incluyendo señales inmunológicas y sistémicas que podrían influir en la activación transcripcional. Además, estos resultados también pueden sugerir que los miRNAs identificados en este estudio pueden desempeñar un papel más relevante en etapas más intermedias o sostenidas de la respuesta inflamatoria.

En otro estudio con microarreglos donde utilizaron un modelo de quemadura profunda de segundo grado en ratones de la cepa C57BL/6. Lü et al. (2013) observaron que miR-21 y miR-340-5p se mantienen sobreexpresados a los 7 días post-quemadura con valores aproximados de $\log_2FC$ entre 1.6 y 1.9. Mientras que en nuestro estudio miR-21a-3p y miR-340-5p muestran valores de $\log_2FC$ de 2.68 y 2.5. Hay que señalar que en el estudio de Lü (2013), no diferenciaron entre los brazos 3p y 5p para miR-21, pues su análisis correspondía al miR-21 total.

Otros miRNAs reportados en nuestro estudio como miR-142-5p, miR-142-3p y miR-34c muestran una expresión disminuida y sin significancia. Estas diferencias reflejan la naturaleza dinámica y dependiente del tiempo de la expresión de miRNAs durante la reparación cutánea: su expresión no es estática, sino que varía conforme avanzan las etapas de inflamación, proliferación y remodelación.

Como una limitación del presente estudio, sería necesario realizar un análisis temporal más amplio que incluya distintas etapas post-quemadura (3, 7 y 14 días), con el fin de evaluar la dinámica completa de expresión de este grupo de nueve miRNAs y determinar en qué fases específicas del proceso de cicatrización alcanzan su máxima regulación.

En nuestro análisis se observó la ausencia de miRNAs con expresión disminuida (downregulated). Desde el punto de vista estadístico, el uso de criterios estrictos como ($FDR < 0.05$) y $|\log_2FC| \geq 1.5$ puede incrementar la especificidad del análisis, pero también puede ser más estricto, lo que podría impedir la detección de miRNAs con represión moderada (Robinson et al., 2010). Así mismo, deben considerarse los sesgos inherentes a la preparación de bibliotecas de secuenciación, como la

eficiencia de ligación de adaptadores o la subrepresentación de miRNAs con estructuras secundarias complejas, también pueden limitar la detección de especies reprimidas (Baran-Gale et al., 2015). Finalmente, es importante considerar que durante las primeras 24 horas posteriores a la lesión, el tejido prioriza la activación de vías proinflamatorias y de respuesta al daño. En este contexto, la sobreexpresión de algunos miRNAs observada en nuestro modelo podría reflejar un mecanismo de regulación negativa, dirigido a atenuar la transcripción de genes proinflamatorios o de señalización del estrés celular, contribuyendo así a limitar la extensión del daño tisular y favorecer la transición hacia etapas posteriores de reparación (Eming et al., 2014).

Posteriormente, con los nueve miRNAs que mostraron un aumento significativo en su expresión, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional, cuyos resultados permitieron identificar vías y procesos relacionados con etapas clave de la cicatrización.

Entre las categorías más representadas se encontraron aquellas vinculadas con la respuesta inflamatoria temprana, destacando vías como NF- κ B, la señalización del receptor de células T y la diferenciación Th1/Th2, lo cual es coherente con la naturaleza aguda del proceso, dado que las muestras fueron recolectadas a las 24 horas posteriores a la lesión. De forma paralela, se detectó el enriquecimiento de vías relacionadas con la proliferación y la supervivencia celular, tales como PI3K-AKT, mTOR, Ras y FoxO, así como rutas involucradas en la migración celular y la remodelación tisular, incluyendo la regulación del citoesqueleto de actina, la formación de adherencias focales y las interacciones matriz extracelular-receptor.

Considerando que los nueve miRNAs participan en estas 25 vías asociadas a la cicatrización, se generaron redes de interacción miRNA-gen diana con el fin de visualizar la arquitectura regulatoria y determinar cuáles miRNAs ejercen un mayor control sobre sus genes blanco. Los análisis de red y superposición génica revelaron que algunos miRNAs, particularmente mmu-miR-21a-3p, mmu-miR-223-5p y mmu-miR-144-5p, se encontraban conectados con un número significativamente mayor

de genes diana, lo que sugiere que desempeñan un papel regulador central en estas vías.

Entre ellos, miR-21a-3p destacó como el posible desencadenante temprano de la dinámica reparativa, ya que presentó una expresión diferencial elevada, una amplia cobertura de vías en el análisis de enriquecimiento incluyendo aquellas asociadas a inflamación, organización del citoesqueleto y remodelación de la matriz extracelular y una alta centralidad en las redes regulatorias. Este comportamiento es consistente con la evidencia previa que señala que miR-21a-3p promueve la síntesis y depósito de colágeno mediante la regulación negativa de SPRY1, PDCD4 y RECK, contribuyendo así a la resolución de la inflamación y al restablecimiento estructural del tejido cutáneo (Xie et al., 2022).

Más allá del panorama general proporcionado por las vías moleculares, la identificación de genes diana de nuestros miRNAs, permitió crear redes de interacción proteína-proteína. Este enfoque es relevante, ya que los genes no suelen trabajar de manera aislada, sino a través de redes coordinadas que modulan procesos celulares complejos.

Entre los genes diana identificados para miR-21a-3p, destacó Arhgap35 (p190A-RhoGAP), una proteína activadora de GTPasas que funciona como regulador negativo de RhoA. La represión postranscripcional de Arhgap35 inducida por la sobreexpresión de miR-21a-3p podría, liberar la actividad de RhoA, promoviendo la activación de la vía RhoA–ROCK (quinasa asociada a Rho). Este eje de señalización es esencial para la formación de fibras de estrés de actina, el ensamblaje de adherencias focales y la adquisición de fenotipos contráctiles y migratorios, procesos fundamentales en la migración de queratinocitos y el cierre epitelial (Lawson & Ridley, 2017).

Se ha demostrado que la señalización RhoA–ROCK coordina múltiples etapas de la cicatrización, desde la polarización celular y la dinámica del borde de avance epitelial (lengua de repitelización) hasta la remodelación de la matriz extracelular (Samuel et al., 2011). Además, alteraciones en esta ruta pueden comprometer significativamente la reepitelización, mientras que su activación favorece un

ambiente propicio para la migración celular dirigida y la reorganización tisular (Amano et al., 2010). En este contexto, la regulación negativa de Arhgap35 mediada por miR-21a-3p podría representar un mecanismo clave que modula la tensión citoesquelética y facilita la respuesta temprana al daño epidérmico.

En conjunto, estos hallazgos permiten proponer un modelo mecanístico coherente con el panorama molecular observado: tras la quemadura, la sobreexpresión de miR-21a-3p podría suprimir Arhgap35, potenciando así la señalización RhoA–ROCK y promoviendo la migración de queratinocitos necesaria para la reparación temprana del tejido. Este marco conceptual sienta las bases para futuras investigaciones funcionales dirigidas a validar esta hipótesis, como la evaluación directa de la unión de miR-21a-3p al 3'UTR de Arhgap35, la cuantificación de niveles activos de RhoA-GTP o el análisis de la fosforilación de efectores río abajo como MYL y ROCK. De confirmarse, esta ruta no solo aportaría una explicación al papel de los miRNAs en la reparación cutánea, sino que también abriría oportunidades para su explotación como blanco terapéutico en el tratamiento de heridas por quemaduras profundas.

Colectivamente, los resultados de este estudio delinean un mapa regulatorio de la respuesta molecular temprana en las quemaduras profundas y sugieren el potencial traslacional de esta firma de miRNAs. La posición central de miR-21a-3p en la red regulatoria, junto con su posible participación en la vía RhoA–ROCK a través de Arhgap35, lo posiciona como un candidato de interés para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de estrategias que modulen la cicatrización. En este sentido, la exploración de enfoques basados en la inhibición o el mimetismo de miRNAs podría contribuir, en un futuro, a controlar procesos fibróticos o a favorecer la reparación en heridas de difícil resolución. Además, la expresión temprana y consistente de este conjunto de miRNAs a las 24 horas post-quemadura resalta su valor potencial como biomarcadores pronósticos. La evaluación de sus niveles en muestras de tejido o fluidos biológicos podría, eventualmente, ayudar a predecir la evolución hacia una cicatrización funcional o patológica, permitiendo intervenciones más tempranas y dirigidas.

11. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron comparar el perfil global de expresión de miRNAs entre piel sana y piel con quemadura profunda de segundo grado. El análisis de expresión diferencial permitió identificar nueve miRNAs con aumento en su expresión a las 24 horas post-quemadura, lo que indica una participan activa en la respuesta temprana frente a quemaduras profundas de segundo grado.

El análisis funcional integró estos miRNAs con rutas relacionadas con inflamación, supervivencia celular, reorganización del citoesqueleto y migración, procesos esenciales durante las etapas iniciales de la cicatrización. De manera complementaria, los análisis in silico permitieron proponer un modelo regulatorio preliminar en el que mmu-miR-21a-3p podría reprimir al gen Arhgap35, influyendo en la dinámica de la vía de señalización RhoA/ROCK1/2, un eje determinante en la remodelación del citoesqueleto, la adhesión y la migración de celular.

En conjunto, este trabajo ofrece bases moleculares para orientar estudios experimentales futuros dirigidos a validar los mecanismos propuestos y explorar su posible relevancia diagnóstica o terapéutica particularmente mmu-miR-21a-3p, como posible mediador de rutas críticas asociadas a la reparación cutánea.

12. PERSPECTIVAS

Tras proponer a para miR-21a-3p como importante regulador durante las etapas tempranas de la quemadura profunda de segundo grado, resulta fundamental analizar su expresión a distintos tiempos post-lesión, es decir, a los 3, 7 y 14 días, con el fin de determinar si su sobreexpresión se comporta de la misma manera a las 24 horas o varía a lo largo del proceso de cicatrización en el modelo murino de quemadura profunda de segundo grado.

Además, es imperativo realizar experimentos más dirigidos como algunos ensayos de luciferasa y western blot de ARHGAP35 para comprobar la interacción directa con mmu-miR-21a-3p y validar su función molecular. Adicionalmente, la evaluación de RhoA y ROCK1/2 mediante western blot, junto con un ensayo de contracción en

gel de colágeno, podría explorar el impacto funcional de esta regulación sobre la migración y contracción celular. Finalmente, el estudio de proteínas actuantes en etapas posteriores de la vía de ROCK1/2, asociadas con la adhesión y remodelación del citoesqueleto, contribuiría a esclarecer el papel de miR-21a-3p como un posible modulador clave de la cicatrización cutánea.

13. REFERENCIAS

Amano, M., Nakayama, M., & Kaibuchi, K. (2010). Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. <https://doi.org/10.1002/cm.20472>

Banerjee, J., & Sen, C. K. (2013). MicroRNAs in Skin and Wound Healing. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 936, 343-356. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-083-0_26

Banerjee, J., & Sen, C. K. (2015). microRNA and Wound Healing. *Advances in experimental medicine and biology*, 888, 291-305. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2_15

Baran-Gale, J., Kurtz, C. L., Erdos, M. R., Sison, C., Young, A., Fannin, E. E., Chines, P. S., & Sethupathy, P. (2015). Addressing Bias in Small RNA Library Preparation for Sequencing: A New Protocol Recovers MicroRNAs that Evade Capture by Current Methods. *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00352>

Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>

Benesova, S., Kubista, M., & Valihrach, L. (2021). Small RNA-Sequencing: Approaches and Considerations for miRNA Analysis. *Diagnostics*, 11(6), 964. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11060964>

Brown, R. A. M., Epis, M. R., Horsham, J. L., Kabir, T. D., Richardson, K. L., & Leedman, P. J. (2018). Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: Not all kits are created equal. *BMC Biotechnology*, 18(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0421-6>

Chan, Y. C., Khanna, S., Roy, S., & Sen, C. K. (2011). miR-200b Targets Ets-1 and Is Down-regulated by Hypoxia to Induce Angiogenic Response of Endothelial Cells.

The Journal of Biological Chemistry, 286(3), 2047-2056.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158790>

Chen, Y., McCarthy, D., Baldoni, P., Robinson, M., & Smyth, G. (s. f.). edgeR: differential analysis of sequence read count data User's Guide.

Choudhary, V., Choudhary, M., & Bollag, W. B. (2024). Exploring Skin Wound Healing Models and the Impact of Natural Lipids on the Healing Process. International Journal of Molecular Sciences, 25(7), 3790.
<https://doi.org/10.3390/ijms25073790>

Danzi, M. C., Motti, D., Avison, D. L., Bixby, J. L., & Lemmon, V. P. (2016). Treatment with analgesics after mouse sciatic nerve injury does not alter expression of wound healing-associated genes. Neural Regeneration Research, 11(1), 144-149.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.169637>

Djuranovic, S., Nahvi, A., & Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. Science (New York, N.Y.), 336(6078), 237-240. <https://doi.org/10.1126/science.1215691>

Dorhoi, A., Iannaccone, M., Farinacci, M., Faé, K. C., Schreiber, J., Moura-Alves, P., Nouailles, G., Mollenkopf, H.-J., Oberbeck-Müller, D., Jörg, S., Heinemann, E., Hahnke, K., Löwe, D., Nonno, F. D., Goletti, D., Capparelli, R., & Kaufmann, S. H. E. (2013). MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. The Journal of Clinical Investigation, 123(11), 4836-4848.
<https://doi.org/10.1172/JCI67604>

Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. Science Translational Medicine.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>

Foessler, I., Haudum, C. W., Vidakovic, I., Prassl, R., Franz, J., Mautner, S. I., Kainz, S., Hofmann, E., Obermayer-Pietsch, B., Birngruber, T., & Kotzbeck, P. (2021). miRNAs as Regulators of the Early Local Response to Burn Injuries. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9209. <https://doi.org/10.3390/ijms22179209>

Franz, M., Rodriguez, H., Lopes, C., Zuberi, K., Montojo, J., Bader, G. D., & Morris, Q. (2018). GeneMANIA update 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W60-W64. <https://doi.org/10.1093/nar/gky311>

Fukaya, T., Iwakawa, H., & Tomari, Y. (2014). MicroRNAs Block Assembly of eIF4F Translation Initiation Complex in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 56(1), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.004>

Garnica Escamilla, M. A., Lemus Sandoval, J., Ramírez Martínez, B. N., Tamez Coyotzin, E. A., Marín Landa, O. M., Garnica Escamilla, M. A., Lemus Sandoval, J., Ramírez Martínez, B. N., Tamez Coyotzin, E. A., & Marín Landa, O. M. (2021). Hipermetabolismo en el paciente quemado. *Medicina crítica (Colegio Mexicano de Medicina Crítica)*, 35(4), 194-199.

Hettiaratchy, S., & Dziewulski, P. (2004a). Pathophysiology and types of burns. *BMJ : British Medical Journal*, 328(7453), 1427-1429. <https://doi.org/10.1136/bmj.328.7453.1427>

Hettiaratchy, S., & Dziewulski, P. (2004b). Pathophysiology and types of burns. *BMJ : British Medical Journal*, 328(7453), 1427-1429. <https://doi.org/10.1136/bmj.328.7453.1427>

Jeschke, M. G., van Baar, M. E., Choudhry, M. A., Chung, K. K., Gibran, N. S., & Logsetty, S. (2020). Burn injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 1-25. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0145-5>

Jiao, Q., Zhi, L., You, B., Wang, G., Wu, N., & Jia, Y. (2024). Skin homeostasis: Mechanism and influencing factors. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 23(5), 1518-1526. <https://doi.org/10.1111/jocd.16155>

Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 16(7), 421-433. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>

Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M. L., Matsumiya, L., Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wong, D., van den Maagdenberg, A. M. J. M., Ferrari, M. D., Craig, K. D., & Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447-449. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>

Lawson, C. D., & Ridley, A. J. (2017). Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *Journal of Cell Biology*, 217(2), 447-457. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612069>

Li, D., Li, X. I., Wang, A., Meisgen, F., Pivarcsi, A., Sonkoly, E., Ståhle, M., & Landén, N. X. (2015). MicroRNA-31 Promotes Skin Wound Healing by Enhancing Keratinocyte Proliferation and Migration. *Journal of Investigative Dermatology*, 135(6), 1676-1685. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.48>

Liang, P., Lv, C., Jiang, B., Long, X., Zhang, P., Zhang, M., Xie, T., & Huang, X. (2012). MicroRNA profiling in denatured dermis of deep burn patients. *Burns*, 38(4), 534-540. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.10.014>

Lü, M.-H., Hu, C.-J., Chen, L., Peng, X., Chen, J., Hu, J.-Y., Teng, M., & Liang, G.-P. (2013). miR-27b Represses Migration of Mouse MSCs to Burned Margins and

Prolongs Wound Repair through Silencing SDF-1a. PLoS ONE, 8(7), e68972.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068972>

Mandujano-Tinoco, E. A., González-García, F., Salgado, R. M., Abarca-Buis, R. F., Sanchez-Lopez, J. M., Carranza-Castro, P. H., Padilla, L., & Krötzsch, E. (2022). miR-31, miR-155, and miR-221 Expression Profiles and Their Association With Graft Skin Tolerance in a Syngeneic vs Allogeneic Murine Skin Transplantation Model. Journal of Burn Care & Research, 43(5), 1160-1169.
<https://doi.org/10.1093/jbcr/irac003>

Markiewicz-Gospodarek, A., Koziół, M., Tobiasz, M., Baj, J., Radzikowska-Büchner, E., & Przekora, A. (2022). Burn Wound Healing: Clinical Complications, Medical Care, Treatment, and Dressing Types: The Current State of Knowledge for Clinical Practice. International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(3), 1338. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031338>

Medina, J. L., Fourcaudot, A. B., Sebastian, E. A., Shankar, R., Brown, A. W., & Leung, K. P. (2018). Standardization of deep partial-thickness scald burns in C57BL/6 mice. International Journal of Burns and Trauma, 8(2), 26-33.

Milner, S. M. (2023). Skin Anatomy. Eplasty, 23, QA8.

Mony, M. P., Harmon, K. A., Hess, R., Dorafshar, A. H., & Shafikhani, S. H. (2023). An Updated Review of Hypertrophic Scarring. Cells, 12(5), 678.
<https://doi.org/10.3390/cells12050678>

Mulholland, E. J., Dunne, N., & McCarthy, H. O. (2017a). MicroRNA as Therapeutic Targets for Chronic Wound Healing. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 8, 46-55.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.003>

Mulholland, E. J., Dunne, N., & McCarthy, H. O. (2017b). MicroRNA as Therapeutic Targets for Chronic Wound Healing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 8, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.003>

Nalbant, E., & Akkaya-Ulum, Y. Z. (2024). Exploring regulatory mechanisms on miRNAs and their implications in inflammation-related diseases. *Clinical and Experimental Medicine*, 24(1), 142. <https://doi.org/10.1007/s10238-024-01334-y>

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

Patil, A. H., & Halushka, M. K. (2021). miRge3.0: A comprehensive microRNA and tRF sequencing analysis pipeline. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 3(3), lqab068. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqab068>

Peña, O. A., & Martin, P. (2024). Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00715-1>

Ping Li, Quan-Yong He, Cheng-Qun Luo. (2014). Overexpression of miR-200b inhibits the cell proliferation and promotes apoptosis of human hypertrophic scar fibroblasts in vitro—Li—2014—The Journal of Dermatology—Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1346-8138.12600>

Rippa, A. L., Kalabusheva, E. P., & Vorotelyak, E. A. (2019). Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells*, 8(6), 607. <https://doi.org/10.3390/cells8060607>

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

Ross, K. (2021). MiR equal than others: MicroRNA enhancement for cutaneous wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, 236(12), 8050-8059. <https://doi.org/10.1002/jcp.30485>

Samuel, M. S., Lopez, J. I., McGhee, E. J., Croft, D. R., Strachan, D., Timpson, P., Munro, J., Schröder, E., Zhou, J., Brunton, V. G., Barker, N., Clevers, H., Sansom, O. J., Anderson, K. I., Weaver, V. M., & Olson, M. F. (2011). Actomyosin-Mediated Cellular Tension Drives Increased Tissue Stiffness and β -Catenin Activation to Induce Epidermal Hyperplasia and Tumor Growth. *Cancer Cell*, 19(6), 776-791. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.008>

SARIAN, M. N., ZULKEFLI, N., CHE ZAIN, M. S., MANIAM, S., & FAKURAZI, S. (2023). A review with updated perspectives on in vitro and in vivo wound healing models. *Turkish Journal of Biology*, 47(4), 236-246. <https://doi.org/10.55730/1300-0152.2659>

Siu, M. C., Voisey, J., Zang, T., & Cuttle, L. (2023a). MicroRNAs involved in human skin burns, wound healing and scarring. *Wound Repair and Regeneration*, 31(4), 439-453. <https://doi.org/10.1111/wrr.13100>

Siu, M. C., Voisey, J., Zang, T., & Cuttle, L. (2023b). MicroRNAs involved in human skin burns, wound healing and scarring. *Wound Repair and Regeneration*, 31(4), 439-453. <https://doi.org/10.1111/wrr.13100>

Tastsoglou, S., Skoufos, G., Miliotis, M., Karagkouni, D., Koutsoukos, I., Karavangeli, A., Kardaras, F. S., & Hatzigeorgiou, A. G. (2023). DIANA-miRPath v4.0: Expanding target-based miRNA functional analysis in cell-type and tissue contexts. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W154-W159. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad431>

Tavakoli, S., Kisiel, M. A., Biedermann, T., & Klar, A. S. (2022). Immunomodulation of Skin Repair: Cell-Based Therapeutic Strategies for Skin Replacement (A

Comprehensive Review). *Biomedicines*, 10(1), Article 1.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10010118>

Vigneault, F., Ter-Ovanesyan, D., Alon, S., Eminaga, S., Christodoulou, D. C., Seidman, J. G., Eisenberg, E., & Church, G. M. (2012). High-throughput multiplex sequencing of miRNA. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.]*, 0 11, Unit-11.1210.
<https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1112s73>

Xie, J., Wu, W., Zheng, L., Lin, X., Tai, Y., Wang, Y., & Wang, L. (2022). Roles of MicroRNA-21 in Skin Wound Healing: A Comprehensive Review. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.828627>

Yakup, A., Zhang, J., Dong, W., Song, F., Dong, J., & Lu, S. (2022). The epidemiological characteristic and trends of burns globally. *BMC Public Health*, 22(1), 1596. <https://doi.org/10.1186/s12889-022-13887-2>

Yousef, H., Alhajj, M., Fakoya, A. O., & Sharma, S. (2024). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *En StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>

Zhang, X., Yang, J., Zhao, J., Zhang, P., & Huang, X. (2015). MicroRNA-23b Inhibits the Proliferation and Migration of Heat-Denatured Fibroblasts by Targeting Smad3. *PLoS ONE*, 10(7), e0131867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131867>

Zhang, Y., Bai, X., Wang, Y., Li, N., Li, X., Han, F., Su, L., & Hu, D. (2014). Role for Heat Shock Protein 90 α in the Proliferation and Migration of HaCaT Cells and in the Deep Second-Degree Burn Wound Healing in Mice. *PLoS ONE*, 9(8), e103723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103723>

Zhou, R., Zhang, Q., Zhang, Y., Fu, S., & Wang, C. (2015a). Aberrant miR-21 and miR-200b expression and its pro-fibrotic potential in hypertrophic scars. *Experimental Cell Research*, 339(2), 360-366. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.018>

Zhou, R., Zhang, Q., Zhang, Y., Fu, S., & Wang, C. (2015b). Aberrant miR-21 and miR-200b expression and its pro-fibrotic potential in hypertrophic scars. *Experimental Cell Research*, 339(2), 360-366. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.018>

14. ANEXOS

Tabla A.1. Valores detallados empleados para la asignación de puntaje a los miRNAs diferencialmente expresados.

miRNA ID	Significancia Estadística (DFR)	Cambio de Expresión (Log2FC)	Evidencia Biológica KEGG/GO miRPath (TargetScan)	Expresión Absoluta Percentil (50) = 123.5542667	Viabilidad Técnica
mmu-miR-142a-5p	0.003145119	2.76674692	26 vías funcionales / 9 miRNAs	42.4475	si
mmu-miR-21a-3p	0.003145119	2.68717313	26 vías funcionales / 9 miRNAs + nodo central de regulación	80.4794333	si
mmu-miR-223-3p	0.011444653	4.71247865	26 vías funcionales / 9 miRNAs	240.165	si
mmu-miR-144-5p	0.013308362	2.75981772	26 vías funcionales / 9 miRNAs + nodo central de regulación	1757.94083	si
mmu-miR-223-5p	0.013308362	4.72682883	26 vías funcionales / 9 miRNAs + nodo central de regulación	1418.94963	si
mmu-miR-142a-3p	0.017050457	2.07820759	26 vías funcionales / 9 miRNAs	2002.2436	si
mmu-miR-132-3p	0.017056542	2.20981736	26 vías funcionales / 9 miRNAs	91.3213667	si
mmu-miR-34c-5p	0.030308822	1.64395369 1.84492779	26 vías funcionales / 9 miRNAs	172.734633	si
mmu-miR-340-5p	0.03385881		26 vías funcionales / 9 miRNAs	2632.7071	si

Se incluyen los parámetros de significancia estadística (FDR), cambio de expresión (Log2FC), evidencia biológica (vías KEGG/GO), expresión absoluta y viabilidad técnica. Estos valores sirvieron como base para la construcción de la tabla de puntuación integral presentada en los Resultados principales

```
miRge3.0 \  
-s  
SAN01.fastq.gz,SAN02.fastq.gz,SANA.fastq  
.gz,QX2.fastq.gz,QX3.fastq.gz,QXC.fastq.gz  
\  
-lib miRge3_Lib/ \  
-on mouse \  
-a illumina \  
-db mirbase \  
-o resultados/miRge_run/ \  
-gff \  
-cpu 8
```

Figura A.1. Parámetros principales para ejecutar a miRge3. -s las muestras de tejido correspondientes a los grupos control (SANA, SAN01 y SAN02) y experimentales que sufrieron la quemadura (QXC, QX2 y QX3). -on mouse (genoma de ratón como referencia), -a illumina (recorte de adaptadores), -db mirbase (anotación de miRNAs mediante miRBase), -gff (generación de archivo de anotación GFF) y -cpu 8 (procesamiento paralelo).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00266

Matrícula: 2233804023

El papel de los microRNAs en el proceso de cicatrización de quemaduras de piel.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:30 horas del día 1 del mes de diciembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GERARDO BLANCAS FLORES
MTRO. JOSE FRANCISCO GONZALEZ GARCIA
DR. AARON VAZQUEZ JIMENEZ
DR. RENE FERNANDO ABARCA BUIS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: JOSE MARIA HIDALGO SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JOSE MARIA HIDALGO SANCHEZ
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. GERARDO BLANCAS FLORES

VOCAL

MTRO. JOSE FRANCISCO GONZALEZ GARCIA

VOCAL

DR. AARON VAZQUEZ JIMENEZ

SECRETARIO

DR. RENE FERNANDO ABARCA BUIS