UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

BÚSQUEDA DE MARCADORES EPIGENÉTICOS DEL HUÉSPED POR INFECCIÓN DE FIEBRE DE CHIKUNGUNYA EN PACIENTES CON ARTRALGIA PERSISTENTE

POR

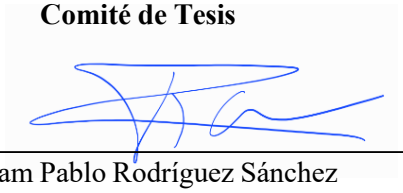
JOSÉ DE JESÚS LUGO TRAMPE

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA Y VETERINARIA

2026

BÚSQUEDA DE MARCADORES EPIGENÉTICOS DEL HUÉSPED POR INFECCIÓN DE FIEBRE DE CHIKUNGUNYA EN PACIENTES CON ARTRALGIA PERSISTENTE

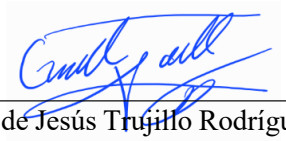
Comité de Tesis



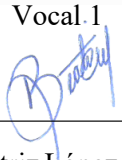
Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez
Presidente



Dra. María de Lourdes Ramírez Ahuja
Secretario



Dr. Gerardo de Jesús Trujillo Rodríguez
Vocal 1



Dra. Beatriz López Monroy
Vocal 2



Dr. Jesús Dávila Barboza
Vocal 3

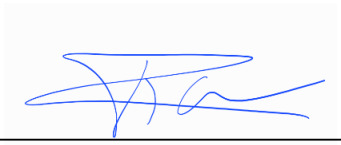


Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de posgrado

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

BÚSQUEDA DE MARCADORES EPIGENÉTICOS DEL HUÉSPED POR INFECCIÓN DE FIEBRE DE CHIKUNGUNYA EN PACIENTES CON ARTRALGIA PERSISTENTE.

Dirección de Tesis



Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez
Director de Tesis



Dra. Geovana Calvo Anguiano
Director Externo

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL
Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento
El trabajo fue financiado por la convocatoria de Ciencia de Frontera 2019, con el No. De trabajo: FORDECYT-PRONACES/514867/2020.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este camino doctoral, he contado con el apoyo invaluable de muchas personas, sin las cuales este logro no habría sido posible.

En primer lugar, agradezco profundamente al Dr. Gustavo Ponce por permitirme integrarme a su grupo de trabajo, cuya guía, generosidad y compromiso académico marcaron profundamente mi formación, dejando una huella imborrable en mi desarrollo académico y personal.

A mis codirectores/as, el Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez, Dra. María de Lourdes Ramírez Ahuja, Dr. Gerardo de Jesús Trujillo Rodríguez, Dra. Beatriz López Monroy, Dr. Jesús Dávila Barboza Salas gracias por su apoyo, sus críticas constructivas y los momentos compartidos.

A la Dra. Laura Martínez de Villarreal, por su impulso, apoyo y confianza para llevar a cabo este proyecto.

Agradezco también a SECIHTI, por la beca otorgada y los recursos para llevar a cabo este proyecto.

Y, sobre todo, a mi familia. Gracias a mis padres, Laura Patricia y Federico, por su amor incondicional, sus sacrificios y por enseñarme el valor del esfuerzo y la educación. A mis hermanos Ángel, Aldo y Eva, por su compañía, apoyo constante y por estar siempre presentes en cada etapa de mi vida, brindándome ánimo y confianza cuando más lo necesitaba. A mis hijos Aldo y Diego, gracias por ser mi sostén en los días difíciles y mi alegría en los días de logro. A todos ustedes, les debo la fuerza y la motivación que me han permitido llegar hasta aquí.

A mi esposa Geovana, por su amor, paciencia y comprensión en cada etapa de este camino. Tu apoyo incondicional y tu confianza en mí han sido fundamentales para que esta etapa llegara a su término.

Este trabajo es resultado de un esfuerzo colectivo. A cada una de las personas que me acompañaron en este trayecto: gracias, de corazón.

No somos solo producto de nuestros genes, sino de cómo nuestras experiencias moldean su expresión

Michael Meaney

DEDICATORIA

Primeramente, a mis padres, por ser mi origen, mi motor y mi refugio.
A mis hijos, por ser mi sostén en los días difíciles, mi motivación diaria.
A Geo, por creer en mí incluso cuando yo dudaba.
Y a quienes sueñan con llegar, que sepan que sí se puede.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE FIGURAS
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS
RESUMEN
1.INTRODUCCIÓN……. 1
2.ANTECEDENTES……. 3
2.1 EPIGENÉTICA…… 3
2.2 TIPOS DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS……..……. 3
2.2.1 MODIFICACIÓN DE HISTONAS……..…… 4
2.2.2 RNA NO CODIFICANTE…….…….…….. 5
2.2.3 METILACIÓN DEL ADN…… 7
2.3 PROCESO DE METILACIÓN DEL ADN…….. 9
2.4 CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN LA INTERACCIÓN HUÉSPED- PATOGENO…….. 10
2.5 EPIGENÉTICA EN INFECCIÓN POR VIRUS.....…….…..….. 11
2.6 EPIGENÉTICA EN ARBOVIRUS..... ……... 13
2.7 ASPECTOS CLÍNICOS DEL VIRUS CHIKUNGUNYA.....…….... 14
3. JUSTIFICACIÓN.....…….....…….....…….... 16
4. HIPÓTESIS.....…….....…….....…….... 17
5.OBJETIVOS.....…….....…….....…….... 18
5.1 OBJETIVO GENERAL.....…….....…….....…….... 18
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....…….....…….....…….... 18
6. ESTRATEGIA GENERAL.....…….....…….....…… 19
7. MATERIAL Y MÉTODOS..... .....…….....…….... 20
7.1 LUGAR DE REALIZACIÓN.....…….....…….... 20
7.2 INFECCIÓN VIRAL EN CULTIVOS CELULARES.....…….....…….... 20
7.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN..... .....…….....…….... 21
7.2.2 EXTRACCIÓN DE RNA..... .....…….....…….... 21
7.3 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (CADN)..... 21
7.4 ENSAYOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR QPCR..... 22
7.5 SECUENCIACIÓN BISULFITO DE GENOMA COMPLETO (WGBS) EN PLATAFORMA DNBSEQ..... 22
7.6 PROCESAMIENTO BIOINFORMÁTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE REGIONES METILADAS.....…….....…….....…….... 23
7.7 REGIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS (RDM)..... 24
7.8 RECLUTAMIENTO DE PACIENTES 2015 Y SEGUIMIENTO 2023..... 25
7.9 ENSAYOS BASADOS EN DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN SENSIBLES A METILACIÓN..... 25
7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 26
8. RESULTADOS……... 28
8.1 INFECCIÓN VIRAL EN CULTIVOS CELULARES..... 28
8.2 TITULACIÓN VIRAL MEDIANTE EL MÉTODO DE FORMACIÓN DE PLACAS LÍTICAS CON VIRUS CHIKUNGUNYA……. 29
8.3 REALIZACIÓN DE ENSAYOS DE MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN EN CULTIVO PRIMARIO DE LINFOCITOS A DIFERENTES TIEMPOS …….. 29
8.4 ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE MECANISMOS EPIGENÉTICOS..... 30
8.5 BÚSQUEDA BIOINFORMÁTICA DE REGIONES METILADAS..... 33
8.6 PROPORCIÓN EN LA CITOSINA METILADA (MCG, MCHG Y MCHH)..... 39
8.7 DISTRIBUCIÓN DE NIVELES DE METILACIÓN……..……..... 40
8.8 PAISAJE GENÓMICO DE METILACIÓN..... ……....……..... 41
8.9 REGIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS (RDM)..... 43
8.10 GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS (GDM) Y ANÁLISIS FUNCIONAL……. 46
8.11 PAISAJE DE METILACIÓN DIFERENCIAL EN ELEMENTOS REGULADORES……... 47
8.12 SELECCIÓN DE REGIONES CANDIDATAS... .....…….....

8.13 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE MUESTRAS..... 52
8.14 ANÁLISIS COMPARATIVO DE METILACIÓN EN CASOS Y CONTROLES..... 54
8.15 SEGUIMIENTO CLÍNICO A LARGO PLAZO..... 55
9. DISCUSIÓN…..... 58
10. CONCLUSIONES..... 79
11. BIBLIOGRAFÍA..... 82
12. ANEXOS.....
ANEXO A 96
ANEXO B 114
ANEXO C 123
ANEXO D 126
ANEXO E 136

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Grupos incluidos en el ensayo de metiloma y comparaciones realizadas	24
Tabla 2. Lista de genes analizados en el ensayo de expresión	32
Tabla 3. Resumen de datos de secuenciación para cada muestra	34
Tabla 4. Resumen de datos y control de calidad por muestra	35
Tabla 5: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_VCHIK_2	37
Tabla 6. Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_VCHIK_2	38
Tabla 7. Elementos de control de calidad para cada muestra	39
Tabla 8. Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_VCHIK_2	39
Tabla 9. Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_VCHIK_2.	40
Tabla 10. Identificación de RDM y análisis de grupo 1 vs grupo 2	47
Tabla 11. Identificación de RDM y análisis de grupo 3 vs grupo 4	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tipos de modificaciones epigenéticas. imagen adaptada de (Barrès & Zierath, 2016).	4
Figura 2. Ejemplo de modificación de histonas. Imagen tomada de www.cusabio.com/c-20829.html	5
Figura 3. Biogénesis de miRNA. figura tomada de (Winter et al. 2009).	7
Figura 4. Metilación de ADN. Imagen tomada de (Sweatt et al. 2013).	9
Figura 5. Estrategia general	20
Figura 6. Seguimiento microscópico de cultivos de células Vero post-infección con VCHIK	29
Figura 7. Placa de titulación viral de cultivos infectados con sueros de pacientes	30
Figura 8. Viabilidad celular de cultivo primario de linfocitos	31
Figura 9. Mapas de calor de procesos epigenéticos en cultivos celulares de sinoviocitos y cultivos primarios de linfocitos humanos infectados con VCHIK	33
Figura 10. Distribución de la profundidad de secuenciación	35
Figura 11. Distribución acumulada de la profundidad de secuenciaciónefectiva de la citosina	36
Figura 12. Proporción de citosinas metiladas que incluyen mCG, mCHG y mCHH.	41
Figura 13. Distribución del nivel de metilación de mC en cada contexto de secuencia.	42
Figura 14. Distribución de porcentajes de metilación por variable en diferentes regiones genómicas	44
Figura 15. Mapas de calor que representan las RDM identificadas en cada unode los grupos analizados.	46
Figura 16. Dotplot de las 15 vías más significativas enriquecidas en genes diferencialmente metilados para el grupo1 vs grupo2.	48
Figura 17. Dotplot de las vías de señalización enriquecidas en genes diferencialmente metilados para el grupo3 vs grupo4.	49
Figura 18. Paisaje de metilación diferencial en regiones reguladorasentre grupo 1 y grupo 2.	51
Figura 19. Paisaje de metilación diferencial en regiones reguladoras entre grupo 3 y grupo 4.	52
Figura 20. Comparativa de elementos reguladores entre Sinoviocitos y Linfocitos.	53
Figura 21.El flujo de selección de regiones candidatas diferencialmente metiladas (RDM)	54
Figura 22. Manifestaciones clínicas de los casos. Tapachula Chiapas, México, mar-jun 2015.	56
Figura 23. Comparación de los niveles de metilación entre casos y controles para el primer bloque de marcadores.	57
Figura 24: Comparación de los niveles de metilación entre casos y controles para el segundo bloque de marcadores.	58

Figura 25. Heatmap combinado que integra parámetros de biometría hemática, química sanguínea y síntomas clínicos en pacientes de la cohorte de seguimiento. 59
Figura 26. Comparación de los niveles de metilación de los marcadores GH0XJ068496 y GH22J027789 entre grupos de casos, seguimiento y controles. 60

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
VCHIK	Virus Chikungunya
CO_2	Dióxido de carbono
CTL	Control
Ct	Ciclo umbral (Threshold cycle)
CTCF	CCCTC- Factor de transcripción
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DENV	virus del Dengue
DNMT	metiltransferasa de DNA
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EBV	Virus de Epstein-Barr
FBS	Suero bovino fetal
GO	Gene Ontology
HFLS	Celulas de Sinoviocitos similares a fibroblastos humanos
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
miRNAs	Micro RNAs
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
mL	Mililitro
ng	Nanogramos
ncRNA	RNA no codificante
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a retrotranscripción cuantitativa
RDM	Regiones Diferencialmente Metiladas
GDM	Genes Diferencialmente Metilados
CpG	Citosina - fosfato - Guanina
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA
siRNA	RNA de interferencia
SAM	S-adenosilmetionina
SINO	Sinoviocitos

tRNA	RNA de transferencia
TAE	Tris-Acetato-EDTA
VIH	Virus de inmunodeficiencia Humana
°C	Grados celcius
µl	microlito

Resumen

Los arbovirus, como el virus Chikungunya (VCHIK), representan un importante problema de salud pública debido a su capacidad para provocar artralgias persistentes que pueden prolongarse durante meses o incluso años después de la infección aguda. En este contexto, la epigenética, particularmente la metilación del ADN, constituye una herramienta prometedora para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la interacción virus-huésped y en la persistencia de los síntomas. Por ello, el objetivo de este estudio fue investigar la presencia de firmas epigenéticas asociadas con la infección por VCHIK y su posible relación con la evolución clínica de los pacientes.

La estrategia experimental comprendió varias etapas. Inicialmente, se infectaron cultivos primarios de sinoviocitos y linfocitos humanos con VCHIK para evaluar la expresión de genes relacionados con mecanismos epigenéticos mediante PCR cuantitativa (qPCR) y analizar el metiloma mediante secuenciación del genoma completo tratado con bisulfito (WGBS). Posteriormente, utilizando herramientas bioinformáticas como Bismark y análisis de enriquecimiento funcional, se identificaron regiones diferencialmente metiladas (RDM) y genes asociados. Paralelamente, se estudió una cohorte de 193 pacientes con infección confirmada durante el brote ocurrido en Tapachula, Chiapas, en 2015, de los cuales 27 participaron en un seguimiento clínico de ocho años para evaluar la persistencia de síntomas y validar regiones candidatas mediante PCR sensible a metilación (MS-qPCR). Los resultados mostraron sobreexpresión de genes de metilación de novo (DNMT3B, DNMT3L, familia MBD). Se hallaron 1,457 RDM en sinoviocitos y 1,016 en linfocitos, con hipometilación predominante en elementos no codificantes (5,170 circRNA). Las RDM se enriquecieron en vías de Rho GTPasas (CDC42, RAC2). Clínicamente, la fase aguda (fiebre 99.5%, poliartralgias 52.9%) presentó hipermetilación en las regiones GH22J027789 y GH0XJ068496. Sin embargo, tras ocho años, los niveles de metilación se normalizaron, coincidiendo con la resolución de síntomas en 26/27 pacientes. En conclusión, la infección por VCHIK induce una reprogramación específica y transitoria del metiloma del hospedador, caracterizada por alteraciones en la metilación del ADN y en vías celulares relacionadas con la respuesta a la infección viral. No obstante, los cambios observados en los loci analizados fueron reversibles a largo plazo y se asociaron con la resolución clínica de la enfermedad. Estos hallazgos amplían el conocimiento sobre la patogenia del chikungunya, aportan evidencia sobre la participación de mecanismos epigenéticos en la respuesta al VCHIK y proporcionan una base para el desarrollo futuro de biomarcadores con valor pronóstico y potencial aplicación clínica.

Abstract

Arboviruses, such as Chikungunya virus (VCHIK), represent a major public health problem due to their ability to cause persistent arthralgia that can last for months or even years after acute infection. In this context, epigenetics, particularly DNA methylation, constitutes a promising tool to understand the molecular mechanisms involved in virus-host interaction and symptom persistence. Therefore, the aim of this study was to investigate the presence of epigenetic signatures associated with VCHIK infection and their possible relationship with the clinical outcome of patients.

The experimental strategy comprised several stages. Initially, primary cultures of human synoviocytes and lymphocytes were infected with VCHIK to evaluate the expression of genes related to epigenetic mechanisms by quantitative PCR (qPCR) and to analyze the methylome by whole-genome bisulfite sequencing (WGBS). Subsequently, using bioinformatics tools such as Bismark and functional enrichment analysis, differentially methylated regions (DMRs) and associated genes were identified. In parallel, a cohort of 193 patients with confirmed infection during the 2015 outbreak in Tapachula, Chiapas, was studied, of whom 27 participated in an eight-year clinical follow-up to assess symptom persistence and validate candidate regions by methylation-sensitive PCR (MS-qPCR). The results showed overexpression of de novo methylation genes (DNMT3B, DNMT3L, MBD family). A total of 1,457 DMRs were found in synoviocytes and 1,016 in lymphocytes, with predominant hypomethylation in non-coding elements (5,170 circRNAs). DMRs were enriched in Rho GTPase pathways (CDC42, RAC2). Clinically, the acute phase (fever 99.5%, polyarthralgia 52.9%) presented hypermethylation in the GH22J027789 and GH0XJ068496 regions. However, after eight years, methylation levels normalized, coinciding with symptom resolution in 26/27 patients. In conclusion, VCHIK infection induces a specific and transient reprogramming of the host methylome, characterized by alterations in DNA methylation and cellular pathways related to the response to viral infection. Notably, the changes observed in the analyzed loci were reversible in the long term and were associated with clinical resolution of the disease. These findings expand knowledge about chikungunya pathogenesis, provide evidence on the involvement of epigenetic mechanisms in the response to VCHIK, and lay the foundation for the future development of biomarkers with prognostic value and potential clinical application.

1. INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son transmitidos a los humanos por artrópodos vectores. Se agrupan en cinco familias: Flaviviridae (Virus Dengue y Zika), Togaviridae (Virus Chikungunya) y Bunyaviridae, Reoviridae y Rhabdoviridae, que se informan con menos frecuencia (Gould et al. 2017).

La distribución de los arbovirus a nivel global está relacionada con las áreas habitadas por sus vectores y la mayoría de ellos ocurre en regiones tropicales y subtropicales (Mayer et al. 2017). Sin embargo, las infecciones de los vectores artrópodos por estos virus no parecen afectar su estado físico y, por lo general, no son patógenas y duran toda la vida (Keirsebelik et al. 2024). Mientras tanto en los huéspedes humanos las infecciones con arbovirus, particularmente las familias Flaviviridae y Togaviridae, son generalmente patógenas, a menudo agudas y causan viremia (Meltzer 2012). Esta combinación contribuye en gran medida a su exitosa propagación viral y persistencia, lo que representa una considerable carga médica y económica para los sistemas de salud de las naciones endémicas (Mayer et al. 2017).

Generalmente los arbovirus carecen de polimerasas con actividad de corrección de errores, por consiguiente experimentan una evolución genética constante y, por lo tanto, exhiben frecuencias de mutación significativas, En consecuencia, suele adaptarse rápido a su entorno, por acumulación mutacional a lo largo de su genoma; así, los arbovirus como muchos otros virus de RNA utilizan características únicas de ARN-dependiente de ARN polimerasa logrando una rápida adaptación, dando como resultado una presión evolutiva en las especies (Jupille et al. 2014).

Por otra parte, dentro del hospedador humano, el virus enfrenta una selección purificadora que elimina mutaciones deletéreas, lo que exige un equilibrio en su aptitud física para garantizar una replicación eficiente. Para lograrlo, despliega mecanismos de interacción como la evasión de la respuesta inmune, la modulación de la apoptosis y el uso diferencial de receptores, lo que le permite adaptarse tanto a hospedadores humanos como a vectores artrópodos, optimizando así su transmisión y persistencia (Coffey et al. 2008). Por consiguiente, estímulos ambientales, como

un trauma o infección, siempre se han asumido, pero en gran parte inexplorado hasta hace poco debido a la falta de disponibilidad de enfoques experimentales. En este sentido, la identificación de tales interacciones puede proporcionar información sobre mecanismos de interacción de las infecciones virales con su huésped.

Un enfoque prometedor en este campo es la epigenética, que representa un cambio de paradigma al considerar los estímulos ambientales que modifican la regulación génica sin alterar necesariamente la secuencia del ADN del huésped. Por esta razón, el presente estudio se enfoca en explorar las modificaciones epigenéticas inducidas por la infección con arbovirus, con el fin de comprender mejor los mecanismos de interacción virus-huésped y su posible impacto en la progresión de la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1 Epigenética

El término epigenética, significa etimológicamente "además de la genética" (Gallou-Kabani et al. 2007), fue introducido por primera vez por Waddington en la década de 1940 para describir la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan vida al fenotipo (Waddington 2012). Esta definición inicial denota las vías moleculares que regulan la expresión de un genotipo en un fenotipo particular (Dupont et al. 2009). El significado de la epigenética ha evolucionado a través del tiempo hasta la definición actual más aceptada: "el estudio de los cambios en la función génica que son mitóticos y/o meioticamente heredable y que no implican un cambio en la secuencia de ADN" (Wu y Morris 2001).

El ADN está empaquetado en la estructura intracelular llamada cromatina, la cromatina se puede diferenciar en heterocromatina, que es altamente condensada y transcripcionalmente inerte, y eucromatina, que es menos compactada y más accesible a los factores de transcripción y a la maquinaria (Putiri y Robertson 2011). La estabilidad de estos estados de cromatina es regulada por firmas epigenéticas (Alabert y Groth 2012), evitando la recombinación de secuencias repetitivas y la transcripción de elementos transponibles (Peng y Karpen 2008), evitando el daño del ADN y definiendo la organización cromosómica en elementos estructurales, como el centrómero o los telómeros (Putiri y Robertson 2011).

2.2 Tipos de modificaciones epigenéticas

Los procesos epigenéticos, junto con otros eventos reguladores de la transcripción, están implicados en la regulación de la actividad y expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación, o en respuesta a estímulos ambientales (Martínez et al. 2014). Los tres mecanismos epigenéticos reconocidos principales que regulan la expresión génica son modificaciones covalentes de histonas, RNA no codificante y metilación de ADN (Jiménez-Chillarón et al. 2012) (Figura 1).

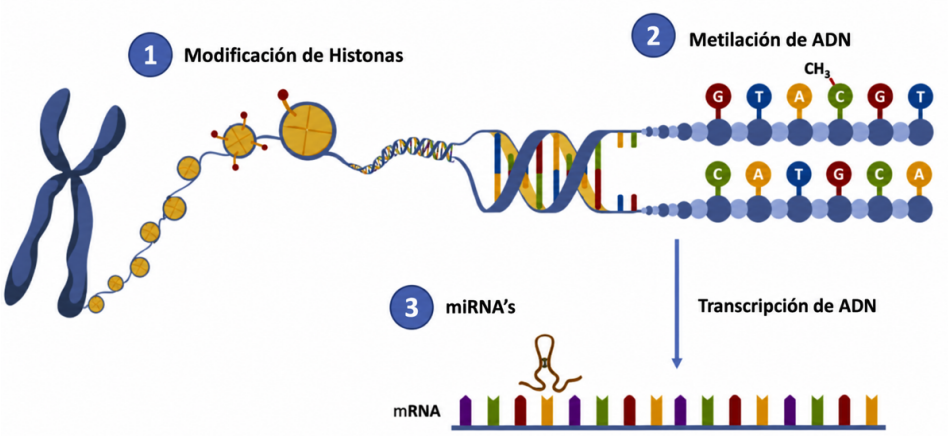


Figura 1. Tipos de modificaciones epigenéticas. Imagen adaptada de (Barrès & Zierath, 2016).

2.2.1 Modificación de histonas

En la célula eucariota, el ADN genómico se empaqueta firmemente en una matriz de nucleosomas, cada uno de los cuales está formado por un octámero de histona (dos heterodímeros de H2A-H2B y un tetrámero de dos homo-dímeros de H3-H4) envuelto por 147 pb de ADN y separado por ADN enlazador, siendo este complejo la unidad básica de la cromatina (Kim et al. 2009; Sharma et al. 2010).

Las histonas están sujetas a modificaciones postraduccionales en su cola N-terminal, que incluyen acetilación, biotinilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación, ribosilación, isomerización, citrulinación, butirilación, propionilación y glicosilación, aunque las más descritas en humanos son la acetilación, biotinilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación (Sadakierska-Chudy y Filip 2015) (Figura 2). El acceso físico al ADN es una propiedad altamente dinámica de la cromatina. Por consiguiente, modificaciones a las histonas anteriormente mencionadas pueden regular la expresión génica alterando el ensamblaje y la compactación de la cromatina, cambiando la accesibilidad a sitios de unión de potenciadores, promotores, sitios de unión para los factores de transcripción y otras proteínas efectoras (Farooqi et al. 2019). Las modificaciones de las histonas son reversibles y reguladas por la acción de varias enzimas, como las acetiltransferasas de histona, las desacetilasas de histona, histonas metiltransferasas, histonas desmetilasas, fosfatasas, quinasas, entre otras, dando un equilibrio a este proceso

(Kanwal y Gupta 2012). Por lo tanto, se ha demostrado que la expresión de genes inflamatorios, la reparación del ADN y la proliferación celular están controlados por el grado de acetilación de las proteínas histonas y no histonas producidas por esta histona acetiltransferasas e histona desacetilasas (Adcock 2007; McKinsey 2011).

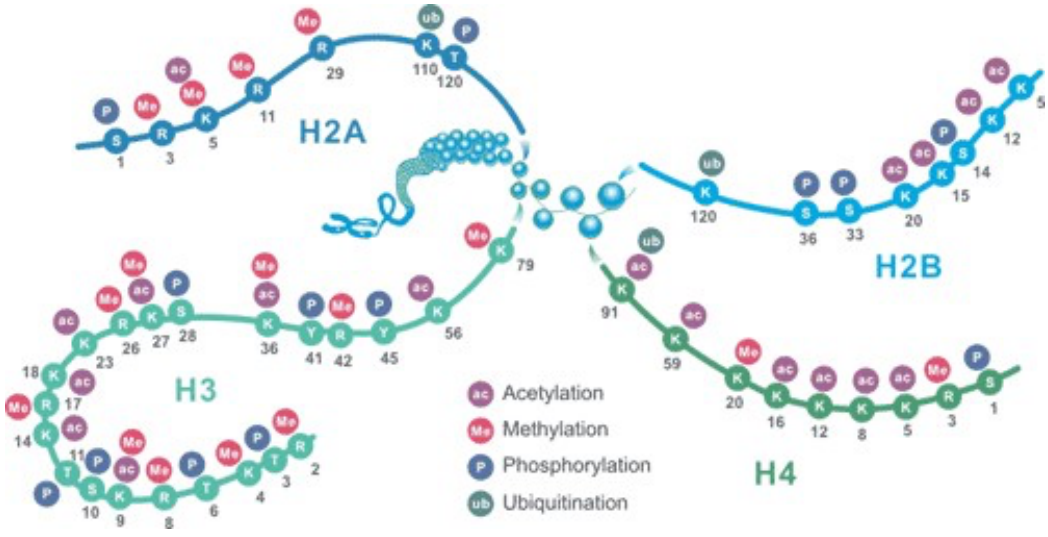


Figura 2. Ejemplo de modificación de histonas. Imagen tomada de www.cusabio.com/c-20829.html

2.2.2 RNA no codificante

Los ARN no codificantes (ncRNA) son un grupo de ARN que no se traducen en proteínas funcionales (Wei et al. 2017). Se pueden clasificar en ncRNA largos, que contienen >200 nucleótidos, y ncRNA cortos, formados por 20-300 nucleótidos (Lillycrop y Burdge 2014). ncRNA largos se han descrito como guías moleculares, andamios, señuelos y moduladores alostéricos en la regulación de la transcripción y la cromatina (Triantaphyllopoulos et al. 2016). Por otro lado, los ncRNA cortos, que generalmente están relacionados con el silenciamiento génico por represión transcripcional o degradación del ADN (Lillycrop y Burdge 2014), incluyen microRNA (miRNAs), pequeños RNA interferentes (siRNA), ARN que interactúan con Piwi y pequeños ARN nucleares (Delpu et al. 2016; Wei et al. 2017).

Los ncRNAs más estudiados son los miRNAs. Son cadenas de RNAs procesadas de aproximadamente 18-22 nucleótidos, que se han sometido a una serie de pasos de maduración de los miRNAs primarios (Dahmer et al. 2016). Algunos miRNAs se encuentran dentro de los intrones de los genes que codifican las proteínas y se transcriben a lo largo de ellos. con la transcripción primaria, mientras que otras se transcriben de su propio gen (Tammen et al. 2013; Wong et al. 2020). Después de la transcripción, el miRNA primario es procesado por la ARNasa Drosha en el núcleo, generando el miRNA precursor, que se exporta al citoplasma. Posteriormente, el precursor de miRNA es escindido por Dicer, produciendo el miRNA maduro (Han et al. 2006) (Figura 3). El miRNA maduro puede regular la traducción de ARNm formando parte del Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC) y emparejándose con regiones 3' no traducidas del mensajero objetivo, lo que resulta en una inhibición traduccional si hay complementariedad parcial o degradación si la complementariedad es completa (Tammen et al. 2013). Por lo tanto, los miRNAs afectan sus genes diana a nivel postranscripcional, regulando así muchos procesos biológicos (De Rosa et al. 2018).

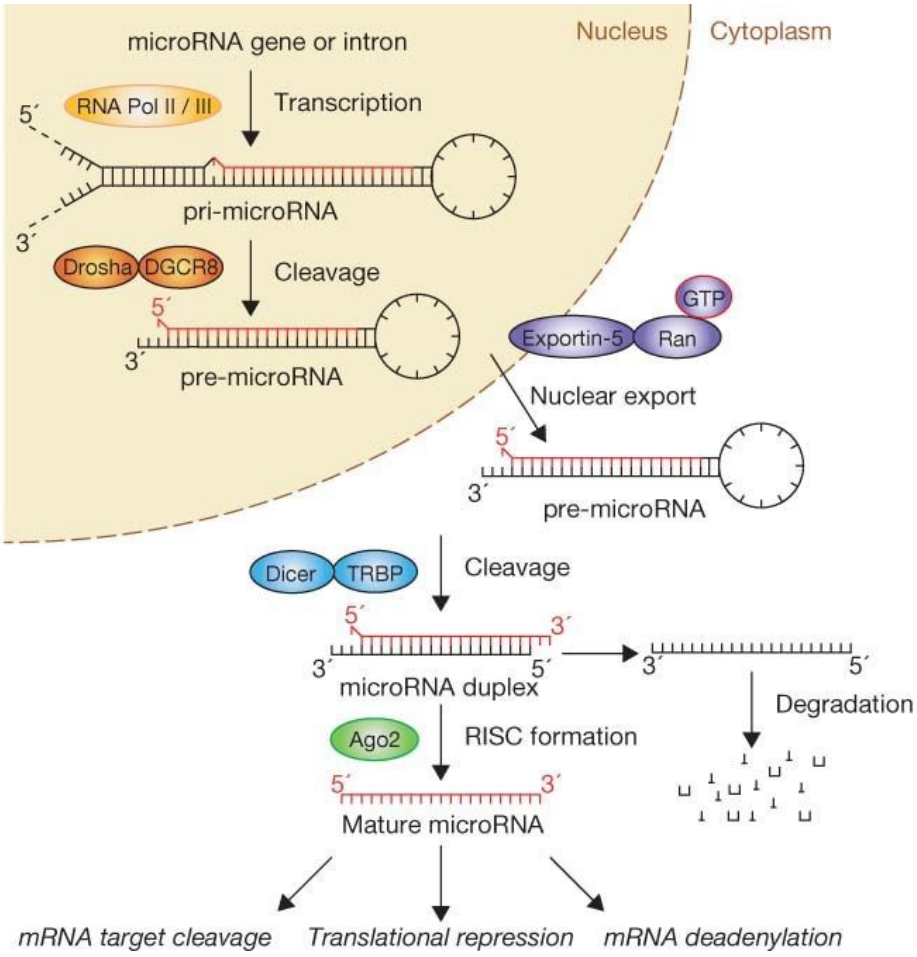


Figura 3. Biogénesis de miRNA (Figura tomada de Winter et al. 2009).

2.2.3 Metilación de ADN

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a la molécula de ADN, ya sea en bases de nucleótidos de adenina o citosina (Iyer et al. 2016). En los mamíferos, la metilación del ADN más común ocurre en los sitios CpG, donde se incorpora un grupo metilo en el quinto carbono de una citosina. adyacente a una guanina, dando como resultado la 5-metilcitosina (Triantaphyllopoulos et al. 2016) (Figura 4).

La metilación del ADN puede ocurrir en diferentes regiones del genoma, como secuencias repetitivas, cuerpo genético, islas CpG relacionadas con el promotor y

costas de islas CpG. Las islas CpG son regiones de aproximadamente 1000 pb con una concentración elevada en bases CG, ubicadas principalmente en los promotores de genes (70% del total de islas CpG) y, en general, con baja metilación del ADN (Deaton y Bird 2011)). Las costas de las islas CpG están ubicadas hasta 2 kb aguas arriba de Isla CpG. La mayoría de los CpG metilados se encuentran dentro de los cuerpos génicos (Portela y Esteller 2010).

La metilación del ADN puede influir en la transcripción génica de tres maneras diferentes:

a) afectando la unión de factores de reconocimiento específicos de la metilación a promotores o cuerpos genéticos; b) modificando la afinidad de un factor de transcripción a un promotor génico; c) alterando la estructura de la cromatina y la accesibilidad espacial de los factores de transcripción u otras proteínas de unión al ADN (Zhang y Pradhan 2014). En general, las secuencias de ADN metiladas están relacionadas con el silenciamiento génico, mientras que los CpG no metilados están asociados con la actividad transcripcional (Burdge y Lillycrop 2010). Sin embargo, hay evidencia de que la metilación del ADN también puede correlacionarse positivamente con la expresión génica (Portela y Esteller 2010).

Si no se mantienen los patrones de metilación adecuados se producen cambios en la transcripción génica que pueden influir en la aparición de enfermedades, incluido el cáncer; enfermedades neurológicas, del neurodesarrollo, neurodegenerativas, autoinmunes, obesidad, entre otros (Barres y Zierath 2011; Tammen et al. 2013; Zhang y Pradhan 2014). E incluso, ayudar a la persistencia de síntomas en algunas enfermedades virales o microbianas (Paschos y Allday 2010).

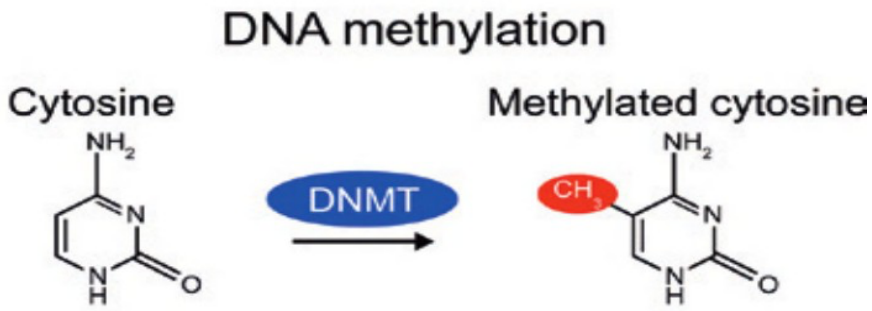


Figura 4. Metilación del ADN (Imagen tomada de Sweatt et al. 2013).

2.3 Proceso de metilación de ADN

La metilación del ADN en los sitios CpG está catalizada por ADN metiltransferasa (*DNMT*), que transfieren un grupo metilo de SAM a la citosina (Kulis y Esteller 2010). En mamíferos, se han informado cinco miembros de *DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L*, aunque solo están presentes *DNMT1, DNMT3a y DNMT3b* actividad de la metiltransferasa (Portela y Esteller 2010).

DNMT1 es responsable del mantenimiento y reproducción de los patrones de metilación existentes durante la replicación del ADN, desde los sitios CpG hemimetilados (cuando un CpG se metila en una cadena, pero no en la otra) hasta las nuevas cadenas de ADN generadas (Kim et al. 2009). Esta enzima, que es el DNMT más abundante en la célula, exhibe una preferencia de 30-40 veces por los sustratos hemimetilados, pero también presenta actividad de DNMT de novo (Portela y Esteller 2010). *DNMT1* se expresa de manera constrictiva en las células en división y se transcribe principalmente durante la fase S del ciclo celular (Smith y Meissner 2013).

DNMT3a y *DNMT3b* son metiltransferasas de novo involucradas en el establecimiento de patrones de metilación del ADN durante el desarrollo de la línea germinal y la embriogénesis (Kanwal y Gupta 2012). La expresión de estas metiltransferasas aumenta en las células madre embrionarias, mientras que se regula negativamente en las células diferenciadas (Portela y Esteller 2010). Sin embargo, también son importantes para la herencia estable y la remodelación activa de los

patrones de metilación del ADN en células diferenciadas (Kadayifci et al. 2018). *DNMT3a* parece ser más importante en el desarrollo tardío o después del nacimiento, mientras que *DNMT3b* puede estar implicado en etapas tempranas del desarrollo y en regiones particulares del genoma (Kulis y Esteller 2010).

DNMT3L estimula la acción de *DNMT3a* y *DNMT3b* al interactuar y colocalizarse con ellas en el núcleo con ellos en el núcleo (Portela y Esteller 2010). En el caso de *DNMT2*, funciona como una tRNA transferasa en lugar de una ADN metiltransferasa (Kadayifci et al. 2018).

Todos los DNMT usan SAM (S-adenosilmetionina) como sustrato (Mann 2017), dependiendo de los donantes de grupos metilo y cofactores de los alimentos ingeridos, como folato, colina, betaína o metionina (Chmurzynska, 2010). Estas sustancias proporcionan el grupo metilo necesario para metilar homocisteína y formar metionina, que será más tarde transformado en SAM. Alternativamente, cuando hay un exceso de metionina, la homocisteína se puede convertir en cisteína (Finkelstein 1998).

2.4 Cambios epigenéticos en la interacción huésped-patógeno

En los últimos años, el campo de la epigenética ha florecido; a pesar de esto, el papel de la epigenética en la conformación de las interacciones huésped-patógeno ha recibido relativamente poca atención. Sin embargo, se ha ido acumulando evidencia sólida que respalda la implicación de la epigenética en la defensa del huésped contra los patógenos en la interacción biológica, como la metilación del ADN, la modificación de histonas y la actividad de los RNA no codificantes, lo cual podría ser un fenómeno generalizado (Morandini et al. 2016; Paschos y Allday 2010)

Con respecto a las modificaciones epigenéticas debidas a infecciones por virus, existen informes que afirman que los virus juegan un papel importante en la metilación del ADN. Esta desregulación afecta vías celulares con el fin de optimizar su propia transcripción o replicación, así como de evadir la respuesta inmune innata

del huésped (Balakrishnan y Milavetz 2017; Milavetz y Balakrishnan 2015) Estos mecanismos no solo favorecen la persistencia viral, sino que también pueden contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas a largo plazo.

Con respecto al sistema inmune innato después del reconocimiento de los patógenos da como resultado la expresión de una serie de genes para producir citocinas, quimiocinas y vías de señalización celular, así como factores de transcripción, que en su mayoría están bien descritos. Hoy en día se sabe qué mecanismos epigenéticos son críticos para ajustar la expresión génica y esta regulación está ampliamente involucrada en la programación de estados de cromatina y patrones de expresión tanto en el huésped como en el patógeno; por un lado, equilibra la homeostasis inmune para las respuestas inmunes innatas del huésped contra el patógeno, y por el otro lado, media la evasión inmune del patógeno (Zhang y Cao 2019).

Para poder sobrevivir y replicarse, los patógenos han desarrollado una variedad de estrategias epigenéticas, como modificar directamente las proteínas del huésped y la cromatina mediante productos génicos específicos de patógenos, para atenuar las vías de detección y modular la expresión de activadores y represores en la inmunidad innata. Sin embargo, los huéspedes pueden anular los cambios inducidos por patógenos en sus epigenomas para mantener una inmunidad anti patógena efectiva. Además, la desregulación epigenética inducida por infección crónica, especialmente por virus oncogénicos, es un mecanismo utilizado por algunos patógenos para persistir en el huésped. (Zhang y Cao 2019).

2.5 Epigenética en infección por virus

Los virus han evolucionado con sus anfitriones, que incluyen todas las especies vivas. Este proceso ha contribuido al desarrollo de sistemas inmunes altamente especializados en los huéspedes. Sin embargo, los virus también han desarrollado formas de regular y evadir la defensa inmune del huésped. Además de los mecanismos mutacionales que emplean los virus para imitar el genoma del huésped y experimentar latencia para evadir el reconocimiento del patógeno por parte del huésped, también han desarrollado mecanismos de reprogramación epigenética

mediante los cuales pueden inactivar las respuestas inmunes del huésped frente a sus antígenos y completar sus ciclos de vida. La regulación epigenética de la expresión génica ocurre de manera activa en el huésped y está involucrada en la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular (Adhya y Basu 2010). La desregulación de la cromatina del huésped, ya sea por cambios en los modificadores de la cromatina del huésped inducidos por el virus o por reguladores epigenéticos codificados viralmente, se ha descrito principalmente durante las infecciones con virus asociados a neoplasias. Los virus han desarrollado diferentes estrategias epigenéticas para modular la respuesta inmune y favorecer su replicación (Zhang y Cao 2019).

Algunos ejemplos que demuestran los diferentes mecanismos que usan los virus para las modificaciones epigenéticas, son los trabajos realizados por Tsai et al. En el 2006 e Hino et al. Enel 2009 donde demuestran que la proteína de membrana latente codificada por el virus Epstein-Barr 1 (LMP1) y LMP2A activando a JNK-AP-1 y STAT3, respectivamente, para regular al alza la expresión del ADN del huésped activando la transcripción de DNMT1 (Hino et al. 2009; Tsai et al. 2006).

Otro trabajo realizado por Periyasamy et al. En el 2018 demuestra el aumento de metilación de ADN por la infección de VIH, en donde indica la regulación negativa epigenética de miR-124, la cual modula los niveles de *STAT3*, lo que conduce a la activación microglial (Periyasamy et al. 2018). De igual manera, el aumento de metilación reduce la expresión del gen *FOXP3* en las células T reguladoras (Tregs), las cuales desempeñan un papel importante en las infecciones que modulan las respuestas inmunitarias del huésped y evitan la inmunidad exagerada, por tal motivo, pierde la capacidad supresora y las alteraciones en el patrón de secreción de citocinas (Pion et al. 2013). También se puede llevar desmetilación específica de genes en elementos reguladores y aumentar la expresión de la proteína 1 de muerte celular programada por el receptor inhibidor (PD1) en las células T CD8 +, incluso después de una terapia antiviral efectiva (Youngblood et al. 2013).

Otro ejemplo de virus estudiado es el caso del Epstein-Barr (EBV) el cual desencadena la hipermetilación del ADN a través de la regulación negativa del componente de desmetilación TET2, sugiriendo que funciona como un factor de

resistencia contra la metilación del ADN en las células epiteliales gástricas y la represión de TET2 contribuye a la adquisición de la metilación del ADN durante la infección por EBV (Namba-Fukuyo et al. 2016).

2.6 Epigenética en arbovirus

Si bien existe una gran cantidad de evidencia que sugiere que los factores epigenéticos juegan un papel crítico en la regulación de las infecciones por virus, en muchos casos no se han aclarado los mecanismos detallados. Aunque varios factores limitantes contribuyen a nuestra relativa falta de comprensión de las complejidades de la regulación epigenética viral, la complejidad inherente de la regulación epigenética probablemente constituye el principal obstáculo (de Aguiar et al. 2019); a pesar de esto, el papel de la epigenética en la conformación de las interacciones huésped-patógeno ha recibido relativamente poca atención. Sin embargo, existe evidencia sólida que respalda la implicación de la epigenética en la defensa del huésped contra los patógenos en la interacción biológica, como la metilación del ADN, la modificación de histonas y la actividad de los ARN no codificantes (Morandini et al. 2016; Paschos y Allday 2010)

Uno de los principales problemas de salud pública en el mundo son las infecciones por arbovirus. En cuanto a los arbovirus que infectan a humanos, todos poseen genomas de ARN de diferentes longitudes y polaridades con genomas segmentados y no segmentados (Vasilakis et al. 2016). En particular, las familias Flaviviridae y Togaviridae son generalmente patógenas, a menudo agudas y causan viremia a nivel de la población, lo que representa una carga médica y económica considerable para los sistemas de salud de las regiones endémicas (Mayer et al. 2017)

Si bien, existen una gran cantidad de estudios epigenéticos en infecciones arbovirales, la gran mayoría se centra en el virus del Dengue (DENV); la literatura disponible para otros arbovirus suele ser escasa. En general, los estudios investigaron una serie de modificaciones epigenéticas, en particular miRNAs/siRNAs, supresión de iRNA, modificaciones de los reguladores de iRNA y metilación del ADN (de

Aguiar et al. 2019).

En el caso del VCHIK, solo se han reportado dos estudios *in vitro* Uno utilizó herramientas de alto rendimiento para detectar posibles marcadores de diagnóstico u objetivos terapéuticos (Saxena et al. 2013), mientras que el otro investigó explícitamente miR-146a (Selvamani et al. 2014).

En el primer estudio, utilizan la tecnología de microarrays y el método de PCR cuantitativa para establecer la firma completa de miRNA, snoRNA y mRNA de la respuesta del huésped a la infección por VCHIK en tres líneas de células de riñón embrionario humano HEK293T, Vero-76 y células de fibroblastos dérmicos humanos primarios. El perfil de expresión de miRNA reveló la regulación de 152 miRNA después de la infección por VCHIK. Los datos de microarrays validados por RT-qPCR revelaron la inducción de miR-744, miR-638, miR-503. Estos autores también investigaron cambios en la expresión de RNA nucleares pequeños (snoRNA), un mecanismo epigenético que guía las modificaciones químicas de otros RNA, principalmente RNA ribosómico. Los resultados mostraron que 48 snoRNAs estaban regulados al alza. De estos, 16 eran del tipo C/D, que se sabe que están asociados a la acetilación de RNA ribosómico (Saxena et al. 2013).

El segundo estudio, centrado en el papel de miR-146a en la patogénesis del VCHIK en células sinoviales humanas y las manifestaciones inflamatorias subyacentes, se realizó la infección por VCHIK en fibroblastos sinoviales humanos primarios. La infección por VCHIK se asoció con un aumento de la expresión celular de miR-146a y la posterior disminución de la expresión génica de TRAF6, IRAK1 e IRAK, así como un aumento de la replicación viral. Por lo tanto, concluyeron que VCHIK redujo la respuesta inmune antiviral en fibroblastos humanos a través de una sobreexpresión de miR-146a (Selvamani et al. 2014).

2.7 Aspectos clínicos del virus chikungunya

El VCHIK es un arbovirus transmitido a los humanos por los mosquitos *Aedes*. El virus se describió por primera vez en 1952 durante un brote febril en la región de

Makonde, al sur de Tanzania (Robinson 1955). La palabra chikungunya proviene del idioma bantú del grupo étnico Makonde de Tanzania y Mozambique y se refiere a la posición curva del paciente debido a un dolor articular debilitante. Desde su descripción, en 1952, VCHIK ha causado millones de infecciones humanas en África, las islas del Océano Índico, Asia, Europa y las Américas (Rodrigues Faria et al. 2016).

La infección aguda por VCHIK es sintomática en aproximadamente el 95% de los casos y se caracteriza por fiebre abrupta (> 39 °C), con poliartralgia o artritis severas. En la mayoría de los casos, la enfermedad es autolimitada. Exceptuando la artralgia, la recuperación suele ocurrir entre 7 y 10 días desde el inicio de los síntomas. La artralgia persistente puede prolongarse de 6 meses hasta 5 años y se caracteriza por recaídas episódicas y períodos de recuperación del dolor articular. Esto puede ocurrir en >50% de los casos. El tiempo total de recuperación aún es incierto y algunas personas infectadas siguen sintomáticas entre seis y ocho años después de la infección inicial, lo que puede resultar altamente incapacitante (Feldstein et al. 2017; Murillo-Zamora et al. 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por arbovirus representan una carga significativa para los sistemas de salud y la productividad laboral, especialmente en los países tropicales y en desarrollo. El potencial no explotado de los marcadores epigenéticos puede constituir un elemento clave para reforzar una comprensión más profunda de la patogénesis y los mecanismos de respuesta compartidos entre las especies de arbovirus que causan enfermedades, lo que puede aportar información crítica sobre la dinámica de las epidemias y los brotes recurrentes. Por esta razón, la búsqueda de perfiles epigenéticos busca identificar biomarcadores para la detección, pronóstico y predicción de la respuesta, y definir objetivos para tratamientos personalizados, subrayando su potencial en la medicina traslacional.

4. HIPÓTESIS

La infección por el virus Chikungunya genera un perfil de metilación específico en genes reguladores de la respuesta inmune, el cual se asocia con la severidad y persistencia de la artralgia en pacientes crónicos, sugiriendo un papel de la epigenética en la persistencia de los síntomas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Investigar la presencia de firmas epigenéticas en pacientes con artralgia persistente derivada de la infección por el virus Chikungunya

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el estado de metilación en cultivos celulares humanos infectados con el virus Chikungunya

2. Analizar bioinformáticamente regiones metiladas y su participación en procesos inflamatorios reguladores del sistema inmune.

3. Caracterización clínica y de laboratorio de la cohorte de pacientes confirmados en fase aguda para VCHIK.

4. Seleccionar regiones metiladas candidatas de los grupos iniciales y control.

6. ESTRATEGIA GENERAL

La estrategia experimental propuesta comprende cuatro fases secuenciales. En primer lugar, se cultivarán células humanas infectadas con el VCHIK a partir de las cuales se realiza el análisis del metiloma y de la expresión génica. Posteriormente, a través de herramientas bioinformáticas, se identificarán regiones genómicas diferencialmente metiladas implicadas en la regulación de la respuesta inmune, con el fin de priorizar candidatos epigenéticos de interés. En una tercera etapa, se seleccionará una cohorte de individuos previamente infectados con VCHIK, a quienes se les dará seguimiento clínico varios años después de la infección aguda, con el objetivo de evaluar la persistencia de alteraciones moleculares. Finalmente, en esta misma cohorte, se validarán las regiones candidatas mediante ensayos específicos de metilación, como la PCR cuantitativa específica de metilación con enzimas de restricción (MS-qPCR), lo que permitirá establecer una firma epigenética asociada a la infección por VCHIK y sus posibles consecuencias a largo plazo la cual se encuentra resumida en la Fig 5.

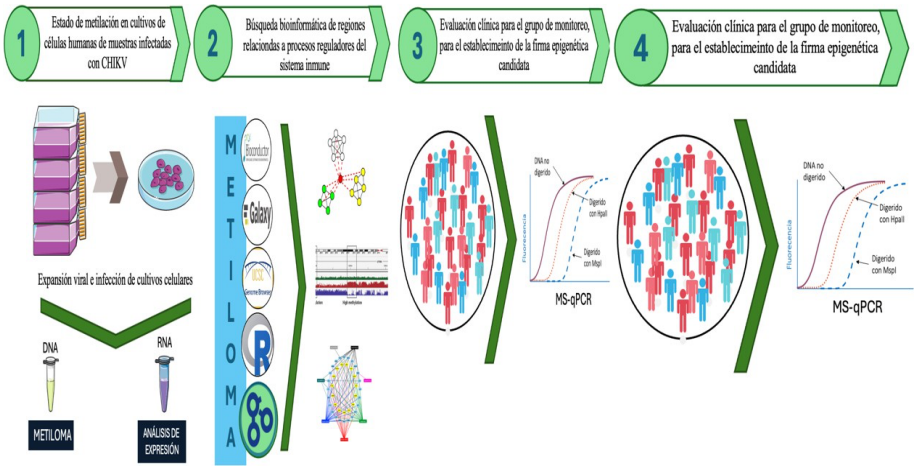


Figura 5. Estrategia general

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Lugar de realización

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los cultivos de sinoviocitos similares a fibroblastos humanos (HFLS; Cell Applications, Inc., catálogo #408K-05a) y los cultivos primarios de linfocitos se establecieron en una campana de flujo laminar BSL-2 (LABCON). Para ello, se empleó medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y medio RPMI, ambos suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS; HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM de L-glutamina (Life Technologies, CA, EE.UU.) y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (Gibco, Rockville, MD). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2. El recuento celular se realizó mediante exclusión con azul tripano al 0,4% (GIBCO-BRL, Grand Island, N.Y.) en cámara de Neubauer.

Por otra parte, el VCHIK fue aislado a partir de sueros de pacientes positivos y posteriormente expandido en cultivos de células Vero-76 durante 72 h. El sobrenadante del cultivo se recuperó y se caracterizó mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real. Las alícuotas virales obtenidas se almacenaron a -80 °C hasta su uso en los experimentos posteriores.

7.2 Infección viral en cultivos celulares

Las células HFLS y los cultivos primarios de linfocitos se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta alcanzar aproximadamente un 80 % de confluencia. En ese momento, las células se infectaron con el VCHIK a diferentes multiplicidades de infección (MOI de 1, 10 y 100) durante 2 h. Transcurrido el período de adsorción, se añadió medio fresco suplementado con suero y las células se incubaron en condiciones estándar (37 °C, 5 % CO_2). El medio de cultivo se renovó diariamente para evitar la privación de nutrientes. Tanto las células infectadas como los sobrenadantes de cultivo se recolectaron cada 24 h. En cada punto temporal, la cuantificación viral se realizó mediante RT-PCR en tiempo real, y posteriormente se

extrajo ADN y ARN tanto de las células como de los sobrenadantes. Todos los experimentos se realizaron por triplicado de forma independiente.

7.2.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó a partir de células en monocapa utilizando el kit de purificación RNA/ADN (DaAnGene, Cat. #DA0591), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este procedimiento permitió obtener ADN genómico de alta calidad a partir de las células infectadas y no infectadas. Se empleó etanol (Karal, Cat. #2003) en los pasos de lavado. La concentración y pureza del ADN se determinaron mediante espectrofotometría UV-Visible con un instrumento NanoDrop (NanoDrop Technologies). Las muestras de ADN se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

7.2.2 Extracción de RNA total

El ARN total se aisló a partir de células en monocapa y de sobrenadantes de cultivo viral utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen Corp, Cat. #15,596–026), de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Brevemente, las células fueron lisadas directamente en la placa de cultivo con TRIzol, mientras que los sobrenadantes virales se mezclaron con el reactivo en una proporción adecuada. Para la separación de fases se añadió cloroformo (Sigma-Aldrich, Cat. #C2432), seguido de centrifugación. La fase acuosa se recuperó y el ARN se precipitó con isopropanol (Bio Basic Canada, Cat. #67-63-0). El sedimento de ARN se lavó con etanol (Karal, Cat. #2003) y se resuspendió en agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich, Cat. #W4502). La concentración y pureza del ARN se evaluaron mediante espectrofotometría con un instrumento NanoDrop (NanoDrop Technologies). Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento posterior.

7.3 Síntesis de ADN complementario (cADN)

La síntesis de cADN se realizó a partir de ARN total utilizando el kit High Capacity RNA-to-cADN (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante.

7.4 Ensayos de expresión génica por qPCR

Los ensayos de expresión génica se llevaron a cabo mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el reactivo Maxima SYBR Green/Rox 2X (Thermo Scientific, Cat. #K0222). Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado en un sistema de detección Step One Plus (Applied Biosystems™) en placas de 96 pocillos.

El diseño de los cebadores (primers) se realizó mediante la herramienta en línea Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Se diseñaron cebadores para los genes de referencia utilizados como controles internos para la normalización de los datos: Beta-2 microglobulina (B2M), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y proteína ribosomal lateral P0 (RPLPO). Simultáneamente, se diseñaron cebadores específicos para genes de interés involucrados en distintos mecanismos epigenéticos:

- **Metilación del ADN:** *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, TET1, TET2, TET3, MECP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4.*
- **Biogénesis de miRNAs:** *AGO1, AGO2, AGO3, AGO4, DGCR8, DICER1, DROSHA, TARBP2, TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C, XPO5.*
- **Modificación de histonas:** *BMI1, EED, EP300, EZH1, EZH2, KDM5B, KDM6A, PCGF1, PCGF2, PCGF6, RING1, RNF2, SUZ12, CREBBP, HDAC2, KMT2A, KMT2C, KMT2D, SIRT1.*
- **Regulación de la cromatina:** *ARID1B, BPTF, BRD7, CHD1, CHD4, CHD5, CHD7, DPF1, HDAC2, PBRM1, PHF10, SMARCA2, ARID2, SMARCA4.*

Los valores de Ct obtenidos se normalizaron con los genes de referencia y la cuantificación relativa de la expresión de mRNA se determinó mediante el método comparativo 2^-ΔΔCt (Livak & Schmittgen, 2001). Las secuencias de todos los cebadores utilizados se detallan en la Tabla Suplementaria 1 (Anexos).

7.5 Secuenciación bisulfito de genoma completo (WGBS) en plataforma DNBseq

La construcción de las bibliotecas para secuenciación bisulfito de genoma completo (WGBS) se realizó por duplicado para un total de ocho muestras (Tabla 1). El ADN genómico de cada muestra se fragmentó por sonicación empleando un equipo Bioruptor (Diagenode, Bélgica) hasta obtener fragmentos de un tamaño medio aproximado de 250 pb. Posteriormente, los fragmentos se sometieron a reparación de extremos, adición de una cola de adenina (dA) en el extremo 3' y ligación de adaptadores metilados, estos últimos diseñados para resistir la desaminación por bisulfito, siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. El ADN ligado se sometió a conversión con bisulfito de sodio utilizando el kit EZ ADN Methylation-Gold (ZYMO). A continuación, los fragmentos convertidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se escindieron del gel aquellos correspondientes al rango de tamaño de inserción deseado. Los productos purificados con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) se amplificaron por PCR. Finalmente, la secuenciación se llevó a cabo en la plataforma DNBseq-T7 de Wuhan Benagen Technology Co., Ltd. (Wuhan, China).

Tabla 1. Grupos incluidos en el ensayo de metiloma y comparaciones realizadas entre grupos.

SAMPLE NAME	
SINO CTL 1	group 1
SINO CTL 2	
SINO CHIKV 1	group 2
SINO CHIKV 2	
BLOOD CTL1	group 3
BLOOD CTL2	
BLOOD CHIKV1	group 4
BLOOD CHIKV2	

COMPARISON		
group 1	vs	group 2
group 1	vs	group 3
group 2	vs	group 4
group 3	vs	group 4

7.6 Procesamiento bioinformático para la identificación de regiones metiladas

Después de obtener los datos sin procesar, las lecturas de secuenciación se alinearon con el genoma de referencia (hg38) antes de realizar el análisis de metilación. El software Bismark se utilizó para realizar una comparación de las alineaciones de las

lecturas tratadas con bisulfito con un genoma de referencia utilizando parámetros predeterminados. Las lecturas que fueron alineadas con la misma región del genoma se tomaron como el número duplicado, y el número duplicado se utilizó para resumir la profundidad y la cobertura de la secuencia. La tasa de conversión de bisulfito se calculó como el porcentaje de las lecturas limpias metiladas como un porcentaje del número total de lecturas limpias en el genoma lambda utilizando el software Bismark. Como la citosina no metilada del genoma se convirtió en T después del tratamiento con bisulfito y la amplificación por PCR, la citosina metilada se mantuvo sin cambios. Bismark puede extraer información sobre los sitios de citosina del genoma a partir de los resultados de la comparación de las lecturas limpias con el genoma de referencia y, de ese modo, obtener estadísticas de cobertura del sitio de citosina y el número de diferentes tipos (CG como CpG, CHG y CHH) de lecturas de citosina metiladas. Como Bismark no puede discriminar el sitio C de metilación individual, se utilizó la prueba de distribución binomial para cada sitio C para confirmar el sitio C metilado mediante condiciones de detección de cobertura ≥4× y tasa de descubrimiento falso (FDR) <0.05.

7.7 Regiones diferencialmente metiladas (RDM)

Las RDM se identificaron mediante la comparación de los metilomas entre grupos (grupo 1 vs grupo 2 y grupo 3 vs grupo 4) utilizando ventanas que contenían al menos 5 sitios CpG (CHG o CHH) con un cambio de 2 veces en el nivel de metilación y un valor p de la prueba de Fisher ≤ 0.05. Además, se requirió que ambos tejidos no estuvieran hipometilados en el descubrimiento de RDM. Dos RDM cercanos se consideraron interdependientes y se unirían en un RDM continuo si la región genómica desde el inicio de un RDM ascendente hasta el final de un RDM descendente también tuviera diferencias de nivel de metilación de 2 veces entre el grupo 1 vs grupo 2 con un valor p ≤ 0.05. De lo contrario, los dos RDM se consideraron independientes. Después de fusionar iterativamente los RDM interdependientes, el conjunto de datos final de RDM se compuso de aquellos que eran independientes entre sí.

Para la búsqueda de sitios de interés de las RDM, las coordenadas establecidas para

las diferentes RDM se ordenaron en tablas de datos para facilitar la búsqueda de regiones promotoras metiladas de genes objetivo o regiones con función regulatoria (genes, iRNA, miRNA, siRNA, eRNA, cirRNA, factores de transcripción, sitios CTFC) con ayuda de Table Browser de la Universidad de California Santa Cruz (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables). De los genes involucrados en la RDM se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) (https://geneontology.org/), los cuales ayudaron a establecer las funciones biológicas específicas, luego se utilizó una prueba hipergeométrica para encontrar términos GO significativamente enriquecidos en la lista de entrada, de genes relacionados con RDM. De igual manera se realizó un enriquecimiento de vías KEGG, el cual se utilizó con los genes relacionados con RDM, lo que ayuda a identificar vías metabólicas o vías de transducción de señales significativamente enriquecidas en genes relacionados con RDM en comparación con el fondo del genoma completo (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html).

7.8 Reclutamiento de pacientes 2015 y seguimiento 2023

Se contó con una N de 193 pacientes que acudieron a la Clínica Hospital Dr. Roberto Nettel Flores del ISSSTE, en Tapachula, Chiapas (la cual brinda servicios de salud a la Región X Soconusco del estado), durante el periodo comprendido entre marzo y junio del 2015. Todos presentaban un cuadro clínico sugestivo de infección por VCHIK, confirmado mediante prueba molecular. Se obtuvieron sus datos telefónicos y, en el año 2023, se les invitó a participar en un estudio de seguimiento. A los pacientes que aceptaron se les convocó para acudir nuevamente a las instalaciones del mismo hospital, con el fin de realizar una toma de muestra de sangre periférica y aplicar un cuestionario clínico.

7.9 Ensayos basados en digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación

Se realizaron ensayos basados en la digestión selectiva del ADN por endonucleasas de restricción específicas a 27 pacientes previamente confirmados para VCHIK para validar las regiones metiladas como parte de los dos primeros objetivos, y 10 sujetos sanos que no hubieran sido infectados con VCHIK. Brevemente, este ensayo se llevó a cabo digiriendo 100 ng de ADN utilizando el Kit de Análisis de Metilación de

ADN EpiJET (MspI/HpaII, Thermo Scientific). En resumen, la endonucleasa HpaII es una enzima sensible a metilación capaz de digerir las secuencias CCGG, pero solo cuando no está metilada. En contraste, la enzima MspI, que también corta el ADN en los sitios CCGG, no se ve afectada por la metilación del ADN. El análisis de metilación se realizó en promotores y regiones reguladoras (PRKCZ, GH01J086772, MAP2K3-1, MAP2K3-2, GH17J078733, GH05J035861, ZFPM2, GH0XJ068496, GH01J008115, GH22J027789) e islas CpG de regiones específicas (CpG64, CpG152, CpG209, CpG100, CpG46, CpG116, CpG198, CpG79-1, CpG39, CpG33, CpG24, CpG30, CpG22, CpG74, CpG75).

Posteriormente se realizó MS-qPCR utilizando cebadores específicos de estos sitios promotores o islas CpG. En la Tabla Suplementaria 2 (Anexos) se encuentran los primers diseñados para este análisis.

Para el procedimiento, una muestra de ADN se dividió en tres tubos, cada uno fue digerido con una endonucleasa diferente que corta de manera preferencial: (1) ADN metilado; (2) ADN no metilado; y (3) ADN sin digerir. Además, se incluyeron los controles de ADN metilado y no metilado. Se incubaron las muestras durante una hora a 37°C. Las regiones confirmadas se buscaron en la segunda toma (muestras de seguimiento) y en el grupo control, esto para mantener las regiones candidatas para realizar pruebas experimentales. Para la MS-qPCR se empleó el termociclador StepOne Plus (Applied BiosystemsTM Foster City, CA, USA), en formato de placa de 96 pozos. Posteriormente se estimó el nivel de metilación de ADN empleando la fórmula: % de 5-mC = 100/(1+E) Cq2-Cq1.

7.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Prism 10 de GraphPad. Se aplicó la prueba t de Student para comparar los diferentes ensayos de cultivo celular. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para identificar las RDM mediante la comparación de los metilomas entre los distintos grupos (grupo 1 vs grupo 2 y grupo 3 vs grupo 4). Para el análisis de enriquecimiento de vías KEGG, se empleó la prueba exacta de Fisher con el fin de determinar si existe una asociación de los genes RDM con las vías KEGG. Se realizó un análisis descriptivo de la media y mediana

de la edad de los pacientes. Se aplicaron pruebas de ANOVA de dos vías para analizar los ensayos de MS-qPCR en los casos y controles con los diferentes blancos, así como entre los grupos Casos vs Controles vs Seguimiento, y también para los análisis de expresión génica en cultivos celulares.

8. RESULTADOS

8.1 Infección viral en cultivos celulares

En los cultivos de células Vero que tenían una confluencia de 80-90%, fueron infectados con sueros de pacientes positivos a VCHIK o con sobrenadantes de cultivos previamente infectados, las células se expusieron al suero durante una hora y al término de este tiempo se agregó el medio con suero al 2% (esto con la finalidad de que las células se mantuvieran vivas, pero evitar que sigan replicándose) y se deja en incubación habitual (37°C con 5% de CO_2), los días siguientes se realizó observación microscópica para identificar cambios morfológicos en las células que indiquen muerte celular; el ensayo de infección con VCHIK tuvo una duración de tres días (Figura 6). Al término de estos se procedió a levantar todo el cultivo haciendo un raspado de las células con un scraper estéril, se centrifugó y se alicuotaron los sobrenadantes y se almacenaron a –80 °C hasta realizar la titulación viral.

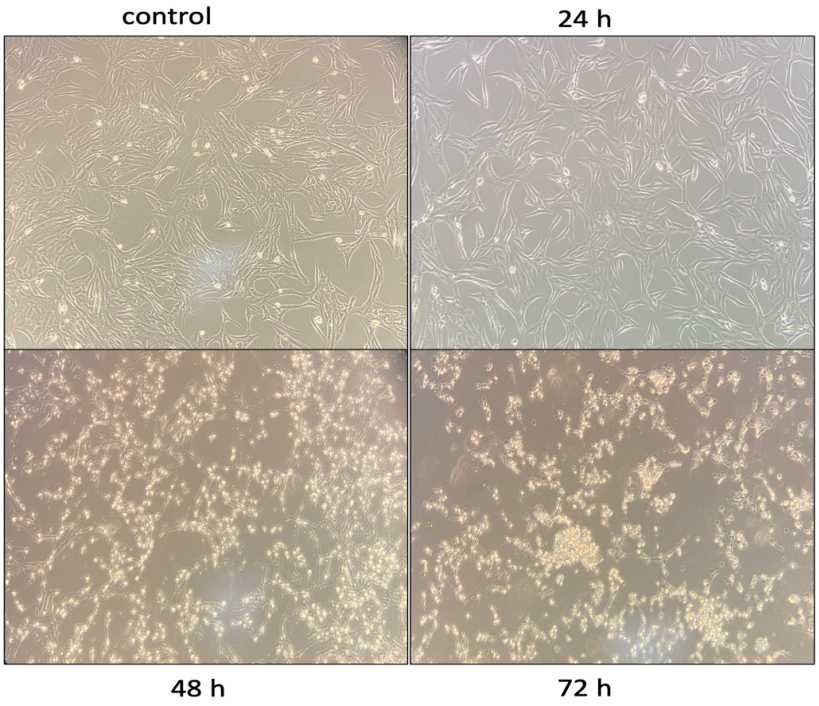


Figura 6. Seguimiento microscópico de cultivos de células Vero post-infección con VCHIK

8.2 Titulación viral mediante el método de formación de placas líticas con virus chikungunya.

La titulación viral por el método de formación de placas líticas es uno de los métodos más precisos para la cuantificación directa de los viriones infecciosos y sustancias antivirales a través del conteo de placas (unidades formadoras de placa (PFU), que corresponden a zonas de lisis celular). Se realizaron diluciones con VCHIK a diferentes concentraciones ($1x10^2$, $1x10^3$, $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$), las células se expusieron al inóculo durante una hora y al término de este tiempo se agregó carboximetilcelulosa y se dejó en incubación por 3-4 días, al término de este tiempo se realizó la tinción con azul de metileno para finalmente hacer el conteo de placas líticas (Figura 7).

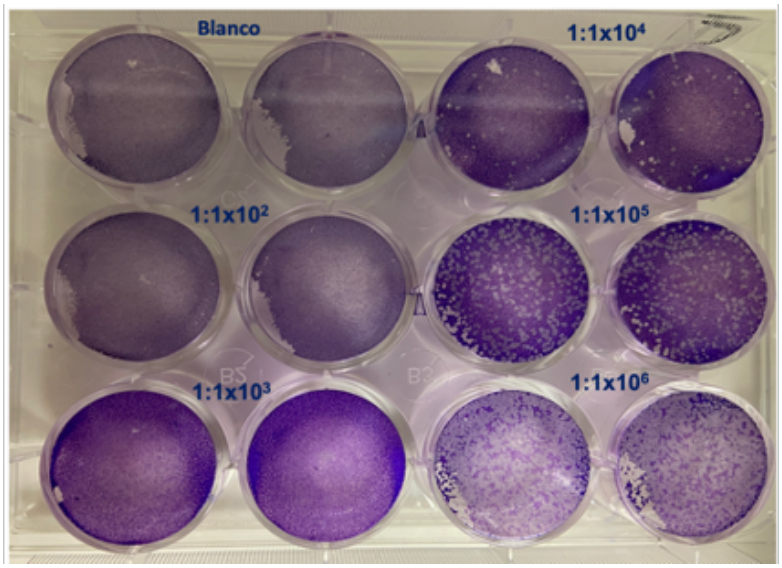


Figura 7. Placa de titulación viral de cultivos infectados con sueros de pacientes

8.3 Realización de ensayos de multiplicidad de infección en cultivo primario de linfocitos a diferentes tiempos

Cuando se terminaron los ensayos de titulación viral, se procedió a realizar ensayos para determinar la concentración viral que se utilizó para los ensayos de expresión de los diferentes mecanismos epigenéticos (metilación, modificación de histonas, etc.).
En este ensayo se sembraron 250 000 células en placas de 12 pozos, las cuales se

utilizarán para realizar ensayos de multiplicidad de infección, a partir de la titulación viral, se emplearon varias concentraciones de MOI (10, 5, 1, 0.1, 0.01 MOI), se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito (infección y titulación viral), Con este ensayo se seleccionó la concentración de 10 y 100 MOI a las 48 horas debido a que se sigue manteniendo la proliferación celular en todas las concentraciones empleadas sin significancia estadística, es decir, que la viabilidad celular a las 48 horas post-infección se mantuvo sin cambios significativos, al término de esto se realizó extracción de RNA total de estos cultivos para posteriormente realizar los ensayos de expresión mediante qPCR (Figura 8).

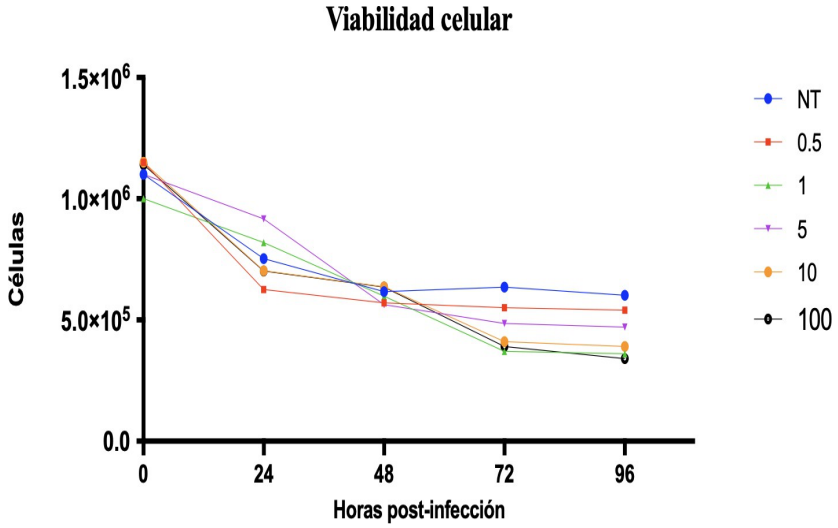


Figura 8. Viabilidad celular de cultivo primario de linfocitos

8.4 Ensayos de expresión de mecanismos epigenéticos

Para los ensayos de expresión de los cuatro mecanismos epigenéticos (metilación, biogénesis de miRNAs, modificaciones de histonas y regulación de cromatina), se diseñaron primers (ver Tabla Suplementaria 1 en ANEXOS) para 57 genes (Tabla 2), se extrajo RNA de los cultivos de sinoviocitos y cultivos primarios de linfocitos humanos post-infección con VCHIK.

Tabla 2. Lista de genes analizados en el ensayo de expresión.

Metilación del ADN	Genes involucrados en la modificación de histonas	Remodelación de cromatina	Biogenesis de miRNA
DNMT1	*PCGF1*	*SMARCA2*	*DROSHA*
DNMT3A	*PCGF2*	*SMARCA1*	*DGCR8*
DNMT3B	*PCGF3*	*SMARCA4*	*DICER1*
DNMT3L	*BMI1*	*ARID1A*	*AGO2*
TET1	*PCGF6*	*ARID2*	*AGO1*
TET2	*RING1*	*BRD7*	*AGO4*
TET3	*RNF2*	*PBRM1*	*TNRC6A*
MeCP2	*EED*	*CHD5*	*XPO5*
MBD1	*suz12*	*CHD7*	*TARBP2*
MBD2	*EZH1*	*CHD4*	*AGO3*
MBD4	*EZH2*	*ARID1B*	*TNRC6C*
MBD3	*KDM6A*	*DPF1*	*TNRC6B*
	EP300	*PHF10*	
	KDM5B	*BPTF*	
	CREBBP	*CHD1*	
	HDAC2	*HDAC1*	
	SIRT1	*HDAC2*	
	KMT2A		
	KMT2D		
	KMT2C		

Los resultados de expresión fueron graficados con el software GraphPad Prism v10, se obtuvieron mapas de calor (Heatmap), de los mecanismos epigenéticos analizados. El Heatmap es una gráfica codificada por colores, en el cual, el color rojo nos indica que hay una sobreexpresión del gen, el color verde nos indica que hay una subexpresión del gen, y el color negro, nos indica una expresión basal del gen.

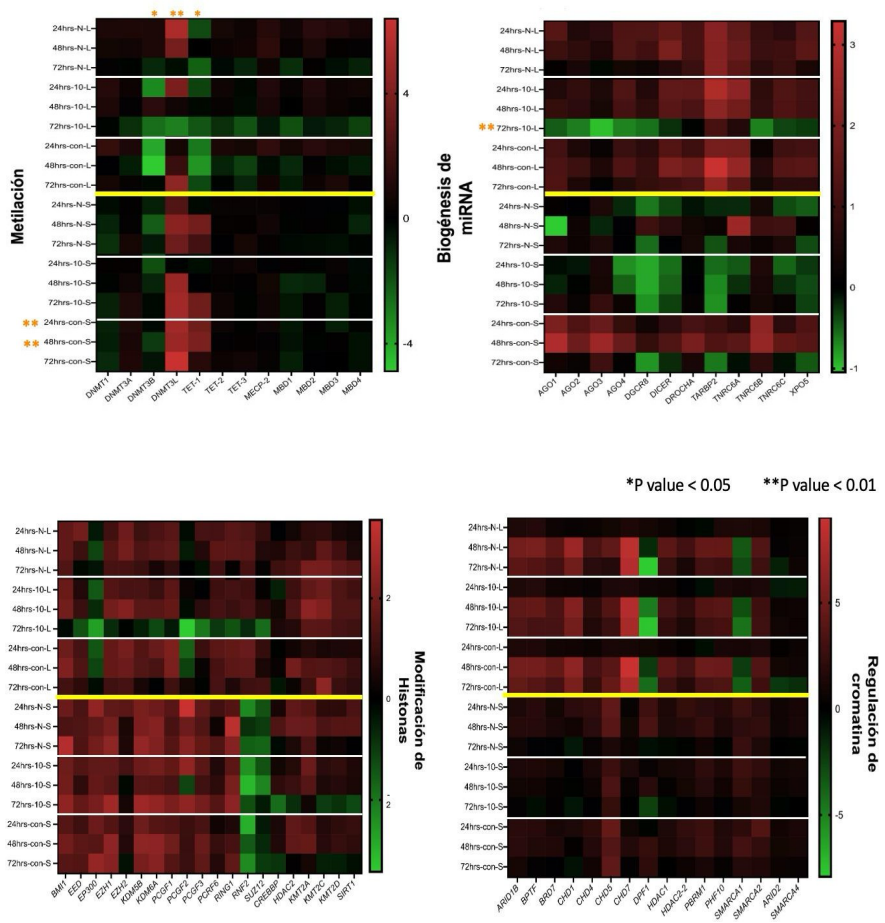


Figura 9. Mapas de calor de procesos epigenéticos en cultivos celulares de sinoviocitos y cultivos primarios de linfocitos humanos infectados con VCHIK.

Los resultados encontrados en los 4 mecanismos epigenéticos analizados (ver figura 9) fueron cambios en la expresión en los genes relacionados en la metilación del ADN a las 72 h post-infección, donde la mayoría de los genes se vieron sobreexpresados, de los cuales se pueden resaltar los genes *DNMT3B* y *DNMT3L* que participan en la metilación *de novo* y la familia de genes *MBD* que juega un papel de represión transcripcional y participan en el silenciamiento génico. En el proceso de biogénesis de miRNA se identificó una expresión activa en la mayoría de los genes, en los cultivos post-infección con VCHIK, al igual que las células no tratadas. Estos datos sugieren que existe una regulación viral que puede involucrar algunos mecanismos que favorezcan el proceso de infección viral lo que refuerza la hipótesis

planteada en la propuesta. En el resto de los mecanismos analizados no se observaron cambios sustanciales en la mayoría de los genes.

8.5 Búsqueda bioinformática de regiones metiladas

Después de realizar el metiloma de muestras de cultivos de sinoviocitos infectados a las 48 y 72 horas se obtuvo un promedio de 15 Gb de bases limpias después de filtrar las lecturas de baja calidad, las lecturas N y las secuencias adaptadoras. A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis bioinformático desde los puntos de control de calidad (QC), así como los datos analizados.

Después del filtrado, las lecturas limpias se alinearon con la secuencia de referencia hg38 usando BSMAP. La tasa de mapeo del genoma corresponde a la tabla 3 y 4.

Tabla 3. Resumen de datos de secuenciación para cada muestra.

Sample ID	Fragment Length(bp)	Sequencing Strategy	Clean Reads Number	Clean Data Size(bp)	Clean Rate(%)
SINO_CHIKV_2	100-500bp	PE100	150,000,002	15,000,000,200	97.54
SINO_CTL_2	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.25
SINO_CHIKV_1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.22
BLOOD_CHIK1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.25
BLOOD_DENV2	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.74
BLOOD_CTL1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.42
BLOOD_CHIK2	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.27
BLOOD_CTL2	100-500bp	PE100	150,000,006	15,000,000,600	97.37
SINO_CTL_1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.72
BLOOD_DENV1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.69

Clean Rate (%) = Clean Data Size (bp)/Raw Data Size (bp)

Tabla 4. Resumen de datos y control de calidad por muestra

Sample ID	Clean Reads	Mapped Reads	Mapping Rate (%)	Uniquely Mapped Reads	Uniquely Mapping Rate (%)	Bisulfite Conversion Rate (%)
SINO_CHIKV_2	150,000,002	134,425,922	89.62	122,893,103	81.93	96.82
SINO_CTL_2	150,000,004	136,137,807	90.76	124,750,158	83.17	96.84
SINO_CHIKV_1	150,000,004	136,262,369	90.84	124,425,343	82.95	96.87
BLOOD_CHIK1	150,000,004	141,969,724	94.65	129,757,035	86.50	97.50
BLOOD_DENV2	150,000,004	137,056,891	91.37	125,024,591	83.35	96.95
BLOOD_CTL1	150,000,004	141,990,291	94.66	129,965,951	86.64	96.87
BLOOD_CHIK2	150,000,004	141,714,562	94.48	129,571,259	86.38	97.32
BLOOD_CTL2	150,000,006	141,900,152	94.60	129,942,181	86.63	96.82
SINO_CTL_1	150,000,004	136,767,538	91.18	124,926,010	83.28	96.74
BLOOD_DENV1	150,000,004	136,011,619	90.67	124,020,434	82.68	97.05

Teóricamente, la distribución de la profundidad de secuenciación indica si la secuenciación está bien proporcionada. Y la profundidad del vértice de la distribución es igual o cercana a la profundidad media de secuenciación de todo el genoma (Figura 10).

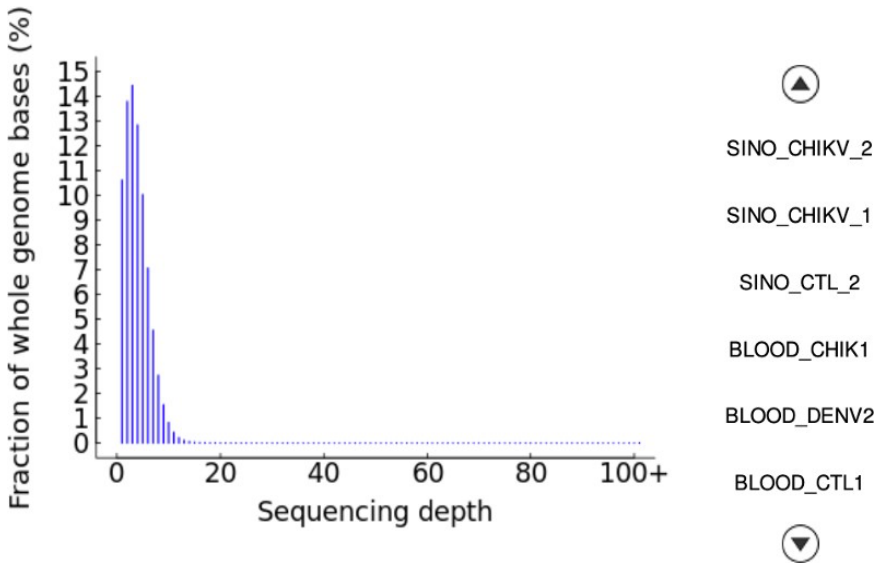


Figura 10. Distribución de la profundidad de secuenciación. Arriba se muestra la distribución principal de la cobertura del genoma que varía con la profundidad de secuenciación. El eje X representa la profundidad de secuenciación, y el eje Y representa el porcentaje de cobertura del genoma a cierta profundidad de secuenciación.

De acuerdo con el contexto de secuencia de la citosina, la citosina en la secuencia de ADN se puede clasificar en tres tipos, CG, CHG y CHH (H = A, G o T). La línea decreciente en la figura 11 revela el rango de profundidad de secuenciación efectiva de la citosina.

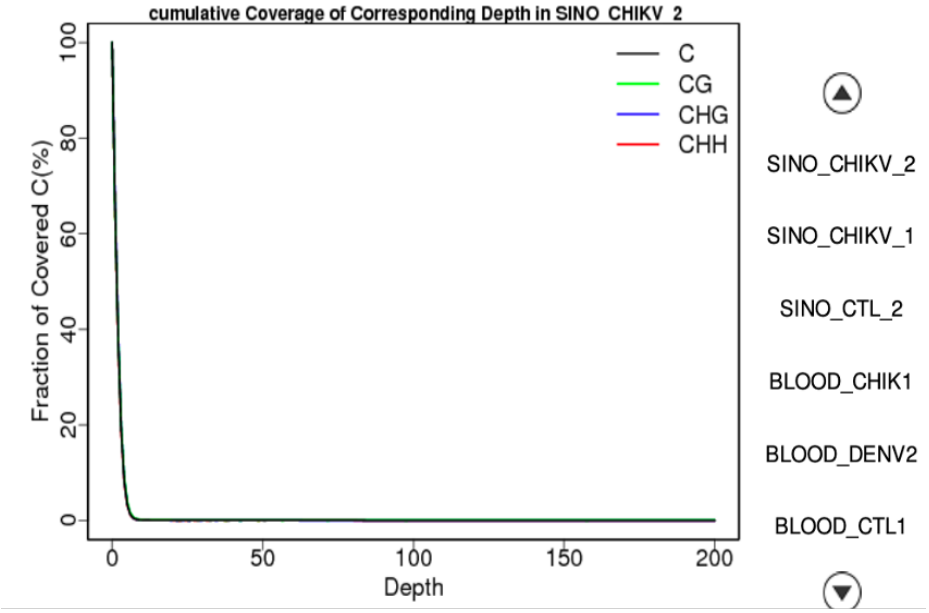


Figura 11. Distribución acumulada de la profundidad de secuenciación efectiva de la citosina. El eje X representa la profundidad de secuenciación efectiva de la base C, mientras que el eje Y representa el porcentaje acumulado de la base C a una cierta profundidad de secuenciación. La línea decreciente en la figura revela el rango de profundidad de secuenciación efectiva de la citosina. H representa una base no G (H = A, T o C).

De acuerdo con la cobertura efectiva del genoma completo en todas las muestras analizadas, se evaluaron los patrones de metilación en distintos cromosomas humanos mediante el porcentaje de citosinas en diferentes contextos (C, CG, CHG y CHH). En conjunto, todas las muestras reflejan una cobertura elevada y consistente, con valores que oscilan en rangos cercanos al 65–78 %, lo que indica una secuenciación robusta y uniforme. Asimismo, se observa que la mayoría de los cromosomas mantienen porcentajes similares entre los distintos contextos de metilación, lo que sugiere una

distribución homogénea de la información epigenética. A continuación, se muestra la Tabla 5 (el resto de los resultados pueden consultarse en el Anexo B).

Tabla 5: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_VCHIK_2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)
NC_000001.11	69.105	70.116	70.836
NC_000002.12	70.668	71.683	72.304
NC_000003.12	70.346	70.833	72.07
NC_000004.12	70.063	70.698	71.833
NC_000005.10	69.383	68.769	70.916
NC_000006.12	68.45	68.559	70.058
NC_000007.14	69.145	69.548	70.81
NC_000008.11	66.28	64.256	67.481
NC_000009.12	66.821	68.332	68.735
NC_000010.11	70.676	71.585	72.524
NC_000011.10	68.978	69.381	70.676
NC_000012.12	69.244	70.105	71.092
NC_000013.11	70.41	70.674	71.978
NC_000014.9	67.284	67.118	68.638
NC_000015.10	64.339	64.416	65.855
NC_000016.10	64.488	65.461	66.096
NC_000017.11	63.225	63.569	64.93
NC_000018.10	67.223	66.312	68.651
NC_000019.10	65.576	67.291	67.658
NC_000020.11	71.078	71.685	72.991

En relación con el análisis de la cobertura efectiva en distintos elementos genómicos, los resultados obtenidos se presentan a continuación para los diferentes contextos de metilación evaluados (C, CG, CHG y CHH). En este apartado se incluyen regiones funcionales como CDS, mRNA, regiones repetitivas e islas CpG, así como zonas regulatorias adyacentes (Up2k y Down2k). En conjunto, los resultados muestran que la cobertura es elevada y relativamente homogénea en la mayoría de los elementos, con valores que oscilan entre el 55 % y el 72 %, lo que refleja tanto la calidad técnica de la secuenciación como la estabilidad de los perfiles epigenéticos. Se observa, además, que las regiones codificantes (CDS y mRNA) tienden a presentar los mayores porcentajes de cobertura, mientras que las islas CpG muestran valores más bajos, lo cual es consistente con su papel regulador y su particular dinámica

epigenética. A continuación, se muestra la Tabla 6 (el resto de los resultados pueden consultarse en el Anexo C).

Tabla 6. Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_VCHIK_2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	63.462	64.479	63.898	63.055
Down2k	60.965	60.224	62.169	60.644
Up2k	60.093	60.257	61.532	59.574
mRNA	66.495	66.343	67.719	66.14
repeat	63.568	64.617	65.015	63.07
CpGIsland	55.222	56.198	56.465	54.036

Cobertura efectiva de cada tipo de elemento, y la cobertura podría variar continuamente desde el 0% hasta el 100% y H representa una base no-G (H = A, T o C). El control de calidad de los datos de secuenciación se evaluó mediante diversos parámetros en todas las muestras analizadas (Tabla 7). En promedio, se obtuvieron 15 Gb de datos limpios por muestra, con una tasa de bases Q20 superior al 93% en todos los casos, lo que indica una alta precisión en la llamada de bases. El porcentaje de alineamiento con el genoma de referencia (hg38) fue superior al 89% en todas las muestras, alcanzando valores cercanos al 94% en las muestras de sangre, lo que refleja una buena calidad de mapeo. La tasa de conversión por bisulfito se mantuvo por encima del 96.7% en todas las muestras, cumpliendo con los estándares requeridos para estudios de metilación. El porcentaje de duplicación fue bajo en todos los casos (1.8%–10.5%), lo que indica una baja redundancia en la librería. La profundidad media de secuenciación osciló entre 3.3X y 3.9X, con una cobertura del genoma que alcanzó entre el 78.6% y el 81.5%, valores considerados adecuados para el análisis global de metilación. En conjunto, estos indicadores confirman que todas las muestras cumplen con los criterios de calidad establecidos.

Tabla 7. Elementos de control de calidad para cada muestra

Sample ID	Clean Reads Q20 Rate (%)	Clean Data Size (bp)	Mapping Rate (%)	Bisulfite Conversion Rate (%)	Duplication Rate (%)	Average Depth (X)	Coverage (%)
SINO_CHIKV_2	93.89;97.29(Pass)	15,000,000,200.00	89.62(Pass)	96.82	10.48(Pass)	3.29	79.438
SINO_CHIKV_1	93.69;97.06(Pass)	15,000,000,400.00	90.84(Pass)	96.87	7.84(Pass)	3.47	80.107
SINO_CTL_2	93.37;97.25(Pass)	15,000,000,400.00	90.76(Pass)	96.84	8.71(Pass)	3.43	80.092
BLOOD_CHIK1	93.91;96.96(Pass)	15,000,000,400.00	94.65(Pass)	97.5	4.41(Pass)	3.79	81.072
BLOOD_DENV2	94.25;97.42(Pass)	15,000,000,400.00	91.37(Pass)	96.95	6.13(Pass)	3.58	79.63
BLOOD_CTL1	93.60;97.32(Pass)	15,000,000,400.00	94.66(Pass)	96.87	2.22(Pass)	3.9	81.461
BLOOD_CHIK2	93.94;97.03(Pass)	15,000,000,400.00	94.48(Pass)	97.32	3.13(Pass)	3.84	81.037
BLOOD_CTL2	93.81;97.10(Pass)	15,000,000,600.00	94.60(Pass)	96.82	1.83(Pass)	3.91	81.46
SINO_CTL_1	94.08;97.40(Pass)	15,000,000,400.00	91.18(Pass)	96.74	7.15(Pass)	3.48	79.862
BLOOD_DENV1	94.37;97.38(Pass)	15,000,000,400.00	90.67(Pass)	97.05	7.32(Pass)	3.51	78.613

En relación con el análisis de metilación por cromosoma**,** se determinó el nivel promedio de citosinas metiladas en la muestra analizada, desglosado en los contextos epigenéticos C, CG, CHG y CHH. Los resultados muestran que la metilación en contexto CG es la más abundante, con valores superiores al 70% en prácticamente todos los cromosomas. En contraste, los niveles de metilación en los contextos CHG y CHH son considerablemente más bajos, cercanos al 1%. El porcentaje global de citosinas metiladas (C %) se mantiene alrededor del 4%, con una distribución estable entre los distintos cromosomas. Tabla 8 (el resto de los resultados pueden consultarse en el Anexo D).

Tabla 8. Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_VCHIK_2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.918	66.587	3.444	3.587
NC_000002.12	6.867	68.259	3.441	3.507
NC_000003.12	6.602	67.393	3.437	3.527
NC_000004.12	6.637	64.24	3.509	3.598
NC_000005.10	6.564	63.56	3.423	3.533
NC_000006.12	6.852	68.38	3.455	3.521
NC_000007.14	7.164	67.556	3.45	3.516
NC_000008.11	6.606	65.352	3.413	3.521
NC_000009.12	7.238	68.626	3.434	3.519
NC_000010.11	7.345	67.161	3.456	3.521
NC_000011.10	6.93	67.172	3.407	3.516
NC_000012.12	7.121	69.008	3.437	3.505
NC_000013.11	6.863	64.371	3.416	3.548
NC_000014.9	6.921	67.06	3.441	3.513
NC_000015.10	7.234	69.788	3.462	3.496
NC_000016.10	9.775	58.098	3.46	3.704
NC_000017.11	8.445	69.541	3.442	3.502
NC_000018.10	6.893	65.931	3.416	3.547
NC_000019.10	9.255	69.415	3.459	3.468
NC_000020.11	7.4	65.72	3.433	3.55
NC_000021.9	7.104	62.79	3.413	3.481
NC_000022.11	8.538	69.291	3.444	3.472

En cuanto al perfil de metilación en distintos elementos genómicos, se observó que las regiones codificantes (CDS) y las secuencias repetitivas presentan los niveles más altos de metilación, especialmente en contexto CG (alrededor del 80 %), mientras que las islas CpG exhiben los porcentajes más bajos, con valores de CG cercanos al 63 % y de CHH por debajo del 9 %. Las regiones adyacentes a genes (Down2k y Up2k) mostraron niveles intermedios, y en todos los elementos la metilación en contextos no-CG (CHG y CHH) fue notablemente inferior a la observada en contexto CG. Tabla 9 (el resto de los resultados pueden consultarse en el Anexo E).

Tabla 9. Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_VCHIK_2.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.038	53.83	4.603	5.487
Down2k	8.29	70.927	3.451	3.465
Up2k	8	48.854	3.435	3.472
mRNA	7.663	72.909	3.44	3.491
repeat	7.772	72.836	3.518	3.543
CpGIsland	16.758	50.367	3.65	3.783

8.6 Proporción en la citosina metilada (mCG, mCHG y mCHH)

En relación con la proporción de los distintos tipos de citosina metilada en el genoma completo, en todas las muestras analizadas, la metilación en contexto CG (mCG) fue la más abundante, representando entre el 73 % y el 84 % del total de citosinas metiladas. Le siguieron los contextos CHH (mCHH), con proporciones que oscilaron entre el 12 % y el 20 %, mientras que la metilación en contexto CHG (mCHG) fue la menos frecuente, con valores entre el 3 % y el 6 %. Este patrón es consistente con lo reportado para células somáticas humanas, donde la metilación CpG constituye el mecanismo epigenético dominante.

Al comparar los grupos experimentales, se observó que las muestras de sangre (BLOOD_CTL y BLOOD_CHIK) presentaron proporciones de mCG ligeramente superiores (≈80 %) a las de sinoviocitos (≈75–77 %), lo que sugiere diferencias

basales en el perfil epigenético entre ambos tipos celulares. Dentro de cada tipo celular, la infección por VCHIK se asoció con un incremento en la proporción de mCG, particularmente en sangre, donde el grupo BLOOD_CHIK alcanzó el valor más alto (83.6 %). En los contextos no-CG, las diferencias fueron más sutiles: los sinoviocitos mostraron valores de mCHG ligeramente superiores a los de sangre, mientras que en mCHH ocurrió lo contrario, con proporciones más altas en sinoviocitos figura 12 (Tabla Suplementaria 40, ANEXOS E). La identificación de la citosina metilada se realizó de acuerdo con el método y el algoritmo de corrección de Lister et al. (2005).

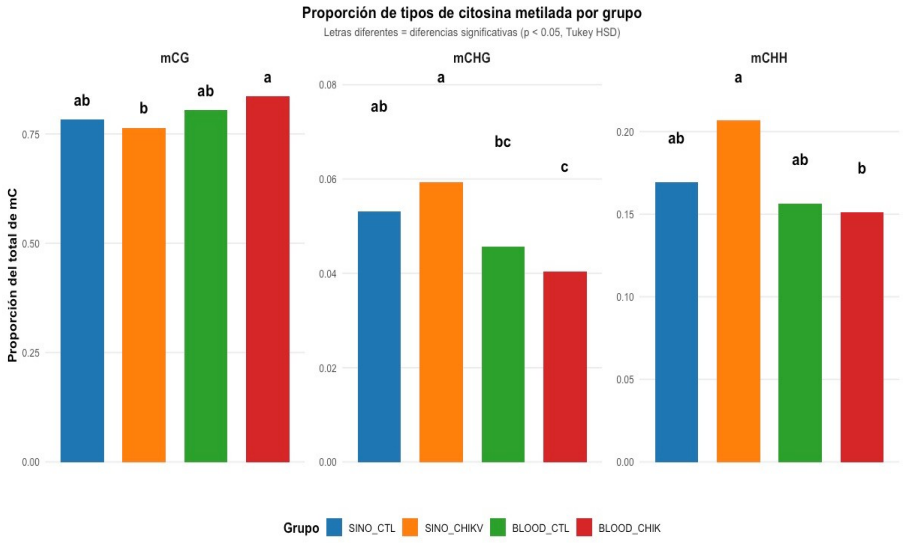


Figura 12. Proporción de tipos de citosina metilada por grupo experimental. La gráfica muestra la proporción promedio de citosinas metiladas en los contextos mCG, mCHG y mCHH en cuatro grupos experimentales: sinoviocitos control (SINO_CTL), sinoviocitos infectados con VCHIK (SINO_VCHIK), muestras de sangre control (BLOOD_CTL) y muestras de sangre de pacientes con infección por VCHIK (BLOOD_CHIK). Cada barra representa la proporción relativa de metilación en cada contexto respecto al total de citosinas metiladas detectadas en el genoma. En general, el contexto mCG presenta la mayor proporción de metilación en todos los grupos, seguido por mCHH y mCHG. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas entre grupos, determinadas mediante ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$), donde letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos dentro de cada tipo de metilación.

8.7 Distribución de niveles de metilación

El estado de metilación de CG, CHG y CHH difiere entre especies, e incluso varía

con diferentes condiciones relacionadas con el tiempo, el espacio y la fisiología dentro de un solo organismo. La figura 13 muestra el porcentaje de citosina metilada según el nivel de metilación en la muestra control de sinoviocitos (SINO_CTL). Se observa que los contextos CG, CHG y CHH se concentran principalmente en niveles bajos (10–30 %), con un 85 % de sitios en el nivel 10 %. En contraste, las citosinas metiladas (mC, mCG, mCHG y mCHH) se desplazan hacia niveles intermedios y altos: mCG alcanza su máxima abundancia en el 100 % (51 %), mientras que mCHG y mCHH predominan en niveles del 50–60 % (hasta 39 %). Este perfil refleja el patrón epigenético basal de los sinoviocitos. Las otras figuras se muestran en el ANEXO E.

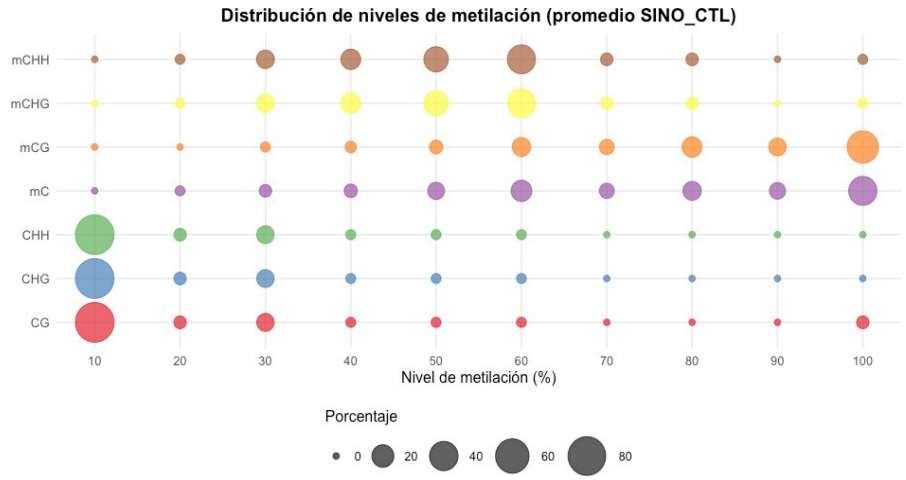


Figura 13. Distribución del nivel de metilación de mC en cada contexto de secuencia. Solo se utilizaron los mC cubiertos por al menos cuatro lecturas para calcular el nivel de metilación.

8.8 Paisaje genómico de metilación

La variación de los porcentajes de metilación en diferentes regiones genómicas (CDS, islas CpG, regiones upstream y downstream, mRNA y secuencias repetitivas) entre los grupos experimentales analizados (blood_CHIK, blood_CTL, blood_DENV, SINO_CHIK y SINO_CTL). Los datos se presentan diferenciados por contexto de metilación (CG, CHG y CHH), lo que permite comparar la contribución relativa de cada tipo de citosina metilada en cada condición (Figura 14).

Para evaluar diferencias entre grupos se aplicó la prueba estadística de Wilcoxon, la cual no mostró diferencias significativas. No obstante, la distribución gráfica permite identificar tendencias relevantes: en las regiones codificantes (CDS) y en mRNA, el contexto CG mantiene porcentajes consistentemente más altos en todos los grupos, confirmando su predominancia en la regulación génica. En contraste, las islas CpG presentan porcentajes más bajos de metilación, especialmente en el contexto CHH, lo que coincide con su papel regulador. Por otro lado, las secuencias repetitivas muestran porcentajes elevados de metilación, reflejando la función de silenciamiento epigenético en estas regiones.

En conjunto, aunque las pruebas estadísticas no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, la visualización revela patrones y tendencias epigenéticas que sugieren variaciones contextuales en la distribución de la metilación, particularmente en los grupos infectados, donde se observan ligeros cambios en la contribución de CHG y CHH respecto a los controles. (Tablas en ANEXO F)

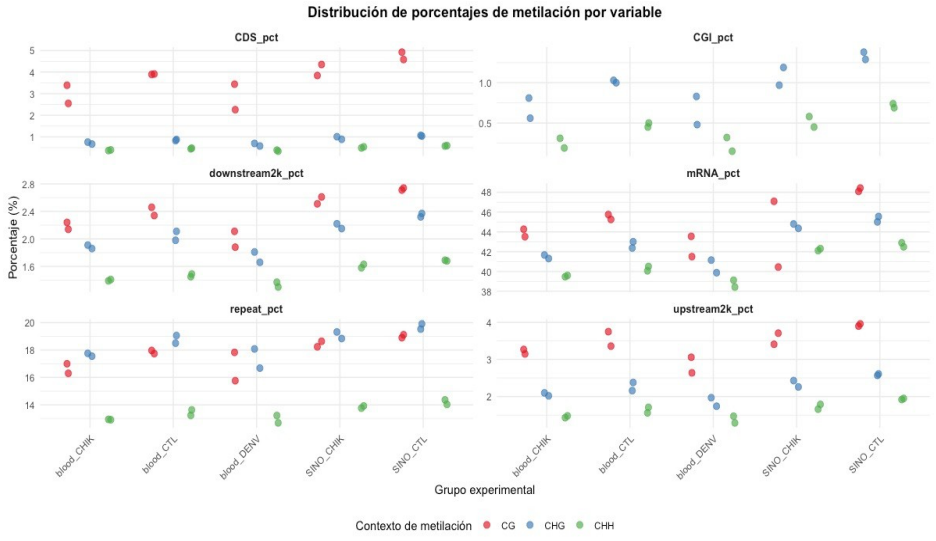


Figura 14. Distribución de porcentajes de metilación por variable en diferentes regiones genómicas (CDS, islas CpG, regiones upstream y downstream, mRNA y secuencias repetitivas) entre los grupos experimentales analizados (blood_CHIK, blood_CTL, blood_DENV, SINO_CHIK y SINO_CTL). El eje de las X corresponde a los grupos experimentales y el eje de las Y al porcentaje de metilación. Los datos se muestran diferenciados por contexto de metilación (CG, CHG y CHH).

8.9 Regiones diferencialmente metiladas (RDM)

Las RDM son extensiones de ADN en el genoma de una muestra que tienen diferentes patrones de metilación de ADN en comparación con otras muestras, para revelar el papel potencial de la metilación en respuesta a la infección por VCHIK, analizamos la RDM de células de sinoviocitos infectados en comparación con células de sinoviocitos no infectados, de igual manera, células de linfocitos infectados vs células de linfocitos no infectados. Se utilizó un enfoque de ventana deslizante para identificar las RDM que contenían al menos cinco sitios CG (CHH o CHG) y los niveles de metilación de las dos muestras diferían. En total, se identificaron 1,457 RDM entre de sinoviocitos infectados con VCHIK en comparación con los sinoviocitos no infectados, y 1,016 RDM entre células de linfocitos infectados vs células de linfocitos no infectados (Figura 15). En contexto de mCG, mCHG y mCHH, se identificaron 362, 79 y 1,016 RDM, respectivamente (Tabla 10). Mientras que, en relación a linfocitos infectados con VCHIK en comparación con los linfocitos no infectados, se identificaron 1,026 RDM y hubo 285, 37 y 704 RDM en contexto de mCG, mCHG y mCHH, respectivamente. Tabla 11

También se realizó un análisis de longitud de RDM para cada cromosoma (Tabla 10 y 11) encontramos que la longitud variaba entre los 22 cromosomas. Al evaluar los patrones más largos de mCG, mCHG y mCHH, se encontró que para los sinoviocitos el cromosoma 1 presentó los mayores valores, mientras que en linfocitos los patrones mCG y mCHH más largos correspondieron al cromosoma 1 y el mCHG al cromosoma 2. Estos resultados pueden estar relacionados con el número de genes, transposones y la aparición de otros elementos dentro de cada cromosoma.

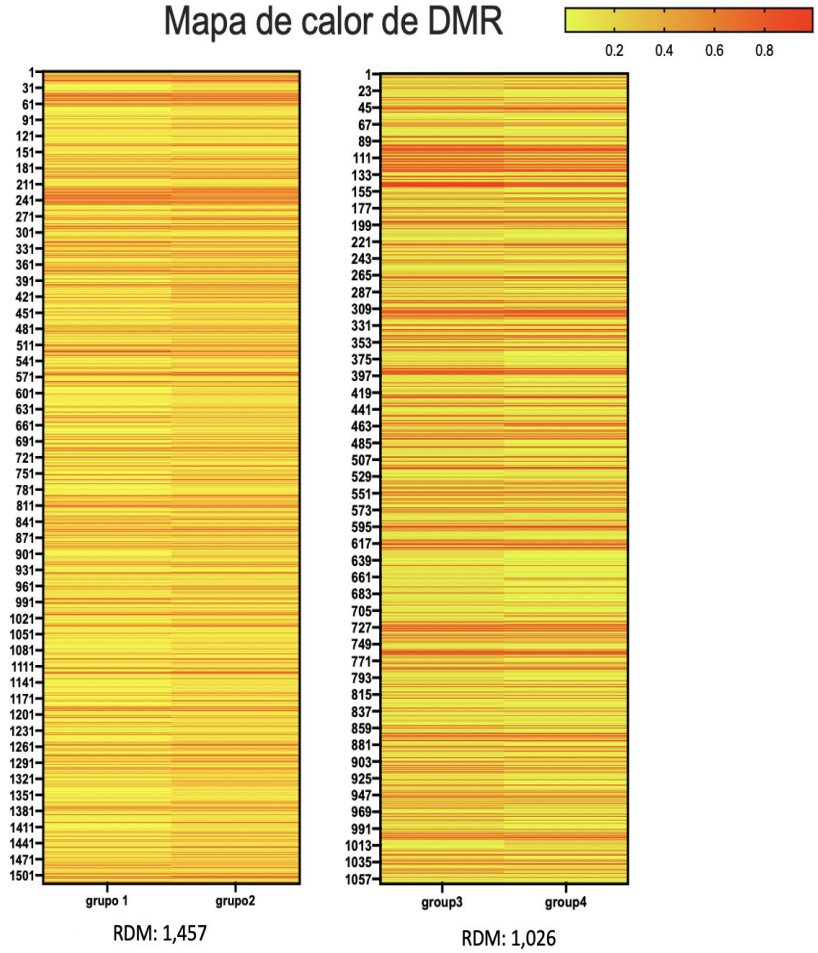


Figura 15. Mapas de calor que representan las RDM identificadas en cada uno de los grupos analizados.

Tabla 10. Identificación de RDM y análisis de grupo 1 vs grupo 2

Cromosoma	mCG		mCHG		mCHH	
	Numero de RDM	Tamaño de RDM	Numero de RDM	Tamaño de RDM	Numero de RDM	Tamaño de RDM
CHR1	98	11987	17	2238	185	11250
CHR2	31	4452	3	147	68	3238
CHR3	9	755	2	204	44	2070
CHR4	15	1963	0	0	44	1689
CHR5	8	452	2	151	37	2126
CHR6	14	1339	4	250	40	2585
CHR7	4	708	2	121	44	2176
CHR8	7	1077	0	0	35	1501
CHR9	9	959	4	598	38	2009
CHR10	21	2759	3	157	41	2120
CHR11	14	2602	0	0	33	2248
CHR12	9	2190	1	159	41	2717
CHR13	23	4853	3	583	53	2493
CHR14	4	192	0	0	15	937
CHR15	12	1714	5	414	40	2681
CHR16	10	1116	4	483	37	1743
CHR17	11	863	3	404	26	1681
CHR18	8	2741	1	111	40	1500
CHR19	7	387	7	777	29	1823
CHR20	17	3040	7	544	40	1860
CHR21	26	3551	6	462	56	2844
CHR22	5	744	5	464	30	2134
TOTAL	362	50444	79	8267	1016	55425

Tabla 11. Identificación de RDM y análisis de grupo 3 vs grupo 4

Cromosoma	mCG		mCHG		mCHH	
	Numero de RDM	Tamaño de RDM	Numero de RDM	Tamaño de RDM	Numero de RDM	Tamaño de RDM
CHR1	65	13520	8	998	112	5367
CHR2	20	4471	9	1169	55	2742
CHR3	22	2657	0	0	24	1593
CHR4	13	2024	3	705	36	1590
CHR5	4	287	0	0	36	1583
CHR6	12	2320	1	41	30	1618
CHR7	9	1138	2	274	27	1506
CHR8	9	1884	0	0	21	601
CHR9	19	2563	4	525	38	1727
CHR10	12	2130	0	0	33	1476
CHR11	5	328	0	0	25	1272
CHR12	8	2395	1	72	27	935
CHR13	28	5783	2	182	45	2956
CHR14	1	26	0	0	12	348
CHR15	14	3185	1	49	28	1251
CHR16	3	717	1	320	17	736
CHR17	7	586	0	0	8	470
CHR18	9	2491	2	172	27	1253
CHR19	7	813	0	0	12	1005
CHR20	9	2192	1	39	42	3416
CHR21	6	658	0	0	33	1060
CHR22	3	863	2	213	16	775
TOTAL	285	53031	37	4759	704	35280

8.10 Genes diferencialmente metilados (GDM) y análisis funcional

Con relación a la comparación entre el grupo 1 vs grupo 2, se identificaron 472 genes diferencialmente metilados (GDM) ubicados en RDM. Para investigar las funciones biológicas de los GDM, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, https://www.genome.jp/kegg/) y Reactome Pathway Database (https://reactome.org/), WikiPathways (https://www.wikipathways.org/). Como se muestra en la tabla suplementaria 44. Los GDM se asignaron a algunas vías como Ciclo GTPasa CDC42, Señalización por Rho GTPasas, ciclo de la GTPasa RAC2, entre otros, que pueden estar estrechamente involucradas en respuesta a infección viral. Figura 16.

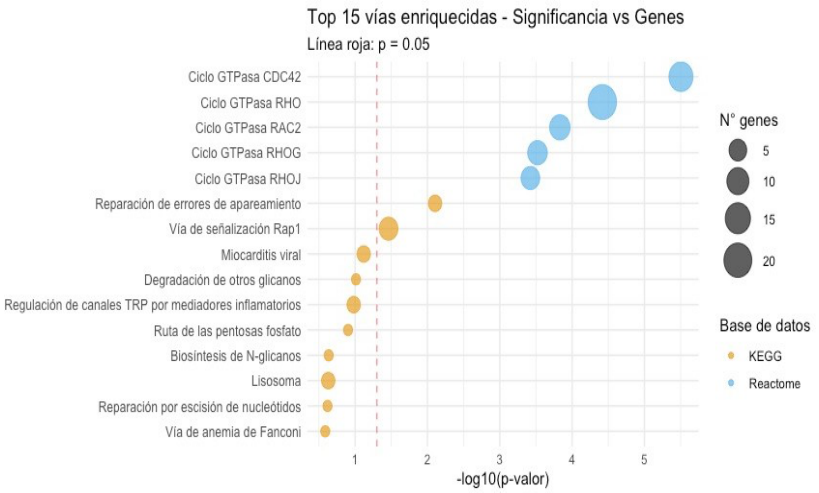


Figura 16. Dotplot de las 15 vías más significativas enriquecidas en genes diferencialmente metilados para el grupo1 vs grupo2. Los puntos representan vías biológicas, ordenadas en el eje Y por su nivel de significancia (las más significativas arriba). El eje X muestra -log10(p-valor), donde valores mayores indican mayor significancia estadística; la línea roja punteada marca el umbral de p = 0.05. El tamaño de cada punto es proporcional al número de genes en la vía, y el color indica la base de datos de origen (naranja = KEGG, azul = Reactome).

Con respecto a la comparativa entre el grupo 3 vs grupo 4, se identificaron 324 genes diferencialmente metilados (GDM) ubicados en RDM. Para investigar las

funciones biológicas de los GDM, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, https://www.genome.jp/kegg/) y Reactome Pathway Database (https://reactome.org/), WikiPathways (https://www.wikipathways.org/). Como se muestra en la tabla suplementaria 45. Los GDM se asignaron a algunas vías como Señalización por GTPasas Rho, Vía GTPasa CDC42, entre otros, que pueden estar estrechamente involucradas en respuesta a infección viral. Ver figura 17.

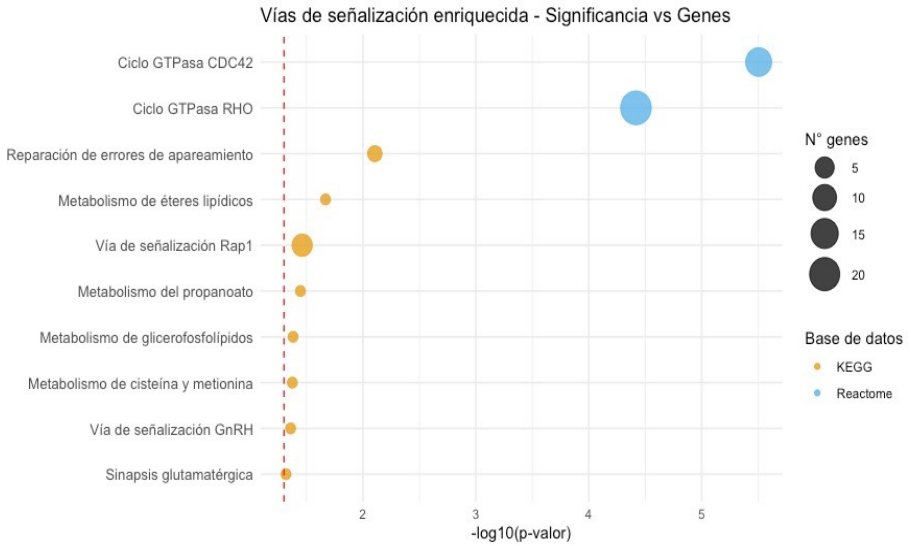


Figura 17. Dotplot de las vías de señalización enriquecidas en genes diferencialmente metilados para el grupo3 vs grupo4. El eje X muestra -log10(p-valor), donde valores mayores indican mayor significancia estadística; la línea roja punteada marca el umbral de p = 0.05. El tamaño de cada punto es proporcional al número de genes en la vía, y el color indica la base de datos de origen (naranja = KEGG, azul = Reactome).

8.11 Paisaje de metilación diferencial en elementos reguladores

El análisis del paisaje genómico de metilación diferencial entre el grupo 1 vs grupo 2 (Figura 18) y grupo 3 vs grupo 4 (Figura 19) reveló una distribución amplia DMRs a lo largo de prácticamente todos los cromosomas. La visualización circular permitió identificar la localización genómica de estas DMRs en diferentes clases de elementos reguladores, incluyendo circRNA, piRNA, elementos reguladores clásicos

(promotores y potenciadores), lncRNA, islas CpG y sitios de unión a CTCF.

En general, se observó una mayor abundancia relativa de eventos de hipometilación (puntos azules) en comparación con eventos de hipermetilación (puntos rojos), lo que sugiere una tendencia global hacia la pérdida de metilación en el grupo comparado. Estas alteraciones epigenéticas se distribuyen a lo largo de múltiples cromosomas, aunque ciertos cromosomas muestran una mayor concentración de DMRs, lo que podría indicar regiones genómicas particularmente susceptibles a cambios epigenéticos.

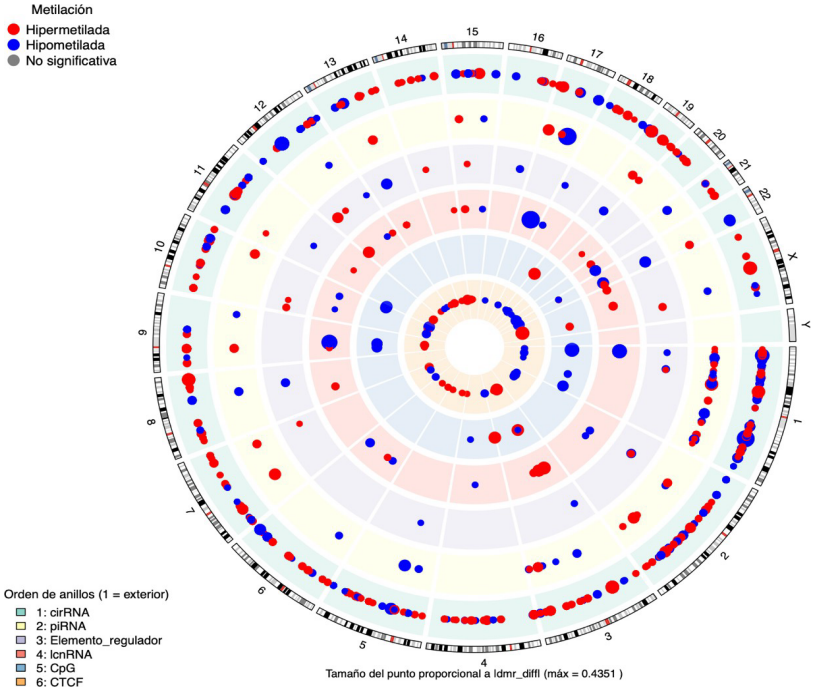


Figura 18. Paisaje de metilación diferencial en regiones reguladoras entre grupo 1 y grupo 2. Representa una distribución de regiones diferencialmente metiladas (DMRs) en distintos tipos de elementos reguladores. Los cromosomas se muestran en el anillo externo. Los anillos internos representan diferentes clases de regiones regulatorias en las que se detectaron DMRs: (1) circRNA, (2) piRNA, (3) elementos reguladores, (4) lncRNA, (5) islas CpG y (6) sitios de unión a CTCF. Cada punto corresponde a una región diferencialmente metilada. El color indica la dirección del cambio epigenético: rojo, hipermetilación; azul, hipometilación; gris, cambios no significativos. El tamaño del punto es proporcional a la magnitud absoluta del cambio de metilación (|Δmetilación|), con un valor máximo observado de 0.3576.

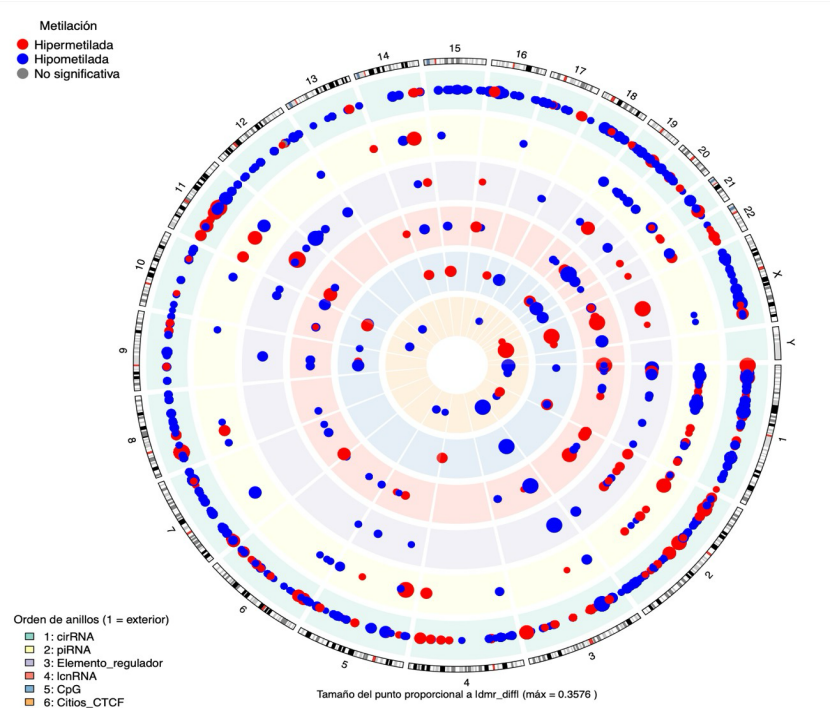


Figura 19. Paisaje de metilación diferencial en regiones reguladoras entre grupo 3 y grupo 4. Representa una distribución de regiones diferencialmente metiladas (DMRs) en distintos tipos de elementos reguladores. Los cromosomas se muestran en el anillo externo. Los anillos internos representan diferentes clases de regiones regulatorias en las que se detectaron DMRs: (1) circRNA, (2) piRNA, (3) elementos reguladores, (4) lncRNA, (5) islas CpG y (6) sitios de unión a CTCF. Cada punto corresponde a una región diferencialmente metilada. El color indica la dirección del cambio epigenético: rojo, hipermetilación; azul, hipometilación; gris, cambios no significativos. El tamaño del punto es proporcional a la magnitud absoluta del cambio de metilación (|Δmetilación|), con un valor máximo observado de 0.4351.

De igual manera se buscaron diversos elementos regulatorios dentro de las RDM, estos abarcan promotores y potenciadores (enhancers), Sitios CTCF, islas CpG, CircRNA, piwiRNA, lcnRNA, los cuales juegan un papel clave en la expresión transcripcional. De esta manera se analizó estas regiones ubicadas dentro de las RDM, entre el grupo 1 vs grupo 2 se identificaron 47 elementos reguladores, 183 sitios CTCF, 23 Islas CpG, 5,170 circRNA, 51 piRNA, 66 lcnRNA. Para las RDM entre los grupos 3 vs grupo 4 se identificaron 23 elementos reguladores, 21 sitios CTCF, 20 Islas CpG, 3,771 circRNA, 39 piRNA, 47 lcnRNA. Resumen en Figura 20. (Tabla Suplementaria 46-57, ANEXOS).

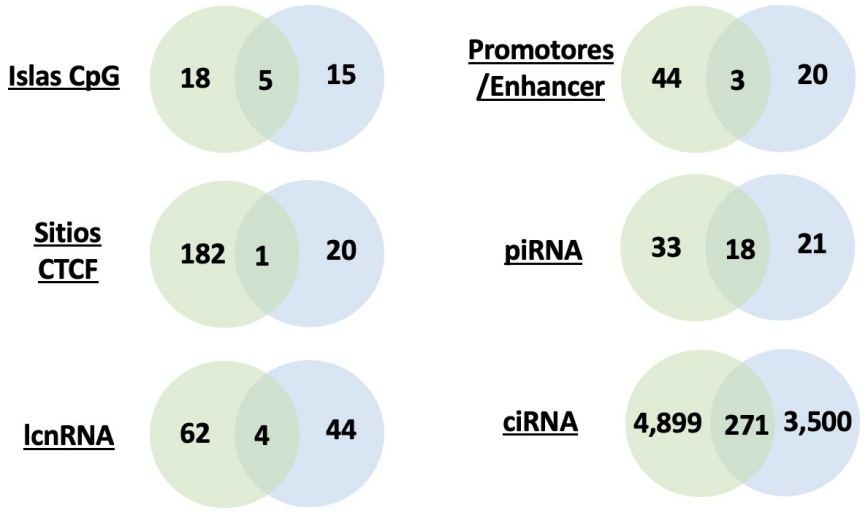


Figura 20. Comparativa de elementos reguladores entre Sinoviocitos y Linfocitos. Las filas corresponden a las categorías en sinoviocitos y las columnas a las categorías en linfocitos. Cada celda indica el número de elementos que pertenecen a la categoría de la fila en sinoviocitos y a la categoría de la columna en linfocitos. Los valores diagonales representan elementos que conservan la misma categoría en ambos tipos celulares, mientras que los valores fuera de la diagonal muestran cambios de clasificación entre sinoviocitos y linfocitos.

8.12 Selección de regiones candidatas

El análisis inicial del metiloma permitió identificar regiones diferencialmente metiladas en dos tipos celulares relevantes: sinoviocitos, con 1,457 RDM, y linfocitos, con 1,026 RDM. A partir de estas regiones, se realizó un filtrado enfocado

en elementos regulatorios funcionales del genoma, incluyendo islas CpG localizadas en promotores génicos, regiones promotoras/enhancer, sitios de unión para CTCF y regiones asociadas a ncRNAs, lo que redujo el conjunto a 52 regiones de interés.

Posteriormente, se aplicó un segundo criterio de selección basado en la relevancia biológica, priorizando regiones asociadas a genes involucrados en la respuesta inmunológica y procesos inflamatorios, lo que resultó en 32 regiones candidatas.

Finalmente, se evaluó la factibilidad técnica para su análisis mediante enzimas de restricción sensibles a metilación. De estas regiones, 25 presentaron sitios de restricción adecuados para el diseño del ensayo, mientras que 7 regiones fueron descartadas debido a la ausencia de sitios específicos que permitieran su evaluación mediante este enfoque enzimático (Figura 21).

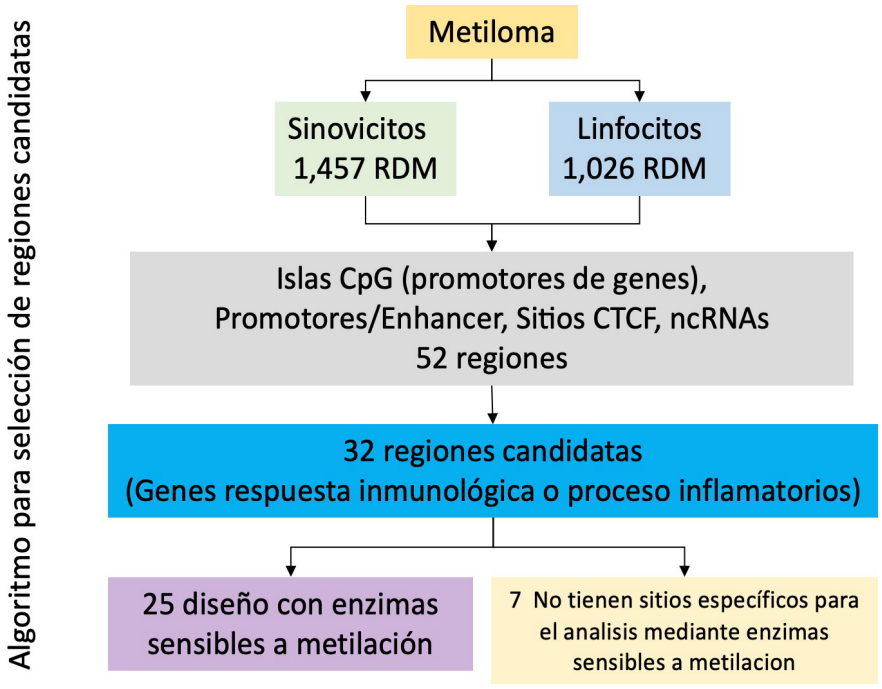


Figura 21: El flujo de selección de regiones candidatas diferencialmente metiladas (RDM) para su análisis posterior mediante enzimas sensibles a la metilación.

8.13 Características de la población de estudio y selección de muestras

De una cohorte de 193 pacientes con cuadro clínico sugerente de infección por VCHIK y confirmados mediante prueba molecular, cuyas muestras fueron recolectadas durante el periodo de marzo a junio de 2015, se seleccionaron 30 muestras de manera aleatoria para la realización de los ensayos de MS-qPCR.

La edad media de presentación fue de 40 años, la mediana de 42 años y el rango fue de 7 a 74 años. El 31.6% (61) de los pacientes fue de género masculino, mientras que el 68.4%

(132) fue femenino.

Las manifestaciones clínicas que se presentaron en los pacientes se describen a continuación: La manifestación clínica más frecuente fue fiebre (99.5%), seguida de cefalea (92.75%), escalofríos (91.7%); exantema, alteración del gusto, prurito, náuseas y artralgias se presentaron en más del 50% de los casos. (Figura 22).

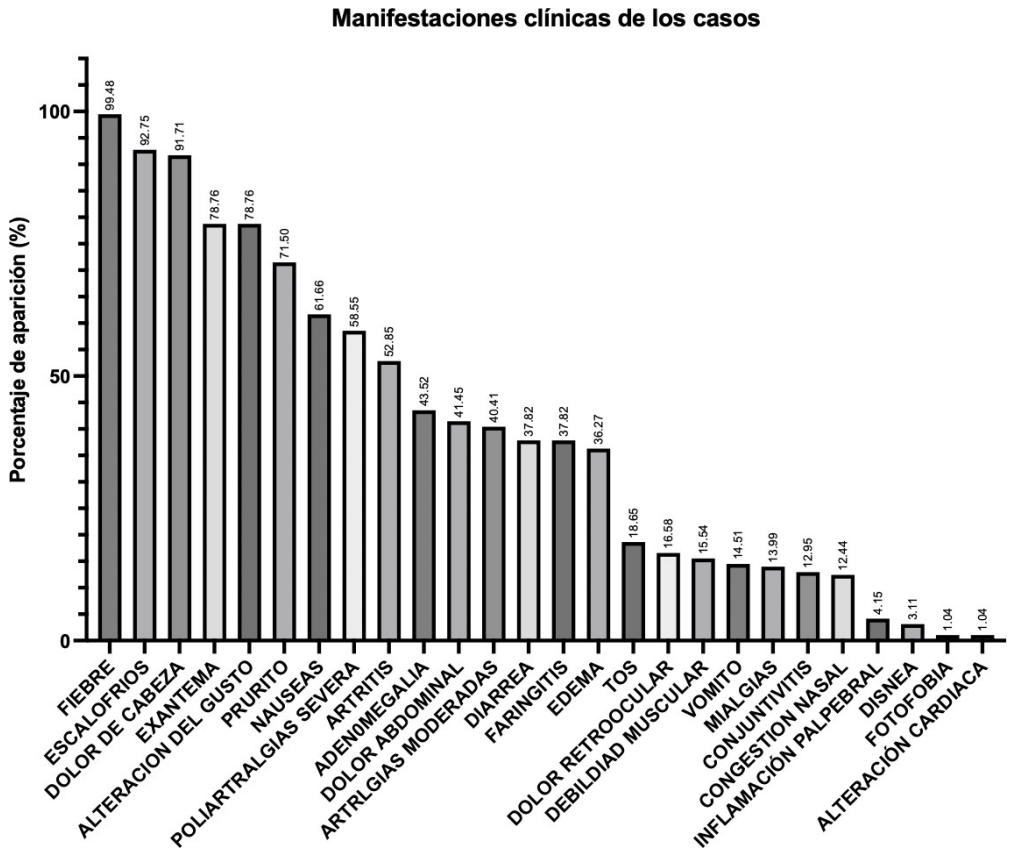


Figura 22. Manifestaciones clínicas de los casos. Tapachula Chiapas, México, mar-jun 2015.

Con el fin de establecer un grupo de referencia para el análisis de metilación, se incluyeron 10 individuos control que no presentaban antecedentes de exposición al virus. Los perfiles de metilación obtenidos en este grupo se utilizaron como base comparativa frente a las muestras analizadas mediante MS-qPCR en las regiones CpG candidatas.

8.14 Análisis comparativo de metilación en casos y controles

En el análisis comparativo de los niveles de metilación entre los grupos de estudio se observaron patrones diferenciados según el conjunto de marcadores evaluados. En el primer bloque de análisis, varios sitios CpG y genes mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, destacando GH0XJ068496, GH22J027789 con valores p significativos (Figura 23).

Por contraste, el segundo bloque de marcadores no evidenció variaciones significativas en los porcentajes de metilación entre ambos grupos. Genes como PRKCZ, ZFPM2 y diferentes sitios CpG (por ejemplo, CpG209, CpG1000 y CpG74) mostraron resultados consistentes con ausencia de diferencias, lo que indica que en estos loci la metilación no parece estar relacionada con la condición analizada (Figura 24).

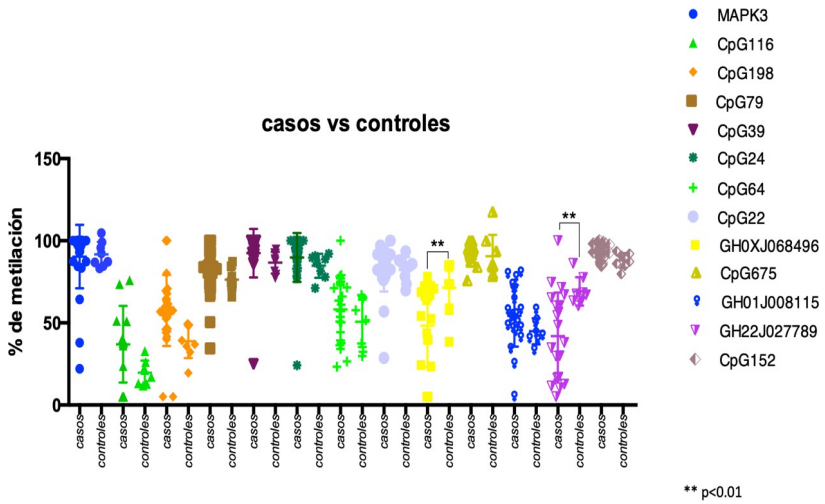


Figura 23. Comparación de los niveles de metilación entre casos y controles para el primer bloque de marcadores.

Se muestran los porcentajes de metilación en los sitios CpG y genes que presentaron diferencias estadísticamente significativas (**, $p < 0.01$). Los marcadores evaluados incluyen: MAPK3, CpG116, CpG198, CpG79, CpG39, CpG24, CpG64, CpG22, GH0XJ068496, CpG675, GH01J008115, GH22J027789 y CpG152. Las barras representan la media ± error estándar. Los valores de p fueron calculados mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

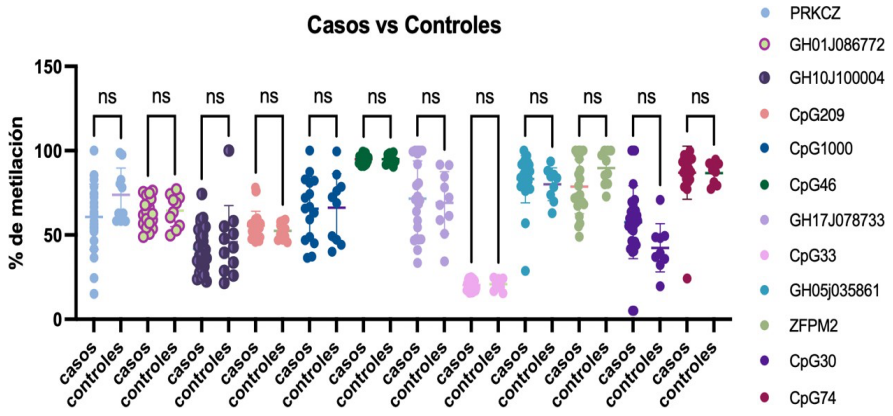


Figura 24: Comparación de los niveles de metilación entre casos y controles para el segundo bloque de marcadores. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los loci analizados, que incluyen: PRKCZ, GH01J086772, GH10J100004, CpG209, CpG1000, CpG46, GH17J078733, CpG33, GH05J035861, ZFPM2, CpG30 y CpG74. Los datos se presentan como media ± error estándar (ns: no significativo). La significancia se evaluó mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

8.15 Seguimiento clínico a largo plazo

La búsqueda de pacientes con artralgia persistente se realizó dentro de la cohorte correspondiente al año 2015. Se logró incluir en el estudio a 27 individuos con un seguimiento de ocho años posteriores a la infección por el VCHIK. De este grupo, 26 pacientes refirieron no presentar secuelas al momento de la evaluación, mientras que un paciente reportó episodios intermitentes de dolor articular. Sin embargo, en la valoración clínica mediante el índice DAS-28, dicho paciente mostró valores inferiores a 2.6, lo que corresponde a ausencia de actividad inflamatoria significativa. Figura 25.

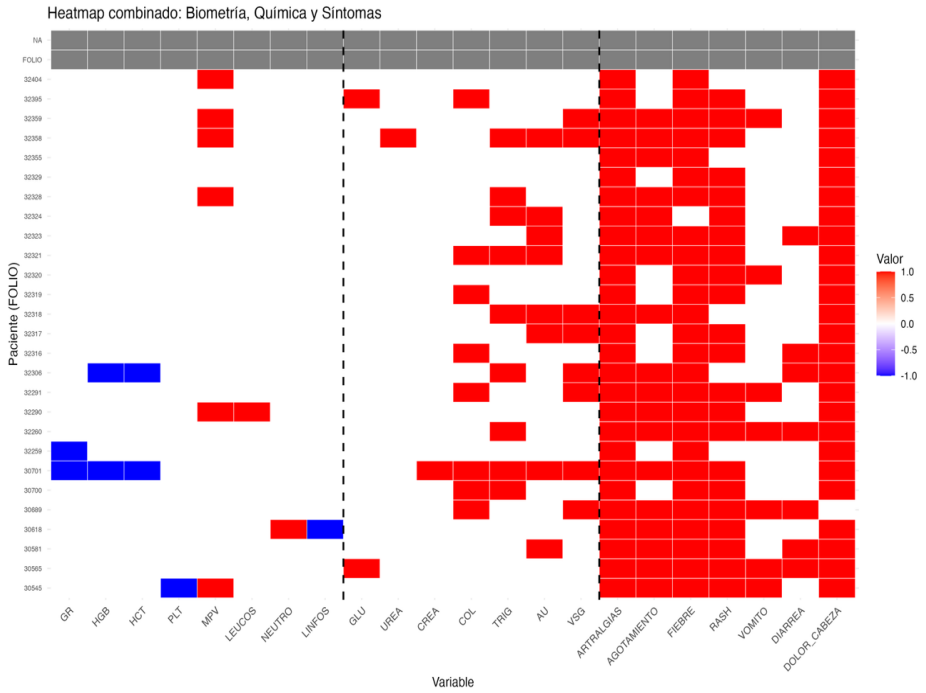


Figura 25. Heatmap combinado que integra parámetros de biometría hemática, química sanguínea y síntomas clínicos en pacientes de la cohorte de seguimiento. Cada fila corresponde a un paciente identificado por su folio, mientras que las columnas representan las variables analizadas. Las abreviaturas corresponden a: GR (glóbulos rojos), HGB (hemoglobina), HCT (hematocrito), PLT (plaquetas), MPV (volumen plaquetario medio), LEUCO (leucocitos), NEUTRO (neutrófilos), LINFOC (linfocitos), GLU (glucosa), UREA (urea), CREA (creatinina), COL (colesterol), TRIG (triglicéridos), AU (ácido úrico), NSG (neutrófilos segmentados). Los síntomas clínicos incluyen: ARTRALGIAS (dolor articular), AGOTAMIENTO, FIEBRE, RASH (exantema), VÓMITO, DIARREA y DOLOR_CABEZA. La escala de color indica la magnitud y dirección de los valores, donde tonos rojos reflejan valores altos, azules valores bajos y blancos valores normales.

En el análisis de los marcadores GHOXJ068496 y GH22J027789, se compararon los porcentajes de metilación entre el grupo de seguimiento y los controles. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, ya que los valores de metilación se mantuvieron en rangos similares. Esta ausencia de variación indica que, tras el periodo de seguimiento, los niveles de metilación en estos loci tienden a estabilizarse y se asemejan a los observados en individuos sin antecedente de infección. Figura 26.

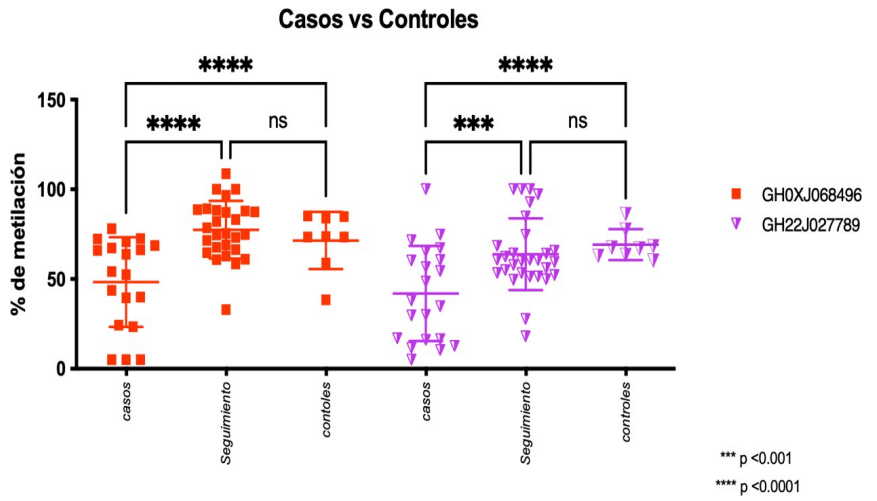


Figura 26. Comparación de los niveles de metilación de los marcadores GH0XJ068496 y GH22J027789 entre grupos de casos, seguimiento y controles. Se muestran los porcentajes de metilación para cada marcador en los tres grupos evaluados. Los casos (pacientes con infección aguda por VCHIK) presentaron diferencias altamente significativas en comparación con los controles (**** $p < 0.0001$ para GH0XJ068496; *** $p < 0.001$ para GH22J027789).Los datos se presentan como media ± error estándar. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

9. DISCUSIÓN

En este estudio, se propuso determinar el estado de metilación en cultivos de células humanas obtenidas de muestras infectadas con el VCHIK para explorar posibles cambios epigenéticos inducidos por la infección.

Para ello, se utilizaron cultivos primarios de sinoviocitos y linfocitos humanos. Inicialmente, se emplearon células Vero para la titulación viral mediante el ensayo de unidades formadoras de placas, se estableció un protocolo de infección de células Vero con sueros de pacientes positivos a VCHIK o con sobrenadantes de cultivos previamente infectados, con el objetivo de evaluar el efecto del virus en la morfología celular y obtener un inóculo con alta carga viral para su posterior análisis. Este ensayo reveló cambios morfológicos característicos de muerte celular en las células Vero expuestas al VCHIK, lo que sugiere una eficiente replicación viral. Este efecto citopático es consistente con estudios previos (Baer A, 2014) que han descrito la capacidad del VCHIK para inducir apoptosis y disrupción de la monocapa celular en líneas celulares susceptibles, se obtuvo un título de 7.25×10^8 PFU/ml en los sobrenadantes recuperados de los cultivos infectados. Posteriormente, se realizaron ensayos de multiplicidad de infección (MOI) en cultivos primarios de linfocitos y sinoviocitos con el objetivo de determinar la concentración viral óptima para evaluar la expresión de diferentes mecanismos epigenéticos. La selección de la MOI adecuada es un paso crucial en los estudios de infección viral, ya que permite garantizar una infección eficiente sin comprometer la viabilidad celular de manera significativa. Los resultados obtenidos muestran que, tras la infección con diferentes concentraciones virales (MOI de 100, 10, 5, 1, 0.1 y 0.01), la proliferación celular se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas a las 48 horas post-infección. Esto indica que, en este tiempo de incubación, el virus no induce una reducción drástica en la viabilidad celular, lo que es fundamental para los análisis posteriores de expresión génica. A partir de estos hallazgos, se seleccionaron las concentraciones de 10 y 100 MOI para continuar con los experimentos de expresión génica, ya que estas condiciones permitieron una adecuada infección sin comprometer la integridad celular.

Se realizó la evaluación del efecto del virus sobre distintos mecanismos epigenéticos mediante qPCR.

La evidencia sobre la modificación de mecanismos epigenéticos, como la biogénesis de miRNAs, la metilación del ADN y la modificación y regulación de la cromatina en el contexto de flavivirus y alfavirus, es un área de investigación emergente.

Los flavivirus, como el virus del dengue y el virus Zika, han mostrado influencias en los mecanismos epigenéticos. Estudios han identificado que la infección por flavivirus puede alterar la expresión de miRNAs, lo que afecta la regulación de la respuesta inmune del hospedador (Cecenarro et al. 2021). En particular, la biogénesis de miRNAs se ha relacionado con la regulación de la expresión génica, lo que puede influir en la patogénesis viral y en la respuesta inflamatoria (Nunes et al. 2023). Esto sugiere que los flavivirus pueden utilizar la biogénesis de miRNAs para evadir las defensas del hospedador, contribuyendo a la patogenicidad (Conceição et al. 2020).

El análisis de expresión de los cuatro mecanismos epigenéticos evaluados (metilación del ADN, biogénesis de miRNA, modificaciones de histonas y regulación de la cromatina) permitió identificar cambios significativos tras la infección con VCHIK, particularmente en genes asociados a la metilación del ADN. A las 72 horas post-infección, los resultados obtenidos mediante la representación en mapas de calor (heatmaps) mostraron una marcada sobreexpresión de genes clave en este mecanismo, destacando *DNMT3B* y *DNMT3L*, que participan en la metilación de novo, así como la familia de genes MBD, que desempeñan un papel crucial en la represión transcripcional y el silenciamiento génico. Estos hallazgos sugieren que la infección por VCHIK podría inducir cambios en la metilación del ADN como un posible mecanismo de regulación viral. En cuanto a la metilación del ADN, se ha observado que los flavivirus pueden inducir cambios en el patrón de metilación del ADN en células infectadas. La metilación del ADN puede regular la expresión de genes clave para la respuesta inmune, y alteraciones en este proceso podrían tener un impacto

significativo en la capacidad del sistema inmunológico para controlar la infección viral (Molero 2023; Rivero 2018). También se ha asociado la metilación del ADN con la regulación de la inflamación en respuesta a la infección por flavivirus, lo que puede tener implicaciones para el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Guillén 2023).

Por otro lado, en el proceso de biogénesis de miRNA se observó una actividad constante en la mayoría de los genes analizados, tanto en los cultivos infectados como en los controles sin infección. Esto podría indicar que el virus no induce una regulación diferencial significativa en este mecanismo, sino que mantiene un perfil de expresión similar al de las células no infectadas, posiblemente como una estrategia para favorecer su replicación sin activar una respuesta antiviral evidente. En particular, la biogénesis de miRNAs se ha relacionado con la regulación de la expresión génica, lo que puede influir en la patogénesis viral y en la respuesta inflamatoria (Nunes et al. 2023). Esto sugiere que los flavivirus pueden utilizar la biogénesis de miRNAs para evadir las defensas del hospedador, contribuyendo a la patogenicidad (Conceição et al. 2020).

En contraste, en los mecanismos de modificaciones de histonas y regulación de la cromatina no se identificaron cambios sustanciales en la mayoría de los genes evaluados. Esto sugiere que, al menos en las primeras 72 horas post-infección, el impacto del VCHIK sobre estos procesos es limitado o bien que su efecto podría depender de otros factores celulares o de tiempos de infección más prolongados.

En el caso de los alfavirus, como el VCHIK, se ha documentado la influencia de estos virus en la regulación de la cromatina y las modificaciones post-traduccionales de histonas. La infección por alfavirus puede inducir la acetilación y metilación de histonas, alterando la estructura de la cromatina y, por ende, la expresión génica de los factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune (Cavagnari 2012; Álvarez-Moran y Ávila-Sánchez 2019). Estas modificaciones pueden desempeñar un papel crucial en la manera en que el virus se replica y se propaga, así como en la respuesta inmune del hospedador

(Casanello et al. 2015).

En resumen, tanto los flavivirus como los alfavirus tienen la capacidad de modificar mecanismos epigenéticos, incluyendo la biogénesis de miRNAs, la metilación del ADN y las modificaciones de la cromatina. Esta interacción entre el virus y los mecanismos epigenéticos del hospedador no solo contribuye a la patogénesis viral, sino que también puede influir en la respuesta inmune y en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la infección viral. En conjunto, estos resultados refuerzan la hipótesis de que el VCHIK podría modular la metilación del ADN como una estrategia para alterar la expresión génica del hospedero, y la homeostasis celular; posiblemente facilitando su replicación y persistencia en las células infectadas o estar relacionada al desarrollo de complicaciones crónicas asociadas al VCHIK, como la artritis persistente.

Con los cultivos de sinoviocitos y linfocitos post-infección, se realizó un análisis de metilación en todo el genoma, con el cual se generaron aproximadamente 15 Gb de bases limpias tras el filtrado de lecturas de baja calidad, lo que garantizó la fiabilidad de los datos analizados, la búsqueda bioinformática de regiones metiladas en cultivos infectados con VCHIK permitió identificar cambios en el perfil de metilación del ADN a las 48 y 72 horas post-infección.

El alineamiento de las lecturas con el genoma de referencia (hg38) mediante BSMAP mostró una adecuada tasa de mapeo, lo que sugiere que la secuenciación se realizó con una cobertura suficiente para detectar cambios en los patrones de metilación. La distribución de la profundidad de secuenciación indica que los datos obtenidos están bien proporcionados y permiten un análisis detallado de la metilación en el genoma.

El análisis de los distintos contextos de metilación de citosina (CG, CHG y CHH) mostró que la cobertura efectiva de cada tipo de elemento varía en un rango del 0% al 100%. En particular, la disminución progresiva observada en la figura 11 sugiere que la profundidad de secuenciación efectiva de la citosina se mantiene

dentro de los rangos esperados para este tipo de estudios.

Dado que la metilación del ADN juega un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y en la modulación de la respuesta inmune, los resultados obtenidos en este estudio podrían estar relacionados con procesos de evasión viral o alteraciones en la inmunomodulación inducidas por la infección con VCHIK. La evidencia sobre la modificación de la metilación del ADN en infecciones por alfavirus ha comenzado a emerger, aunque la investigación específica en esta área está aún en etapas iniciales. Sin embargo, se ha demostrado que la metilación del ADN puede jugar un papel crucial en la respuesta a las infecciones virales, y estudios sugieren que algunos virus modulan la metilación del ADN en genes clave del sistema inmune para facilitar su replicación y evitar la detección por parte del hospedero (Kuss et al. 2018).

Un estudio relevante es el de Nakano et al. Del 2013, que ilustra cómo se establece un perfil de metilación diverso en sinoviocitos afectados por la artritis reumatoide. Este estudio proporciona información significativa sobre cómo las infecciones pueden repercutir en la metilación del ADN en células específicas, revelando que las alteraciones en la metilación podrían influir en la expresión génica, afectando así las funciones celulares de los sinoviocitos (Rowles et al. 2015).

Los flavivirus, como el virus del Zika, han demostrado una capacidad notable para interferir con la biogénesis de miRNAs en células infectadas, contribuyendo potencialmente a su replicación y patogénesis. Por ejemplo, se ha encontrado que el virus del Oeste de Nilo (WNV) codifica un pequeño RNA similar a miRNA en su región no traducida 3', que regula la expresión de *GATA4* y facilita la replicación viral en células de mosquito (Hussain et al. 2011). Esto indica que los flavivirus pueden explotar mecanismos similares a los miRNAs para manipular la respuesta celular, favoreciendo así su propia replicación.

Además, la investigación ha demostrado que los flavivirus pueden alterar no solo la expresión de miRNAs, sino también afectar la biogénesis de organelos como los

peroxisomas. Se ha observado que las proteínas de cápside de los flavivirus se unen a factores de biogénesis peroxosomal como *PEX19*, lo que impide la formación adecuada de peroxisomas y puede debilitar la respuesta antiviral del huésped (Farelo et al. 2022; You et al. 2015). Este mecanismo se considera crucial, ya que la disminución de peroxisomas puede llevar a un aumento de la susceptibilidad a la infección.

La metilación del ADN también se ha implicado en la alteración de la regulación de los genes en infecciones por flavivirus. La investigación sugiere que el impacto del virus del dengue sobre los procesos epigenéticos del huésped puede contribuir a su patogénesis y a la progresión de enfermedades asociadas (Bavia et al. 2016). En este sentido, el análisis de los ARN subgenómicos y la presencia de miRNAs asociados muestra un panorama de cómo el virus altera la expresión genética del hospedador en favor de su replicación (Bavia et al. 2016; Ci et al. 2019).

Whitaker et al. En el 2013 también ha señalado la relevancia de la metilación en sinoviocitos de artritis reumatoide, destacando patrones distintivos de hipermetilación e hipometilación en hasta 2000 sitios CpG localizados en más de 1200 genes (Whitaker et al. 2013). Este tipo de modificación se ha identificado como un potencial mecanismo para la progresión de enfermedades autoinmunes, lo que implica que mecanismos similares podrían ser observados en infecciones virales donde se alteran las respuestas inmunitarias.

En el contexto de los alfavirus, se ha demostrado que regulan la expresión de proteínas que podrían influir en la metilación del ADN. Por ejemplo, el VCHIK, un alfavirus conocido, se ha observado que induce respuestas inflamatorias que podrían desencadenar modificaciones epigenéticas, incluyendo la metilación del ADN (Nakano et al. 2013). Aunque esta área de investigación está en desarrollo, se necesitan más estudios específicos para comprender mejor cómo los alfavirus afectan explícitamente los patrones de metilación del ADN en las células hospedadoras.

Además, el análisis de la metilación del ADN en contextos de infección por otros

virus ha suscitado un interés particular. Virus como el herpes simple (HSV) y el citomegalovirus (CMV) han sido estudiados por su capacidad de modificar el perfil de metilación de las células hospedadoras. Estos cambios son considerados estrategias del virus para evadir el sistema inmune y facilitar la replicación viral (Lewis et al. 2022; Cliffe et al. 2013). Aunque la investigación se ha centrado en otros virus, esto sugiere que los mecanismos de modificación de la metilación del ADN podrían ser un fenómeno común en una amplia gama de infecciones virales, incluidos los alfavirus.

El análisis del paisaje genómico reveló que las características genómicas presentan patrones de metilación distintos, lo que sugiere su participación en funciones de regulación diferencial. La representación en mapas de calor permitió visualizar la distribución del nivel de metilación en relación con la densidad de dinucleótidos CpG, proporcionando una visión global de cómo la metilación del ADN varía en función de la estructura genómica.

La densidad de CpG, medida en ventanas de 200 pb, mostró una distribución heterogénea a lo largo del genoma, con regiones que presentan una alta concentración de estos dinucleótidos y otras donde son escasos. Esta variabilidad es esperada, dado que las islas CpG, regiones tradicionalmente ricas en estos motivos, tienden a localizarse en promotores génicos y estar menos metiladas en genes activos, mientras que regiones con baja densidad de CpG suelen estar más metiladas y asociadas con represión transcripcional.

El gradiente de color rojo en los mapas de calor reflejó la abundancia de CpG en función de su nivel de metilación y densidad, evidenciando que la metilación del ADN sigue patrones específicos según la región genómica analizada. Además, las líneas negras que representan los niveles medios de metilación indican que existe una relación entre la densidad local de CpG y la probabilidad de metilación, lo que coincide con estudios previos que han demostrado que la metilación es más frecuente en regiones con baja densidad de CpG fuera de las islas CpG.

Los gráficos de barras azules y verdes proporcionaron una visión complementaria

sobre la distribución de las densidades de CpG y los niveles de metilación, respectivamente. La proyección de estas distribuciones sobre los ejes del mapa de calor permitió identificar regiones con perfiles de metilación más homogéneos y otras con mayor variabilidad, lo que sugiere que la metilación del ADN puede estar influenciada tanto por la estructura genómica local como por procesos reguladores específicos.

Estos resultados refuerzan la idea de que la metilación del ADN es un mecanismo epigenético altamente organizado que varía en función de la densidad de CpG y su localización en el genoma. Futuros estudios podrían centrarse en correlacionar estos patrones de metilación con la expresión génica y la actividad transcripcional en distintos contextos celulares y condiciones fisiopatológicas, lo que permitiría una mejor comprensión del impacto de la metilación en la regulación génica y la estabilidad del genoma.

Los alfavirus, pertenecientes a la familia Togaviridae, están involucrados en interacciones significativas con los mecanismos epigenéticos del hospedador, como la biogénesis de miRNAs, la metilación del ADN y la regulación de la cromatina. Esta capacidad de interferir en la maquinaria epigenética del hospedador no solo afecta la replicación viral, sino que también puede tener repercusiones severas en la salud del huésped (de Aguiar et al. 2019).

Los alfavirus han demostrado ser capaces de modular la biogénesis de miRNAs en el hospedador. Por ejemplo, el virus Sindbis, un alfavirus conocido, ha sido reportado como capaz de impactar en la biogénesis de miRNAs independientemente de la Dicer canónica, sugiriendo que pueden tener su propia maquinaria integrada en su ciclo vital (Hussain et al. 2011). Esto implica que los alfavirus no solo utilizan las rutas del hospedador, sino que también pueden influir en la expresión génica a su favor y suprimir la respuesta inmune del huésped (Rouha et al. 2010).

Por otro lado, se ha identificado que el alelo de la proteína no estructural NS4B del virus del dengue actúa como un potente supresor del ARN interferente, lo que

resalta un mecanismo específico por el cual los flavivirus, que incluyen algunos alfavirus, pueden disminuir la actividad de la maquinaria de ARN del hospedador y evadir una respuesta inmunitaria eficaz. Esta supresión de miRNAs también ha sido observada en el contexto de la infección por dengue, donde se ha reportado una reducción en la expresión de componentes clave de la maquinaria de ARN en células humanas infectadas por virus del dengue (Kakumani et al. 2013; Casseb et al. 2016).

La regulación de la cromatina también se ve afectada por la infección por alfavirus. Investigaciones han indicado que las interacciones entre proteínas virales y reguladores epigenéticos del hospedador pueden alterar la estructura de la cromatina. Por ejemplo, el virus Sindbis induce cambios en la estructura de la cromatina al interactuar con proteínas estructurales y modificadoras de la cromatina, lo que afecta la expresión de genes que pueden facilitar la replicación viral (Campbell et al. 2013). Se ha sugerido que las perturbaciones en la metilación del ADN y en las modificaciones de histonas durante las infecciones por alfavirus son fundamentales para la regulación de la respuesta inmune y la persistencia viral (Avila-Bonilla y Salas-Benito 2022).

La evidencia sobre la modificación de la metilación del ADN durante la infección por alfavirus es limitada, pero algunos estudios han comenzado a explorar cómo la infección viral puede influir en los mecanismos epigenéticos del hospedador. Los alfavirus manipulan las respuestas celulares, incluidas las modificaciones epigenéticas, para facilitar su replicación y el establecimiento de infecciones.

Un estudio relevante es el de Dai et al. En el 2022 investigó la modificación de N6-metiladenosina en la transcripción del mosquito *Aedes aegypti* y cómo esta se altera durante la infección por el virus del dengue (Dai et al. 2022). Aunque el dengue es un flavivirus, este trabajo proporciona información sobre cómo diferentes virus pueden influir en la maquinaria celular responsable de la metilación y, potencialmente, la metilación del ADN en células hospedadoras. Así, se muestra que las proteínas de metilación, como *METTL3* y *METTL14*, afectan la replicación del virus, sugiriendo una conexión entre la metilación del

ARN y la respuesta antiviral de hospedadores.

Por otro lado, la regulación de los mRNAs durante una infección viral también puede influir en la metilación del ADN. El estudio de Bhattacharya et al. En el 2022 indica que la metilación puede diferir entre las interacciones virales y los hospedadores, sugiriendo que la inhibición de ciertas metilasas, como *DNMT2*, podría ser un enfoque para controlar infecciones virales en artrópodos colonizados por *Wolbachia* (Bhattacharya et al. 2022). Este estudio, aunque centrado en flavivirus, ayuda a entender cómo los mecanismos de metilación pueden cambiar durante infecciones por alfavirus.

Además, el impacto de la metilación del ARN en la replicación viral ha sido objeto de estudio. Este trabajo ha revelado que la modificación de la metilación de ARN puede influir en la interacción viral y la regulación del hospedador, lo que indica que la metilación de ARN puede tener implicaciones más amplias para la replicación de virus, incluidos los alfavirus (Bhattacharya et al. 2021). La información proviene de investigaciones que examinan cómo las modificaciones en la metilación afectan los ciclos de replicación viral.

El estudio de Kim et al. En el 2020 sobre el receptor *Mxra8* y su resistencia a la infección sugiere que los factores epigenéticos pueden influir indirectamente en el proceso de infección por alfavirus, lo que indica que pueden ocurrir modificaciones en los mecanismos epigenéticos durante el proceso infectivo (Kim et al. 2020). Esto refuerza la idea de que la regulación epigenética, incluida la metilación del ADN, puede jugar un papel relevante en cómo los alfavirus establecen infecciones persistentes.

El análisis bioinformático de regiones diferencialmente metiladas (RDM) en células de sinoviocitos y linfocitos infectados con VCHIK permitió identificar múltiples cambios epigenéticos asociados a la infección viral. En total, se detectaron 1,457 RDM en sinoviocitos infectados en comparación con los controles no infectados, mientras que en linfocitos se encontraron 1,016 RDM. Estos resultados sugieren que el virus puede inducir alteraciones en la metilación

del ADN en diferentes tipos celulares, lo que podría influir en la regulación.

El análisis de la distribución de los contextos de metilación (mCG, mCHG y mCHH) reveló una mayor presencia de RDM en el contexto mCHH, seguido por mCG y mCHG, tanto en sinoviocitos como en linfocitos. Estos hallazgos son relevantes, ya que la metilación en contextos no CG se ha asociado con procesos de plasticidad epigenética y regulación transcripcional en respuesta a estímulos externos, incluyendo infecciones virales. Además, el análisis de la longitud de las RDM en cada cromosoma mostró que el cromosoma 1 presentó las regiones metiladas más largas en sinoviocitos, mientras que en linfocitos se observaron diferencias en la localización de los patrones de metilación más extensos, con mCG y mCHH en el cromosoma 1 y mCHG en el cromosoma 2. Esta variabilidad podría estar relacionada con la densidad génica, la presencia de transposones y otros elementos reguladores en cada cromosoma.

El análisis de genes diferencialmente metilados (GDM) dentro de las RDM identificó 472 GDM en la comparativa grupo 1 vs. grupo 2, y 324 GDM en la comparativa grupo 3 vs. grupo 4. El enriquecimiento funcional de estos genes a través de bases de datos como KEGG, Reactome y WikiPathways permitió vincularlos con vías de señalización clave en la respuesta inmune y en la infección viral, incluyendo:

- Ciclo de la GTPasa CDC42
- Señalización por Rho GTPasas
- Vía de reparación de errores de alineamiento
- Ciclo de la GTPasa RAC2

Estos resultados sugieren que la infección por VCHIK puede modular la metilación del ADN en dos tipos celulares clave en la patogenia de la enfermedad: los sinoviocitos y los linfocitos. En particular, el análisis de genes diferencialmente metilados (GDM) reveló que las vías de señalización por Rho GTPasas, incluida la ruta de la GTPasa CDC42 y la señalización por RAC2, se encuentran significativamente enriquecidas en las RDM tanto en sinoviocitos como

en linfocitos infectados. Este hallazgo es de gran relevancia, ya que las Rho GTPasas son reguladores centrales del citoesqueleto de actina, de la endocitosis, de la migración celular y de la respuesta inflamatoria. Diversos estudios han demostrado que virus como el chikungunya, el dengue y otros alfavirus utilizan la maquinaria de endocitosis mediada por CDC42 y RAC2 para ingresar a las células hospedadoras (Zamudio-Meza, et al. 2009; van Duijl-Richter et al. 2015). La metilación anómala de genes que controlan estas GTPasas podría representar un mecanismo epigenético de retroalimentación del hospedero para modular la entrada viral o, por el contrario, una estrategia viral para silenciar la respuesta antiviral.

Asimismo, el análisis de elementos reguladores dentro de las RDM reveló la presencia de promotores, potenciadores (enhancers), sitios de unión CTCF, islas CpG, y diversas moléculas de ARN no codificante, como circRNA, piRNA y lncRNA, todos ellos con un papel clave en la regulación de la expresión génica. Se identificaron 47 elementos reguladores en la comparación grupo 1 vs. grupo 2 y 23 en grupo 3 vs. grupo 4, además de un número considerable de circRNA (5,170 y 3,771, respectivamente), piRNA (51 y 39) y lncRNA (66 y 47).

Un aspecto novedoso de nuestro trabajo es precisamente la integración del paisaje de metilación diferencial en estos elementos reguladores no codificantes. En sinoviocitos se identificaron 5,170 circRNA, 66 lncRNA y 51 piRNA diferencialmente metilados, mientras que en linfocitos las cifras fueron de 3,771 circRNA, 47 lncRNA y 39 piRNA, respectivamente, lo que coincide con los valores obtenidos en el análisis comparativo de grupos. Los circRNA y lncRNA están emergiendo como reguladores críticos de la respuesta inmune innata, actuando como esponjas de miRNA o modulando la estabilidad del mRNA (Chen et al. 2017). Los piRNA, tradicionalmente asociados al silenciamiento de transposones en la línea germinal, han comenzado a reconocerse como actores emergentes en células somáticas durante la infección viral, donde pueden regular la expresión génica post-transcripcionalmente (Wang et al. 2023). La hipometilación predominante observada en estos elementos (puntos azules en figuras 18 y 19) sugiere una pérdida global de metilación que podría desreprimir

la expresión de estos ARN no codificantes, alterando redes regulatorias antivirales. Por ejemplo, se ha descrito que multiples circRNA actúan como supresores de la respuesta inflamatoria en artritis reumatoide (Li et al. 2022), una enfermedad que comparte características fisiopatológicas con la artritis crónica post-chikungunya. Nuestros resultados abren la hipótesis de que la metilación diferencial de circRNA y piRNA en sinoviocitos podría contribuir a la persistencia de la artralgia en pacientes infectados con VCHIK. Cabe resaltar, que los hallazgos de nuestro trabajo requieren de una validación más exhaustiva mediante estudios funcionales y en cohortes independientes para establecer su relevancia clínica.

El análisis funcional mediante enriquecimiento de vías KEGG y Reactome también identificó otras vías relevantes, aunque con menor significancia, como la señalización por el receptor de quimiocinas y la regulación del citoesqueleto mediada por Rho. Es llamativo que no se observara un enriquecimiento significativo de vías clásicas de respuesta antiviral como RIG-I-like receptor signaling o la producción de interferón. Sin embargo, al examinar las regiones reguladoras (promotores y enhancers) asociadas a las RDM identificadas en sinoviocitos y linfocitos infectados, se encontró una elevada frecuencia de sitios de unión para factores de transcripción clave en la inmunidad antiviral, incluyendo miembros de la familia *IRF (IRF2, IRF3, IRF4, IRF9), STAT (STAT1, STAT3, STAT5A), NF-κB (RELB, NFKBIZ, NFATC3),* así como modificadores epigenéticos como *EP300, HDAC2, KDM1A* y proteínas *TRIM* con actividad antiviral (*TRIM22, TRIM24, TRIM28*). Por ejemplo, la región GH01J016611 (clasificada como enhancer elite) contiene 177 sitios de unión para factores de transcripción, incluyendo *SP1, TRIM22, ELF1, BHLHE40, ZBTB33, IKZF1, CTCF, DPF2, ARNT y MLLT1*, entre otros. La presencia de estos motivos en regiones diferencialmente metiladas sugiere que, aunque los genes efectores de la respuesta de interferón no aparecen como diferencialmente metilados a nivel global, la metilación anómala de elementos reguladores podría estar modulando finamente la accesibilidad de estos factores de transcripción a sus dianas, alterando así la cinética o magnitud de la respuesta antiviral. Esta hipótesis se ve

reforzada por la identificación de regiones reguladoras diferencialmente metiladas en elementos no codificantes como circRNA (5,170 en sinoviocitos; 3,771 en linfocitos) y piRNA (51 y 39, respectivamente), los cuales también contienen motivos de unión para estos FT, apoya la idea de una capa regulatoria no codificante que modula la respuesta inmune postranscripcional, un hallazgo que coincide con literatura reciente sobre la función de circRNA y piRNA en respuestas inmunes (Sajjad et al. 2021; Pekáčová et al. 2022). Por lo tanto, la ausencia de enriquecimiento de vías clásicas podría deberse a que los cambios en metilación afectan predominantemente a regiones regulatorias no codificantes y a genes moduladores tempranos (como las Rho GTPasas) en lugar de a los efectores finales de la respuesta inmune, o bien a que las ventanas de tiempo analizadas (48 y 72 horas post-infección) corresponden a una fase en la que la respuesta aguda ya ha sido controlada y el virus ha establecido una infección persistente de bajo grado. De hecho, estudios en modelos animales de artritis por chikungunya han demostrado que el ARN viral puede persistir en articulaciones durante meses, manteniendo una activación crónica de la vía de RhoA/ROCK, la cual está aguas abajo de CDC42 (Dhanwani et al, 2014).

Nuestros hallazgos sobre la presencia de sitios de unión para factores de transcripción como *TRIM22, IRF2/3/9 y STAT1/3* en regiones diferencialmente metiladas son consistentes con estudios previos que demuestran el papel de estos factores en el control epigenético de la infección viral. Por ejemplo, se ha descrito que *TRIM22* restringe la replicación del virus herpes simple tipo 1 mediante el silenciamiento epigenético de genes virales tempranos, actuando como un efector de los interferones tipo I (Reddi et al. 2021; Pagani et al. 2021). En este contexto, la metilación anómala de los enhancers que contienen motivos de unión para *TRIM22* podría comprometer su capacidad para reclutar complejos represivos de cromatina, favoreciendo así la persistencia del VCHIK. Por otro lado, la presencia de sitios de unión para CTCF y SP1 en regiones como GH01J016611 sugiere una posible regulación de la arquitectura cromatínica, ya que se ha demostrado que CTCF organiza dominios topológicos asociados a islas CpG y que su unión puede ser bloqueada por la metilación del ADN (Monteagudo-Sánchez et al. 2024). Un

mecanismo particularmente relevante es el descrito para el factor de transcripción BZLF1 del virus Epstein-Barr, que es capaz de unirse específicamente a secuencias metiladas y revertir el silenciamiento epigenético, reactivando la transcripción viral (Wille et al. 2013). Aunque no identificamos directamente homólogos de BZLF1 en nuestras regiones reguladoras, la alta densidad de sitios de unión para factores de transcripción con dedos de zinc (*ZNF592, ZNF217, ZNF639*, etc.) y para proteínas de la familia *MBD (MBD1, MBD2*) sugiere que el VCHIK podría explotar mecanismos similares de lectura del metiloma para modular la expresión génica del hospedero a su favor. En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que la reprogramación del metiloma inducida por el VCHIK no solo afecta a vías efectoras clásicas, sino que también altera la accesibilidad de factores de transcripción clave para el establecimiento de la persistencia viral y la cronicidad de la artritis.

La selección de regiones candidatas a partir del metiloma fue un paso crucial para vincular hallazgos epigenómicos con procesos biológicos relevantes. El análisis inicial identificó 1,457 RDM en sinoviocitos y 1,026 en linfocitos, reflejando una amplia remodelación epigenética. Mediante un filtrado funcional centrado en islas CpG, promotores, enhancers, sitios CTCF y ncRNAs, el conjunto se redujo a 52 regiones, lo que fortalece la interpretación biológica y evita la dispersión de resultados.

La priorización basada en relevancia biológica permitió enfocar el análisis en 32 regiones asociadas a genes de respuesta inmunológica e inflamatoria, un criterio clave en enfermedades post-virales donde la regulación epigenética puede influir en la cronicidad de los síntomas. Finalmente, la viabilidad técnica mediante enzimas de restricción sensibles a metilación redujo el conjunto a 25 regiones aptas para validación experimental, excluyendo siete por falta de sitios de restricción.

Los hallazgos epidemiológicos de esta cohorte de 193 pacientes con infección confirmada por VCHIK en Tapachula, Chiapas, durante el brote de 2015, se alinean con las tendencias reportadas en México y en la región de las Américas. La media de edad de presentación fue de 40 años, con un rango de 7 a 74 años. Esta distribución es consistente con lo documentado a nivel nacional, donde se ha señalado que la infección afecta predominantemente a adultos jóvenes, con una afectación significativa en menores de 20 años (28 %) y en el grupo de 45 a 64 años (Rojas et al. 2018). El predominio del sexo femenino (68.4 %) observado en nuestro estudio coincide con múltiples reportes epidemiológicos en México y Latinoamérica, donde se ha documentado consistentemente una mayor proporción de casos en mujeres (aproximadamente dos tercios) (Garay-Morán et al. 2017). Esta diferencia ha sido atribuida a factores conductuales y ocupacionales que podrían incrementar la exposición femenina a los vectores Aedes aegypti y Aedes albopictus, más que a una susceptibilidad biológica intrínseca.

Las manifestaciones clínicas registradas en esta cohorte reflejan el espectro clásico de la infección aguda por VCHIK. La fiebre fue prácticamente universal (99.5 %), seguida de cefalea (92.8 %), escalofríos (91.7 %) y exantema (78.8 %). La frecuencia de artralgias (52.9 % de poliartralgias y 37.8 % de artralgias moderadas) se sitúa dentro del rango reportado en la literatura (70–100 %), aunque ligeramente por debajo de lo descrito en la caracterización nacional (73.5–72.6 % para artralgias leves y graves) (Garay-Morán et al. 2017). El elevado porcentaje de exantema en nuestra serie contrasta con lo notificado en el estudio nacional (58 %) (Garay-Morán et al. 2017), y podría reflejar diferencias en la captación clínica o variaciones geográficas en la presentación fenotípica del virus. Es importante señalar que el brote de 2015 en México ocurrió en un contexto de circulación simultánea de otros arbovirus (dengue y Zika) (Araúz et al. 2016), lo cual pudo haber influido en el espectro clínico observado.

La confirmación molecular mediante prueba de ácidos nucleicos constituye un

punto fuerte de nuestro estudio, ya que asegura la inclusión exclusiva de casos confirmados por laboratorio. La RT-PCR en tiempo real es considerada el estándar de oro para el diagnóstico durante la fase aguda de la infección, con alta sensibilidad y especificidad (Sajith et al. 2025). En nuestro contexto, la confirmación molecular fue particularmente relevante debido a la superposición clínica con dengue y Zika, que puede llevar a diagnósticos erróneos si se basa únicamente en criterios clínico-epidemiológicos.

La inclusión de 10 individuos control sin antecedentes de exposición al virus constituye un elemento metodológico esencial para el análisis de metilación. Estudios previos en infecciones virales han demostrado que la infección aguda puede inducir cambios persistentes en el metiloma, y la comparación con un grupo control no expuesto permite discernir las alteraciones epigenéticas específicamente asociadas a la infección (Balnis et al. 2022). En el contexto del chikungunya crónico, investigaciones recientes han incorporado grupos control de individuos recuperados para identificar firmas transcripcionales y epigenéticas asociadas a la cronicidad (Gérardin et al. 2025). La inclusión de controles en nuestro diseño, por tanto, proporciona una línea basal adecuada para la interpretación de los hallazgos de metilación en las regiones candidatas.

El análisis comparativo de los niveles de metilación entre pacientes con infección aguda por VCHIK y controles sanos reveló un patrón diferencial altamente específico. De todos los marcadores evaluados mediante MS-qPCR, un grupo de loci mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre casos y controles (GH22J027789 - GH0XJ068496), mientras que el resto no evidenció variaciones significativas. Por lo tanto, el hallazgo central es que la infección aguda por VCHIK induce cambios de metilación no generalizados, sino restringidos a regiones genómicas particulares con potencial relevancia funcional. Este patrón es consistente con estudios previos en infecciones por otros virus, donde la reprogramación epigenética suele afectar a loci específicos involucrados

en la respuesta inmune y la señalización inflamatoria, en lugar de inducir una hipo o hipermetilación global del genoma (Paschos et al. 2010).

Dos regiones reguladoras, GH22J027789 y GH0XJ068496 (ambas clasificadas como promotor/enhancer), mostraron una hipermetilación significativa en los casos agudos en comparación con los controles. Ambas regiones son ricas en sitios de unión para factores de transcripción clave, lo que sugiere que su estado de metilación podría modular la accesibilidad de la cromatina y, en consecuencia, la expresión de genes adyacentes o diana.

La región GH22J027789 contiene 37 sitios de unión para factores de transcripción, entre los que destacan KLF17, ZIC2, ZNF600, TCF12, PRDM6, PRDM4, GLIS1, ZNF366, KLF10, BCL11A, KLF8 y WT1. Muchos de estos factores pertenecen a familias con funciones bien documentadas en la regulación de la respuesta inmune, la diferenciación celular y la inflamación. Por ejemplo, los factores de la familia KLF (Krüppel-like factors) participan en la activación de macrófagos, la producción de citocinas y la regulación de la artritis experimental. En particular, se ha demostrado que KLF4 regula positivamente la artritis autoinmune en modelos murinos y en pacientes con artritis reumatoide mediante la modulación de la supervivencia celular (Choi et al. 2018), mientras que KLF2 regula críticamente la activación y función de monocitos, que desempeñan un papel patogénico en la enfermedad articular progresiva (Das et al. 2019). Asimismo, la hipermetilación de regiones que contienen sitios de unión para PRDM6 podría tener implicaciones inmunomoduladoras, ya que se ha identificado que esta histona metiltransferasa suprime la expresión de genes inmunitarios en células tumorales, alineándose con los roles inmunosupresores descritos para otros miembros de la familia PRDM (Wu et al. 2025). Por su parte, BCL11A es un regulador maestro de la linfopoyesis y también se ha implicado en la modulación de la respuesta inflamatoria; estudios recientes demuestran que su sobreexpresión promueve la producción de IL-1β en células mieloides de médula ósea,

impulsando la inflamación y el deterioro funcional de las células madre hematopoyéticas (Wang et al. 2025). La hipermetilación de esta región podría reducir la unión de estos factores de transcripción, alterando así la expresión de genes involucrados en la patogenia de la artritis post-chikungunya.

La región GH0XJ068496 presenta una mayor densidad de sitios de unión (150 factores de transcripción), incluyendo *POLR2A, ATF2, CREM, ATF1, CREB1, NFYC, RELB, SMAD4, GABPB1, TCF12, BCL11A, IKZF1, SP1, SP3, KLF8, ZNF335, E2F1, ELK1,* entre otros. La presencia de múltiples factores de la familia CREB/ATF, CREM, y otros factores sugiere que esta región podría ser sensible a señales de estrés celular y a vías de señalización activadas por la infección viral. En este contexto, se ha demostrado que la metilación del ADN en sitios de unión para factores de transcripción de la familia CREB/ATF regula directamente la latencia y reactivación de diversos virus. Por ejemplo, en el virus de la leucemia bovina (BLV), la hipermetilación de la región CRE en el LTR 5′ impide el reclutamiento de CREB/CREM/ATF, contribuyendo a la latencia proviral y a la evasión del sistema inmunitario del hospedero (Pierard et al. 2010). De manera similar, en el VIH-1, la desmetilación dependiente del ciclo celular de los sitios CREB/ATF en el LTR es crucial para la reactivación del genoma viral latente (Tanaka et al. 2003). Por lo tanto, la hipermetilación de GH0XJ068496 podría alterar la expresión de genes diana involucrados en la respuesta al estrés celular y la inflamación, modulando potencialmente la susceptibilidad o la respuesta del hospedero a la infección viral.

Nuestros resultados aportan evidencia relevante sobre la evolución clínica y epigenética a largo plazo de pacientes infectados por el VCHIK. En primer lugar, el seguimiento a ocho años mostró que la gran mayoría de los individuos (26 de 27) no refirieron secuelas articulares persistentes, y el único paciente que reportó dolor intermitente presentó un índice DAS-28 inferior a 2.6, lo que sugiere ausencia de actividad inflamatoria significativa. Este hallazgo indica que, aunque

la artralgia posinfecciosa puede prolongarse en algunos casos, tiende a no traducirse en una artritis clínicamente relevante a largo plazo, coincidiendo con estudios que reportan una evolución favorable tras la fase aguda de la infección por VCHIK (Rahman et al. 2022; Zaid et al. 2018).

En segundo lugar, el análisis de metilación de los loci GH0XJ068496 y GH22J027789 reveló que, si bien durante la fase aguda (casos) existían diferencias altamente significativas en los niveles de metilación respecto a los controles, dichas diferencias desaparecieron en el grupo de seguimiento. Este hallazgo sugiere que la infección por VCHIK induce cambios epigenéticos transitorios que tienden a normalizarse con el tiempo, alcanzando patrones de metilación comparables a los de individuos sin antecedente infeccioso. La reversión de estas marcas epigenéticas podría reflejar mecanismos de reparación o adaptación celular frente al estrés inflamatorio agudo, y podría estar asociada a la resolución clínica observada en la mayoría de los pacientes. Estudios previos en otras infecciones virales han documentado modificaciones en el metiloma durante la fase aguda, con recuperación parcial o total tras la resolución del cuadro (Mukherjee et al. 2013; Atlante et al. 2020; Gokhale et al. 2019). En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la infección por VCHIK no deja una huella epigenética permanente en los loci analizados, al menos en el contexto de un seguimiento de ocho años.

No obstante, es necesario reconocer las limitaciones del estudio, como el tamaño muestral reducido (n=27), la posible heterogeneidad en el manejo clínico durante el seguimiento y la ausencia de evaluaciones funcionales o de imágenes articulares que podrían haber subestimado cambios subclínicos. A pesar de ello, estos resultados contribuyen a comprender mejor la historia natural de la infección por el VCHIK y refuerzan la importancia de reconocer sus síntomas característicos para el diagnóstico diferencial con otras infecciones febriles, especialmente en áreas endémicas donde coexisten múltiples arbovirus. Asimismo, abren la puerta a investigar si otros loci o mecanismos epigenéticos distintos a la metilación del

ADN podrían explicar los casos excepcionales de sintomatología prolongada, así como a evaluar la persistencia de síntomas articulares crónicos y el impacto de la enfermedad en distintos grupos poblacionales.

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo ha determinado que la infección por VCHIK induce cambios específicos y diferenciales en el estado de metilación del ADN de células humanas, particularmente en sinoviocitos y linfocitos, dos tipos celulares clave en la patogenia de la enfermedad y sus complicaciones crónicas. Los hallazgos obtenidos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. El VCHIK modula selectivamente la metilación del ADN como mecanismo epigenético predominante. A diferencia de otros procesos como la biogénesis de miRNAs o las modificaciones de histonas, que mostraron cambios limitados en las primeras 72 horas post-infección, la maquinaria de metilación del ADN —especialmente los genes *DNMT3B, DNMT3L* y la familia MBD— se encontró significativamente sobreexpresada, sugiriendo que el virus induce una reprogramación epigenética dirigida hacia la regulación transcripcional por metilación.

2. La infección por VCHIK genera un panorama extenso de RDM con especificidad celular. Se identificaron 1,457 RDM en sinoviocitos y 1,016 en linfocitos, demostrando que la respuesta epigenética es celularmente heterogénea. La presencia predominante de metilación en contexto CHH (no CG) apunta a mecanismos de plasticidad epigenética asociados a la respuesta a estímulos infecciosos.

3. Las vías de señalización por Rho GTPasas (*CDC42, RAC2*) constituyen el principal blanco funcional de la metilación diferencial. El enriquecimiento significativo de estas vías, conocidas por su participación en la endocitosis viral y la regulación del citoesqueleto, sugiere que el VCHIK podría inducir cambios epigenéticos que modulan la entrada viral y la migración celular, abriendo nuevas perspectivas sobre la relación virus-hospedador.

4. Los elementos reguladores no codificantes (circRNA, lncRNA, piRNA) muestran una hipometilación predominante y representan un novedoso nivel de regulación epigenética en la infección por alfavirus. La identificación de miles de estos elementos diferencialmente metilados —5,170 circRNA y 51 piRNA en sinoviocitos— sugiere que el VCHIK podría alterar redes regulatorias postranscripcionales, con potencial impacto en la persistencia de la artralgia crónica post-infección.

5. Las regiones diferencialmente metiladas son ricas en sitios de unión para factores de transcripción inmunológicos clave (IRF2/3/9, STAT1/3, NF-κB, TRIM22, CTCF). Aunque no se observó un enriquecimiento global de vías clásicas de respuesta antiviral, la presencia de estos motivos en regiones con metilación alterada sugiere que el VCHIK podría modular finamente la accesibilidad de la cromatina a estos factores, alterando la cinética de la respuesta inmune sin suprimirla completamente.

6. La infección aguda induce hipermetilación transitoria en regiones reguladoras específicas, como GH22J027789 y GH0XJ068496. Estas regiones, ricas en sitios de unión para factores de las familias KLF, CREB/ATF, PRDM y BCL11A, mostraron diferencias altamente significativas entre pacientes agudos y controles, vinculando la metilación anómala con la regulación de la inflamación y la respuesta al estrés celular.

7. Los cambios epigenéticos inducidos por el VCHIK son reversibles a largo plazo. El seguimiento a ocho años de los pacientes demostró que los niveles de metilación en los loci analizados se normalizaron, alcanzando patrones comparables a los de individuos sin antecedente infeccioso. Esta reversión se acompañó de una resolución clínica favorable, sin artritis persistente clínicamente relevante, lo que sugiere que el VCHIK no deja una huella epigenética permanente en los loci estudiados.

Limitaciones y perspectivas futuras. El tamaño muestral reducido para el análisis de metilación a largo plazo (n=27), la ausencia de evaluaciones funcionales

articulares y la falta de validación funcional de las regiones candidatas limitan la generalización de los resultados. Futuros estudios deberán: (i) validar mediante técnicas funcionales (CRISPR, ensayos reporteros) el papel causal de las RDM identificadas; (ii) explorar si otros mecanismos epigenéticos (modificaciones de histonas, ARN no codificantes) explican los casos excepcionales de artritis persistente; (iii) ampliar el seguimiento a cohortes multicéntricas para confirmar la reversibilidad de las marcas epigenéticas; y (iv) evaluar si la metilación diferencial de circRNA y piRNA puede servir como biomarcador pronóstico de cronicidad.

Conclusión final. El VCHIK induce una reprogramación específica y transitoria del metiloma del hospedador, afectando preferentemente a vías de señalización por Rho GTPasas y a elementos reguladores no codificantes. Estos cambios epigenéticos, que revierten tras la resolución clínica, aportan una nueva comprensión de la patogenia del chikungunya y abren la puerta a futuras intervenciones diagnósticas o terapéuticas basadas en el epigenoma. Esta tesis constituye un avance significativo en el conocimiento de las interacciones entre alfavirus y los mecanismos epigenéticos del hospedador, sentando las bases para investigar el papel de la metilación del ADN en las artritis post-infecciosas y otras enfermedades virales crónicas.

11. BIBLIOGRAFÍA

Adcock IM. 2007. HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents [Review of HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents]. British Journal of Pharmacology 150:829-831.

Adhya D, Basu A. 2010. Epigenetic modulation of host: new insights into immune evasion by viruses. Journal of Biosciences 35:647-663.

Alabert C, Groth A. 2012. Chromatin replication and epigenome maintenance. Nature Reviews Molecular Cell Biology 13:153-167.

Álvarez-Morán AM, Ávila-Sánchez P. 2019. Panorama epigenético del mesotelioma pleural maligno. Neumología y Cirugía de Tórax 78:395-403. doi:10.35366/NT194H.

Araúz D, De Urriola L, Jones J, Castillo M, Martínez AA, Murillo ESR, Troncoso L, Chen-Germán M, Ábrego L, Armién B, Pascale JM, Sosa N, López-Vergès S, Moreno B. 2016. Febrile or exanthematous illness associated with Zika, Dengue, and Chikungunya viruses, Panama. Emerging Infectious Diseases 22:1515-1517. doi:10.3201/eid2208.160292.

Atlante S, Mongelli A, Barbi V, Martelli F, Farsetti A, Gaetano C. 2020. The epigenetic implication in coronavirus infection and therapy. Clinical Epigenetics 12:156.

Avila-Bonilla RG, Salas-Benito JS. 2022. Interactions of host miRNAs in the flavivirus 3′UTR genome: From bioinformatics predictions to practical approaches. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 12:976843. doi:10.3389/fcimb.2022.976843.

Baer A, Kehn-Hall K. 2014. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. Journal of Visualized Experiments 93:e52065. doi:10.3791/52065.

Balakrishnan L, Milavetz B. 2017. Epigenetic Regulation of Viral Biological Processes. Viruses 9. doi:10.3390/v9110346.

Balnis J, Madrid A, Hogan KJ, Drake LA, Adhikari A, Vancavage R, Singer HA, Alisch RS, Jaitovich A. 2022. Persistent blood DNA methylation changes one year after SARS-CoV-2 infection. Clinical Epigenetics 14:94. doi:10.1186/s13148-022-01313-8.

Barres R, Zierath JR. 2011. DNA methylation in metabolic disorders. The American Journal of Clinical Nutrition 93:897S-900.

Barrès R, Zierath JR. 2016. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. Nature Reviews Endocrinology 12:441-451.

Bavia L, Mosimann ALP, Aoki MN, Duarte dos Santos CN. 2016. A glance at subgenomic flavivirus RNAs and microRNAs in flavivirus infections. Virology Journal 13:84. doi:10.1186/s12985-016-0541-3.

Bertolín-Guillén JM. 2023. Salud mental intergeneracional. Revista de Neuro-Psiquiatría 86:35-44. doi:10.20453/rnp.v86i1.4465.

Bhattacharya T, Yan L, Crawford JM, Zaher H, Newton ILG, Hardy RW. 2022. Differential viral RNA methylation contributes to pathogen blocking in Wolbachia-colonized arthropods. PLoS Pathogens 18:e1010393. doi:10.1371/journal.ppat.1010393.

Braun KVE, Voortman T, Dhana K, Troup J, Bramer WM, Troup J, Chowdhury R, Dehghan A, Muka T, Franco OH. 2016. The role of DNA methylation in dyslipidaemia: A systematic review. Progress in Lipid Research 64:178-191.

Burdge GC, Lillycrop KA. 2010. Bridging the gap between epigenetics research and nutritional public health interventions. Genome Medicine 2:80.

Campbell CL, Harrison T, Hess AM, Ebel GD. 2014. MicroRNA levels are modulated in Aedes aegypti after exposure to Dengue-2. Insect Molecular Biology 23:132-139. doi:10.1111/imb.12070.

Canalejo SR. 2018. Qué es la epigenética. Ius et Scientia 4:50-62. doi:10.12795/iestscientia.2018.i02.04.

Carrillo C, Toro M, Bolivar M, Seijas ME, Rotondo J. 2018. La epigenética en el tratamiento del dolor. Revista de la Sociedad Española del Dolor 25:166-169. doi:10.20986/resed.2017.3620/2017.

Casseb SM, Simith DB, Melo KF, Mendonça MH, Santos AC, Carvalho VL, Cruz AC, Vasconcelos PF. 2016. Drosha, DGCR8, and Dicer mRNAs are down-regulated in human cells infected with dengue virus 4, and play a role in viral pathogenesis. Genetics and Molecular Research 15:gmr.15027891. doi:10.4238/gmr.15027891.

Cavagnari BM. 2012. Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. Archivos Argentinos de Pediatría 110:132-136. doi:10.5546/aap.2012.132.

Chen X, Yang T, Wang W, Xi W, Zhang T, Li Q, Yang A, Wang T. 2019. Circular RNAs in immune responses and immune diseases. Theranostics 9:588-607. doi:10.7150/thno.29678.

Chmurzynska A. 2010. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. Nutrition Reviews 68:87-98.

Choi S, Lee K, Jung H, Park N, Kang J, Nam K-H, Kim E-K, Ju JH, Kang KY. 2018. Krüppel-like factor 4 positively regulates autoimmune arthritis in mouse models and rheumatoid arthritis in patients via modulating cell survival and inflammation factors of fibroblast-like synoviocyte. Frontiers in Immunology 9:1339. doi:10.3389/fimmu.2018.01339.

Ci Y, Liu ZY, Zhang NN, Niu Y, Yang Y, Xu C, Yang W, Qin CF, Shi L. 2020. Zika NS1-induced ER remodeling is essential for viral replication. The Journal of Cell Biology 219:e201903062. doi:10.1083/jcb.201903062.

Ci Y, Shi L. 2021. Compartmentalized replication organelle of flavivirus at the ER and the factors involved. Cellular and Molecular Life Sciences 78:4939-4954. doi:10.1007/s00018-021-03834-6.

Cliffe AR, Coen DM, Knipe DM. 2013. Kinetics of facultative heterochromatin and polycomb group protein association with the herpes simplex viral genome during establishment of latent infection. mBio 4:e00590-12. doi:10.1128/mBio.00590-12.

Coffey LL, Vasilakis N, Brault AC, Powers AM, Tripet F, Weaver SC. 2008. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:6970-6975.

Conceição MG, França CE, Conceição SMP. 2020. Identificação de microRNAs modificados em doenças autoimunes. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento 5:114-120. doi:10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/doencas-autoimunes.

Dahmer MK, Cornell T, Quasney MW. 2016. Genetic and epigenetic factors in the regulation of the immune response. Current Opinion in Pediatrics 28:281-286.

Dai Z, Etebari K, Asgari S. 2022. N6-methyladenosine modification of the Aedes aegypti transcriptome and its alteration upon dengue virus infection in Aag2 cell line. Communications Biology 5:607. doi:10.1038/s42003-022-03566-8.

Das M, Deb M, Laha D, Joseph M, Kanji S, Aggarwal R, Iwenofu OH, Pompili VJ, Jarjour W, Das H. 2019. Myeloid Krüppel-like factor 2 critically regulates K/BxN serum-induced arthritis. Cells 8:908. doi:10.3390/cells8080908.

De Aguiar GPCG, Leite CMGS, Dias B, Vasconcelos SMM, de Moraes RA, de Moraes MEA, Vallinoto ACR, Macedo DS, Cavalcanti LPG, Miyajima F. 2019. Evidence for Host Epigenetic Signatures Arising From Arbovirus Infections: A Systematic Review. Frontiers in Immunology 10:1207.

Deaton AM, Bird A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. Genes & Development 25:1010-1022.

Delpu Y, Larrieu D, Gayral M, Arvanitis D, Dufresne M, Cordelier P, Torrisani J. 2016. Noncoding RNAs: Clinical and Therapeutic Applications. In: Drug Discovery in Cancer Epigenetics, Egger G and Arimondo PB (eds). Academic Press: Amsterdam, pp. 305-326.

De Rosa S, Arcidiacono B, Chiefari E, Brunetti A, Indolfi C, Foti DP. 2018. Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. Frontiers in Endocrinology 9:2.

Desiderio A, Spinelli R, Ciccarelli M, Nigro C, Miele C, Beguinot F, Raciti GA. 2016. Epigenetics: spotlight on type 2 diabetes and obesity. Journal of Endocrinological Investigation 39:1095-1103.

Dhanwani R, Khan M, Lomash V, Rao PVL, Ly H, Parida M. 2014. Characterization of Chikungunya virus induced host response in a mouse model of viral myositis. PLoS ONE 9:e92813. doi:10.1371/journal.pone.0092813.

Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, Meduri E, Morange PE, Gagnon F, Grallert H, Waldenberger M, Peters A, Erdmann J, Hengstenberg C, Cambien F, Goodall AH, Ouwehand WH, Schunkert H, Thompson JR, Spector TD, Gieger C, Trégouët DA, Deloukas P, Samani NJ. 2014. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. The Lancet 383:1990-1998.

Dupont C, Armant DR, Brenner CA. 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. Seminars in Reproductive Medicine 27:351-357.

Farelo MA, Korrou-Karava D, Brooks KF, Russell TA, Maringer K, Mayerhofer PU. 2022. Dengue and Zika Virus Capsid Proteins Contain a Common PEX19-Binding Motif. Viruses 14:253. doi:10.3390/v14020253.

Farooqi AA, Fuentes-Mattei E, Fayyaz S, Raj P, Goblirsch M, Poltronieri P, Calin GA. 2019. Interplay between epigenetic abnormalities and deregulated expression of microRNAs in cancer. Seminars in Cancer Biology 58:47-55.

Feldstein LR, Rowhani-Rahbar A, Staples JE, Weaver MR, Halloran ME, Ellis EM. 2017. Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus Outbreak, US Virgin Islands, December 2014-February 2016. Emerging Infectious Diseases 23:673-676.

Finkelstein JD. 1998. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. European Journal of Pediatrics 157(Suppl 2):S40-S44.

Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross M-S, Junien C. 2007. Nutri-epigenomics: lifelong remodelling of our epigenomes by nutritional and metabolic factors and beyond. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 45:321-327.

Garay-Morán C, Román-Pedroza JF, López-Martínez I, Rodríguez-Martínez JC, Ruiz-Matus C, Kuri-Morales P, Díaz-Quiñonez JA. 2017. Clinical and epidemiological characterization of chikungunya fever in Mexico. Revista Panamericana de Salud Pública 41:e65. doi:10.26633/RPSP.2017.65.

Gérardin P, Medina-Santos R, Le Clerc S, Bruneau L, Maillot A, Labib T, Rahmouni M, Spadoni J-L, Meyniel J-P, Cornet C, Lefebvre C, El Jahrani N, Savara J, Mathew MJ, Fontaine C, Payet C, Ah-You N, Chabert C, Mussard C, Porcherat S, Medjane S, Noirel J, Marimoutou C, Hocini H, Zagury J-F. 2025. Transcriptomic analysis of chronic chikungunya in the Reunionese CHIKGene cohort uncovers a shift in gene expression more than 10 years after infection. Travel Medicine and Infectious Disease 65:102825. doi:10.1016/j.tmaid.2025.102825.

Gokhale NS, McIntyre ABR, Mattocks MD, Holley CL, Lazear HM, Mason CE, Horner SM. 2019. Altered m6A modification of specific cellular transcripts affects Flaviviridae infection. Molecular Cell 77:542-555.e8.

Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. 2017. Emerging arboviruses: Why today? One Health 4:1-13.

Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang B-T, Kim VN. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell 125:887-901.

Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M. 2009. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. Cancer Research 69:2766-2774.

Hossain S, Choudhury MR, Islam MA, Hassan MM, Yeasmin S, Hossain F, Zaman MM. 2022. Post-chikungunya arthritis: A longitudinal study in a tertiary care hospital in Bangladesh. Tropical Medicine and Health 50:21. doi:10.1186/s41182-022-00412-9.

Hussain M, Torres S, Schnettler E, Funk A, Grundhoff A, Pijlman G, Khromykh A, Asgari S. 2012. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3′ untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. Nucleic Acids Research 40:2210-2223. doi:10.1093/nar/gkr848.

Iyer LM, Zhang D, Aravind L. 2016. Adenine methylation in eukaryotes: Apprehending the complex evolutionary history and functional potential of an epigenetic modification. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology 38:27-40.

Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, Plösch T. 2012. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. Biochimie 94:2242-2263.

Jirtle RL, Skinner MK. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nature Reviews Genetics 8:253-262.

Jupille H, Vega-Rua A, Rougeon F, Failloux A-B. 2014. Arboviruses: variations on an ancient theme. Future Virology 9:733-751.

Kadayifci FZ, Zheng S, Pan Y-X. 2018. Molecular Mechanisms Underlying the Link between Diet and DNA Methylation. International Journal of Molecular Sciences 19. doi:10.3390/ijms19124055.

Kakumani K, Ponia S, Sood V, Chinnappan M, Banerjea C, Medigeshi R, Malhotra P, Mukherjee K, Bhatnagar K. 2013. Role of RNA interference (RNAi)

in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. Journal of Virology 87:8870-8883. doi:10.1128/JVI.02774-12.

Kanwal R, Gupta S. 2012. Epigenetic modifications in cancer. Clinical Genetics 81:303-311.

Keirsebelik MSG, David MR, Pavan MG, Couto-Lima D, Palomino M, Rahman RU, Hoffmann AA, Bahia AC, Caljon G, Maciel-de-Freitas R. 2024. Dengue virus serotype 1 effects on mosquito survival differ among geographically distinct Aedes aegypti populations. Insects 15:393.

Kim AS, Zimmerman O, Fox JM, Nelson CA, Basore K, Zhang R, Durnell L, Desai C, Bullock C, Deem SL, Oppenheimer J, Shapiro B, Wang T, Cherry S, Coyne CB, Handley SA, Landis MJ, Fremont DH, Diamond MS. 2020. An Evolutionary Insertion in the Mxra8 Receptor-Binding Site Confers Resistance to Alphavirus Infection and Pathogenesis. Cell Host & Microbe 27:428-440.e9. doi:10.1016/j.chom.2020.01.008.

Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S. 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. Cellular and Molecular Life Sciences 66:596-612.

Kulis M, Esteller M. 2010. DNA methylation and cancer. Advances in Genetics 70:27-56.

Kuss-Duerkop SK, Westrich JA, Pyeon D. 2018. DNA tumor virus regulation of host DNA methylation and its implications for immune evasion and oncogenesis. Viruses 10:82. doi:10.3390/v10020082.

Lewis H, Kelnhofer-Millevolte L, Brinkley M, Arbach H, Arnold E, Ramachadran S, Avgousti D. 2022. HSV-1 exploits host heterochromatin for egress. bioRxiv. doi:10.1101/2022.05.31.494218.

Li Z, Wang J, Lin Y, Fang J, Xie K, Guan Z, Ma H, Yuan L. 2022. Newly discovered circRNAs in rheumatoid arthritis, with special emphasis on functional roles in inflammatory immunity. Frontiers in Pharmacology 13:983744. doi:10.3389/fphar.2022.983744.

Lillycrop KA, Burdge GC. 2014. Environmental challenge, epigenetic plasticity and the induction of altered phenotypes in mammals. Epigenomics 6:623-636.

Lister R, Adams E, Fitzgerald S, Fone W, Hamer J, Lindholm M, McCartney R, Moström J, Sanders K, Seppälä O, Simon B, Thomas L. 2005. A Multi-National

Study of Reading and Tracing Skills in Novice Programmers. ACM SIGCSE Bulletin 36:119-150. doi:10.1145/1044550.1041673.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Mann J. 2017. Epigenetics in Liver Disease. In: Liver Pathophysiology, Muriel P (ed). Academic Press: Amsterdam, pp. 199-211.

Martínez JA, Milagro FI, Claycombe KJ, Schalinske KL. 2014. Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes. Advances in Nutrition 5:71-81.

Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. 2017. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. Acta Tropica 166:155-163.

McKinsey TA. 2011. Targeting inflammation in heart failure with histone deacetylase inhibitors. Molecular Medicine 17:434-441.

Meltzer E. 2012. Arboviruses and viral hemorrhagic fevers (VHF). Infectious Disease Clinics of North America 26:479-496.

Milavetz BI, Balakrishnan L. 2015. Viral epigenetics. Methods in Molecular Biology 1238:569-596.

Monteagudo-Sánchez A, Noordermeer D, Greenberg MVC. 2024. The impact of DNA methylation on CTCF-mediated 3D genome organization. Nature Structural & Molecular Biology 31:404-412. doi:10.1038/s41594-024-01056-2.

Morandini AC, Santos CF, Yilmaz Ö. 2016. Role of epigenetics in modulation of immune response at the junction of host-pathogen interaction and danger molecule signaling. Pathogens and Disease 74. doi:10.1093/femspd/ftw082.

Mukherjee S, Vipat VC, Chakrabarti AK. 2013. Infection with influenza A viruses causes changes in promoter DNA methylation of inflammatory genes. Influenza and Other Respiratory Viruses 7:979-986.

Murillo-Zamora E, Mendoza-Cano O, Trujillo-Hernández B, Sánchez-Piña RA, Guzmán-Esquivel J. 2017. Persistent arthralgia and related risks factors in laboratory-confirmed cases of Chikungunya virus infection in Mexico. Revista Panamericana de Salud Pública, Pan American Journal of Public Health 41:1.

Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS. 2013. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 72:110-117. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201526.

Nakano K, Boyle DL, Firestein GS. 2013. Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. Journal of Immunology 190:1297-1303. doi:10.4049/jimmunol.1202572.

Namba-Fukuyo H, Funata S, Matsusaka K, Fukuyo M, Rahmutulla B, Mano Y, Fukayama M, Aburatani H, Kaneda A. 2016. TET2 functions as a resistance factor against DNA methylation acquisition during Epstein-Barr virus infection. Oncotarget 7:81512-81526.

Pagani I, Poli G, Vicenzi E. 2021. TRIM22: A multitasking antiviral factor. Cells 10:1864. doi:10.3390/cells10081864.

Paschos K, Allday MJ. 2010. Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. Trends in Microbiology 18:439-447.

Pekáčová A, Baloun J, Švec X. 2022. Non-coding RNAs in diseases with a focus on osteoarthritis. WIREs RNA 13:e1756. doi:10.1002/wrna.1756.

Peng JC, Karpen GH. 2008. Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. Current Opinion in Genetics & Development 18:204-211.

Pereira Nunes GH, Londe de Lima MF, Capelari Orsolin P. 2023. The cooperation between genetic and epigenetic factors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Research, Society and Development 12:e3881227383. doi:10.33448/rsd-v12i2.38806.

Periyasamy P, Thangaraj A, Guo M-L, Hu G, Callen S, Buch S. 2018. Epigenetic Promoter DNA Methylation of miR-124 Promotes HIV-1 Tat-Mediated Microglial Activation via MECP2-STAT3 Axis. The Journal of Neuroscience 38:5367-5383.

Petit de Molero N. 2023. Programación fetal y modificaciones epigenéticas relacionadas con el maltrato intrauterino. Colección Razetti 28. doi:10.59542/CRANM.2023.XXVIII.8.

Pierard V, Guiguen A, Colin L, Wijmeersch G, Vanhulle C, Van Driessche B, Dekoninck A, Blazkova J, Cardona C, Merimi M, Vierendeel V, Calomme C, Nguyen TL-A, Nuttinck M, Twizere J-C, Kettmann R, Portetelle D, Burny A, Hirsch I, Rohr O, Van Lint C. 2010. DNA cytosine methylation in the bovine

leukemia virus promoter is associated with latency in a lymphoma-derived B-cell line: Potential involvement of direct inhibition of cAMP-responsive element (CRE)-binding protein/CRE modulator/activation transcription factor binding. Journal of Biological Chemistry 285:19441-19449. doi:10.1074/jbc.M110.107607.

Pion M, Jaramillo-Ruiz D, Martínez A, Muñoz-Fernández MA, Correa-Rocha R. 2013. HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene. AIDS 27:2019-2029.

Portela A, Esteller M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. Nature Biotechnology 28:1057-1068.

Putiri EL, Robertson KD. 2011. Epigenetic mechanisms and genome stability. Clinical Epigenetics 2:299-314.

Reddi TS, Merkl PE, Lim S-Y, Letvin NL, Knipe DM. 2021. Tripartite Motif 22 (TRIM22) protein restricts herpes simplex virus 1 by epigenetic silencing of viral immediate-early genes. PLoS Pathogens 17:e1009281. doi:10.1371/journal.ppat.1009281.

Robinson MC. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952-1953. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 49:28-32.

Rodrigues Faria N, Lourenço J, Marques de Cerqueira E, Maia de Lima M, Pybus O, Carlos Junior Alcantara L. 2016. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. PLoS Currents 8. doi:10.1371/currents.outbreaks.c97507e3e48efb946401755d468c28b2.

Rojas DP, Barrera-Fuentes GA, Pavia-Ruz N, Salgado-Rodriguez M, Che-Mendoza A, Manrique-Saide P, Vazquez-Prokopec GM, Halloran ME, Longini IM, Gomez-Dantes H. 2018. Epidemiology of dengue and other arboviruses in a cohort of school children and their families in Yucatan, Mexico: Baseline and first year follow-up. PLoS Neglected Tropical Diseases 12:e0006847. doi:10.1371/journal.pntd.0006847.

Rouha H, Thurner C, Mandl C. 2010. Functional microRNA generated from a cytoplasmic RNA virus. Nucleic Acids Research 38:8328-8337. doi:10.1093/nar/gkq681.

Sadakierska-Chudy A, Filip M. 2015. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. Neurotoxicity Research 27:172-197.

Sajith A, Iyengar V, Varamballi P, Mukhopadhyay C, Nittur S. 2025. Diagnostic utility of real-time RT-PCR for chikungunya virus detection in the acute phase of infection: A retrospective study. Annals of Medicine 57:2523559. doi:10.1080/07853890.2025.2523559.

Sajjad N, Wang S, Liu P. 2021. Functional roles of non-coding RNAs in the interaction between host and influenza A virus. Frontiers in Microbiology 12:123456. doi:10.3389/fmicb.2021.742984.

Saxena T, Tandon B, Sharma S, Chameettachal S, Ray P, Ray AR, Kulshreshtha R. 2013. Combined miRNA and mRNA signature identifies key molecular players and pathways involved in chikungunya virus infection in human cells. PLoS ONE 8:e79886.

Selvamani SP, Mishra R, Singh SK. 2014. Chikungunya virus exploits miR-146a to regulate NF-κB pathway in human synovial fibroblasts. PLoS ONE 9:e103624.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. 2010. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis 31:27-36.

Smith ZD, Meissner A. 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. Nature Reviews Genetics 14:204-220.

Sweatt JD, Nestler EJ, Meaney MJ, Akbarian S. 2013. An Overview of the Molecular Basis of Epigenetics. In: Epigenetic Regulation in the Nervous System, Sweatt JD, Meaney MJ, Nestler EJ and Akbarian S (eds). Elsevier: Amsterdam, pp. 3-33.

Tammen SA, Friso S, Choi S-W. 2013. Epigenetics: the link between nature and nurture. Molecular Aspects of Medicine 34:753-764.

Tanaka J, Ishida T, Iwakura Y. 2003. Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle-dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. AIDS 17:209-217. doi:10.1097/00002030-200301240-00005.

Triantaphyllopoulos KA, Ikonomopoulos I, Bannister AJ. 2016. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. Epigenetics & Chromatin 9:1-18.

Tsai C-L, Li H-P, Lu Y-J, Hsueh C, Liang Y, Chen C-L, Tsao SW, Tse K-P, Yu J-S, Chang Y-S. 2006. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 Involves c-Jun NH (2)-terminal kinase signaling. Cancer Research 66:11668-11676.

Van Duijl-Richter MKS, Hoornweg TE, Rodenhuis-Zybert IA, Smit JM. 2015. Early events in Chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion. Viruses 7:3647-3674. doi:10.3390/v7072792.

Vasilakis N, Lambert A, MacLachlan NJ, Brault AC. 2016. Genomic Organization of Arboviral Families. In: Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control, Vasilakis N and Gubler DJ (eds). Caister Academic Press: Poole, UK, pp. 31-44.

Vásquez-Moctezuma I, Fernández-Navarrete E, Márquez-Mendoza JM, Luna-Palencia GR. 2020. Epigenética del cáncer de mama. Revista Mexicana de Mastología 10:39-47. doi:10.35366/97713.

Waddington CH. 2012. The epigenotype. (1942). International Journal of Epidemiology 41:10-13.

Wang J, Zhang L, Cui X, Xu X, Guo R, Li K, Zhang L, Xu B, Jiang C, Yu Y. 2025. Bcl11a maintains hematopoietic stem cell function but accelerates inflammation-driven exhaustion during aging. Science Immunology 10:eadr2041. doi:10.1126/sciimmunol.adr2041.

Wang X, Huang P, Lei M, Ma Y, Chen H, Sun J, Hu Y, Shi J. 2023. Global expression and functional analysis of human piRNAs during HSV-1 infection. Virus Research 328:199087. doi:10.1016/j.virusres.2023.199087.

Wei J-W, Huang K, Yang C, Kang C-S. 2017. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). Oncology Reports 37:3-9.

Whitaker JW, Shoemaker R, Boyle DL, Hillman J, Anderson D, Wang W, Firestein GS. 2013. An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype. Genome Medicine 5:40. doi:10.1186/gm444.

Wille CK, Nawandar DM, Panfil AR, Ko MM, Hagemeier SR, Kenney SC. 2013. Viral genome methylation differentially affects the ability of BZLF1 versus BRLF1 to activate Epstein-Barr virus lytic gene expression and viral replication. Journal of Virology 87:935-950. doi:10.1128/JVI.01790-12.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature Cell Biology 11:228-234.

Withers JB, Mondol V, Pawlica P, Rosa-Mercado NA, Tycowski KT, Ghasempur S, Torabi SF, Steitz JA. 2019. Idiosyncrasies of Viral Noncoding RNAs Provide Insights into Host Cell Biology. Annual Review of Virology 6:297-317. doi:10.1146/annurev-virology-092818-015811.

Wong RR, Abd-Aziz N, Affendi S, Poh CL. 2020. Role of microRNAs in antiviral responses to dengue infection. Journal of Biomedical Science 27:4.

Wu CT, Morris JR. 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. Science 293:1103-1105.

Wu Z, Lepcha TT, Zhou D, He Z, Fiches GN, Park Y, He J, Chen J, Shanaka KASN, Oghumu S, Zhao W, Ma A, Ma Q, Zhu J, Santoso NG. 2025. Analysis of head and neck cancer scRNA-seq data identified PRDM6 promotes tumor progression by modulating immune gene expression. Frontiers in Immunology 16:1596916.

You J, Hou S, Malik-Soni N, Xu Z, Kumar A, Rachubinski RA, Frappier L, Hobman TC. 2015. Flavivirus Infection Impairs Peroxisome Biogenesis and Early Antiviral Signaling. Journal of Virology 89:12349-12361. doi:10.1128/JVI.01365-15.

Youngblood B, Noto A, Porichis F, Akondy RS, Ndhlovu ZM, Austin JW, Bordi R, Procopio FA, Miura T, Allen TM, Sidney J, Sette A, Walker BD, Ahmed R, Boss JM, Sékaly R-P, Kaufmann DE. 2013. Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells. Journal of Immunology 191:540-544.

Zaid A, Gérardin P, Taylor A, Mostafavi H, Malvy D, Mahalingam S. 2018. Chikungunya arthritis: Implications of acute and chronic inflammation mechanisms on disease management. Arthritis & Rheumatology 70.

Zamudio-Meza H, Castillo-Álvarez A, González-Bonilla C, Meza I. 2009. Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. Journal of General Virology 90:2902-2911. doi:10.1099/vir.0.014159-0.

Zhang G, Pradhan S. 2014. Mammalian epigenetic mechanisms. IUBMB Life 66:240-256.

Zhang Q, Cao X. 2019. Epigenetic regulation of the innate immune response to infection. Nature Reviews Immunology 19:417-432.

12. ANEXOS.

ANEXO A

TÉCNICAS Y PROTOCOLOS

CULTIVO CELULAR

1. SUPLEMENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning.

Cat. 4488. Puntillas de 10, 100 y 1000 µL

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Pipetor.
- Microscopio
- Incubadora de CO_2
- Centrifuga

Reactivos

- HFLS Growth Medium 500 mL Cell applications. cat. 414-500
- Medio MEM 500 mL (Eagle's Minimal Essential Medium**)**

ThermoScientific, cat. 12492013

- Suero Bovino Fetal. 500 mL. HyClone. Cat. sh30396.03.
- Solución de antibiótico-antimicótico (100X) Penicilina
- Estreptomicina Anfotericina B, 100 mL, In vitro, S.A. Cat. A-07.
- Tripsina EDTA 1x Corning, cat. 25-053-CI

I. HFLS Growth Medium (Human Fibroblast-Like Synoviocytes)

Protocolo

a) Medio al 10% SBF para mantenimiento de células de sinoviocitos. Para suplementar 500 mL de medio se requieren 50 mL de suero bovino fetal, 5.5 mL de solución antibiótico/antimicótico (100X). El medio al 10% es el que se debe utilizar para subcultivar.

b) Medio al 2% SBF para infección viral de células Vero-76. El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% con respecto al SBF. A 500 mL de medio L-15 se añaden 10 mL SBF + 5 mL de antibiótico/antimicótico.

II. Medio MEM (Eagle's Minimal Essential Medium**)**

Protocolo

a) Medio al 10% SBF para mantenimiento de células Vero-76. Para suplementar 500 mL de medio se requieren 50 mL de suero bovino fetal, 5.5 mL de solución antibiótico/antimicótico (100X). El medio al 10% es el que se debe utilizar para subcultivar.

b) Medio al 2% SBF para infección viral de células Vero-76. El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% con respecto al SBF. A 500 mL de medio L-15 se añaden 10 mL SBF + 5 mL de antibiótico/antimicótico.

MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

Protocolo de Expansión de Células Vero

1. Tomar un vial de células Vero (-80°C) para descongelar a baño maría de 2 minutos de incubación.
2. Añadir en un tubo falcon de 15 ml con 5 ml de medio de cultivo el vial descongelado de las células Vero.
3. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
4. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón de células en 1 mL de

medio de cultivo.

5. Colocar en una botella de T75 10 mL de medio y 1 mL de medio donde se resuspendieron las células

6. Incubar las células a 37°C y 5% CO2, hasta tener un 80-85 % de confluencia.

Pasaje celular

1. Retirar el medio de cultivo viejo por aspiración.

2. Lavar las células con una alícuota de PBS estéril 1X, por cada 25 cm2 de superficie se debe emplear 1 mL de buffer de lavado. Realizar movimientos circulares para permitir que la solución entre en contacto con todas las unidades de la monocapa y pueda remover la mayor cantidad posible de detrito celular.

3. Retirar el PBS 1X por aspiración.

4. Añadir tripsina a las células en una botella de 25 cm^2, se levantan con 1 mL de tripsina. Las de una botella de 75 cm2 se levantan con 3 mL de tripsina.

5. Incubar a 37°C durante 5 minutos. Procurar no exceder el tiempo para que la enzima no comience a degradar la membrana celular.

6. Neutralizar la actividad de la tripsina adicionando un volumen 1:1 de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal.

7. Recolectar la suspensión celular en un tubo falcón de 15 mL.

8. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

9. Cuidadosamente retirar el medio de cultivo utilizado para neutralizar la tripsina.

10. Añadir medio de cultivo nuevo dependiendo del tamaño del botón celular obtenido.

11. Resuspender completamente con ayuda de una pipeta de 2 mL (o con una puntilla de 1000 µL) el botón celular en el medio nuevo hasta observar que no hay cúmulos flotando.

12. Preparar la botella de cultivo a sembrar con la cantidad de medio nuevo correspondiente y depositar en ella el volumen deseado de la suspensión celular.

13. Incubar a 37 °C con 5% CO2 hasta una confluencia de 80-85%.

RECUENTO CELULAR

Protocolo

1. Procesar las botellas de cultivo hasta la resuspensión y disgregación en medio nuevo de las células. Procurar una disgregación completa, sin que el medio presente cúmulos del cultivo flotando o suspendidos.
2. Tomar una alícuota de 60 µL de medio de cultivo nuevo y depositarla en un tubo cónico de 200 µL.
3. Medir una alícuota de 10 µL de la suspensión celular y depositarla en el tubo cónico del 200 µL.

Procurar homogeneizar completamente antes de realizar la medición, puesto que de forma natural las células precipitan volviendo a formar el botón al fondo del tubo donde se centrifugaron.

4. Medir 10 µL del colorante azul tripano y colocarla en el tubo cónico de 200 µL
5. Mezclar con ayuda de una puntilla de 200 µL el volumen del tubo, subiendo y bajando su contenido sin formar burbujas.
6. Depositar 10 µL de la suspensión celular con colorante en la cámara de Neubauer.
7. Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, contar el número de células vivas en las cuatro cuadrículas de 4 x 4 de la cámara (Figura 26, números 1, 2, 3 y 4). Registrar los números.

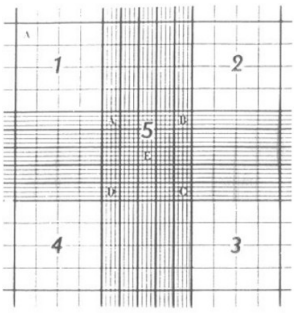


Figura suplementaria 1: Esquema de la cuadricula de la cámara de Neubauer.

8. Contar el número de células en el cuadrante central de 5 x 5 (Figura 26, número 5). Registrar la cantidad.

9. Realizar el cálculo del total de células empleando la siguiente fórmula:

No. células/mL = (Promedio 4 x 4) (Factor de dilución) (1x 10^4)

10. El número obtenido con el promedio de las cuadrículas de 4 x 4 debe ser similar al cálculo realizado con el total de células en la cuadrícula central de 5 x 5.

11. Multiplicar el número de células/mL por el volumen en el cual se resuspendieron y disgregaron las células del cultivo para obtener la cantidad total de células producidas.

12. Con respecto al total de células contabilizadas y el volumen total, colocar el volumen correspondiente al número de células deseado en la botella o placa de cultivo.

CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Protocolo

1. Cosechar células Vero-76 y/o células de Sinoviocitos, siguiendo el protocolo de subcultivo hasta la obtención del botón celular.
2. Remover completamente el medio utilizado para neutralizar la tripsina, empleando una micropipeta de 1000 µL y procurando no romper el botón celular.
3. Resuspender las células en medio de cultivo con 10% de suero bovino fetal, se debe obtener una suspensión con una concentración final de 1 a 1.5 millones de células por mL.
4. Preparar crioviales a congelar, rotular con nombre de la línea celular, así como el número de pasaje y fecha.
5. Depositar en cada criovial 100 µL de DMSO.
6. Depositar en cada vial 900 µL de la suspensión de células en medio y suero.
7. Almacenar las células en el Mr. Frosty y colocarlo en el ultracongelador Revco a - 80°C. Las células congeladas y almacenadas a esta temperatura tienen una caducidad aproximada de un año.

INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON VCHIK

CULTIVO VIRAL: AMPLIFICACIÓN DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN LÍNEAS CELULARES.

1. Sembrar células Vero-76 hasta obtener una monocapa confluente bajo las condiciones indicadas en el protocolo anteriormente descrito.
2. Desechar medio de cultivo por decantación.
3. Lavar células con 3 mL de solución PBS 1X para remover el detrito celular.
4. Agregar medio con 2% SBF (con la finalidad de que las células se mantengan vivas, pero evitar que sigan duplicándose), en un volumen adecuado para cubrir solamente las células.
5. Adicionar al medio 100 – 150 µL del aislado viral o sobrenadantes de cultivos previamente infectados
6. Homogeneizar botella con movimientos circulares para asegurar que el virus tenga contacto con la monocapa celular completa.
7. Incubar a 37ºC durante una hora al menos.
8. Transcurrida la hora de incubación, completar volumen del medio de cultivo a los indicados en el apartado de subcultivo celular.
9. Incubar las células (37°C con 5% de CO_2), los días siguientes se realiza observación microscópica para identificar cambios morfológicos en las células que indiquen muerte celular.

COSECHA Y ALMACENAMIENTO DE AISLADOS VIRALES

1. Transcurridos de 5 a 7 días de la infección celular, se puede cosechar el virus.
2. Si el cultivo se hizo en tubo, vortexear para desprender las células. Si el cultivo se realizó en frascos, raspar con gendarme. No hacer lavados con PBS.
3. Recolectar medio de cultivo y centrifugar para empaquetar las células.
4. Del sobrenadante colectar alícuotas.
5. Preparar la mezcla para congelación de los sobrenadantes.
7. Almacenar a -80ºC hasta su uso.

PROTOCOLO DE TITULACIÓN VIRAL

Carboximetilcelulosa al 1.6%

1. Pesar 2 g de carboximetilcelulosa de viscosidad media y adicionarlos lentamente a 125 mL de agua mili Q. Hacer esta mezcla en un frasco de vidrio de 250 mL de capacidad.
2. Dar agitación mecánica a la suspensión hasta que se disuelva todo el sólido o hasta que la viscosidad de la mezcla impida que el agitador magnético realice su función de forma correcta.
3. Esterilizar inmediatamente y almacenar a 4°C.

Carboximetilcelulosa al 0.8% en medio MEM.

1. En el frasco donde se preparó la carboximetilcelulosa al 1.6%, adicionar bajo condiciones de esterilidad, 125 mL de medio MEM 2X.
2. Empleando agitación magnética homogeneizar la mezcla sin generar muchas burbujas en su interior.
3. Almacenar a 4°C y no abrir la botella fuera de la campana de cultivo celular.

Naphtol Blue Black para tinción de placas

1. Pesar 250 mg de Naphtol Black Blue, 3.4 g de acetato de sodio y disolver en 200 mL de agua miliQ empleando agitación magnética.
2. Adicionar 15 mL de ácido acético glacial y aforar a 250 mL con agua miliQ.
3. Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Almacenar a temperatura ambiente, protegido de la luz con papel aluminio.

MONTAJE DEL ENSAYO E INFECCIÓN VIRAL.

1. Sembrar previamente células Vero-76 en formato de 12 pozos, empleando una densidad de siembra de 2.5 x 10^5 células/pozo y permitir que la confluencia aumente a un 80% en el transcurso de 48 horas antes de infectarse.
2. Preparar diluciones seriadas del concentrado viral, 1:10, 1:1x10^2, 1:1x10^3, 1:1x10^4, 1:1x10^5, 1:1x10^6.

4. Incubar 10 minutos a 37°C las diluciones virales seriadas.
5. Remover por aspiración el medio de cultivo de las células, excepto a las células de los pozos NTC. Rotular la placa con los datos pertinentes.
6. Añadir 200 µL de la dilución viral más baja al pozo correspondiente y su duplicado. Cubriendo con la tapa de la placa los pozos cercanos para que no se contaminen entre ellos.
7. Sin cambiar la puntilla, continuar colocando las siguientes diluciones virales en los pozos correspondientes en orden de concentración creciente.
8. Incubar la placa durante una hora a 37°C.
9. Transcurrido el tiempo, adicionar 1 mL de CMC 0.8% a cada pozo.
10. Incubar durante 3-5 días a 37°C/5% CO2.

TINCIÓN DE PLACAS

1. Remover medio con CMC por aspiración.
2. Añadir Naphtol Black blue a cada pozo cubriendo la monocapa completamente, aproximadamente 1 mL.
3. Incubar a temperatura ambiente las placas durante 30 minutos.
4. Lavar la placa decantando el colorante en la tarja y sumergiéndola en un molde con agua. Repetir tres veces este paso.
5. Sacudir placa teñida en una toalla de papel y una vez seca, realizar el recuento de focos líticos.

RECUENTO DE FOCOS LÍTICOS

1. Contar el número de focos líticos en cada pozo hasta donde se puedan observar bien definidos.
2. Dividir entre 200 µL el número de placas líticas contadas y multiplicarlas por 1000 µL. Multiplicar el resultado obtenido por el valor de la dilución más baja en donde se observan las placas.
3. En caso de que exista disparidad entre los resultados de los duplicados, promediar los títulos obtenidos entre ellos.

PROTOCOLOS PARA MANEJO DE ADN

Extracción ADN

1. Homogenizar la muestra y 300 µl de la muestra y colocarla en un tubo de microcentrífuga.
2. Añadir 20 µl de proteinasa K y 200 µl de Buffer ATL a la muestra.
3. Mezclar suavemente mediante inversión o vortex.
4. Incubar a 56 °C durante 10-30 minutos para permitir la lisis celular completa.
5. Añadir 200 µl de etanol absoluto a la mezcla. Mezclar suavemente.
6. Transferir la mezcla a una columna QIAamp y centrifugar a 6,000 x g durante 1 minuto para que el ADN se adhiera a la membrana de la columna.
7. Desechar el filtrado y añadir 500 µl de Buffer AW1 a la columna. Centrifugar a 6,000 x g durante 1 minuto.
8. Desechar el filtrado nuevamente y añadir 500 µl de Buffer AW2 a la columna.
9. Centrifugar a 20,000 x g durante 3 minutos para eliminar residuos de etanol.
10. Colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga y añadir 200 µl de Buffer AE (o agua libre de nucleasas) en el centro de la membrana.
11. Incubar a temperatura ambiente durante 1-2 minutos y centrifugar a 6,000 x g durante 1 minuto para eluir el ADN.
12. Almacenar el ADN eluido a -20 °C o -80°C para su uso posterior.

Protocolo con el kit de conversión Directo de Metilación de ADN

Preparación de la Mezcla de Conversión Bisulfito:

1. Adicionar 20 ul de la muestra y 130 de CT Conversión Reagent en un tubo de 0.2 mL, mezclar y centrifugar.

2. Colocar los tubos en un termocilcador con los sigueintes pasos:

1. 98° C por 8 minutos
2. 64° C por 3.5 horas

3. Se puede almacenar a 4° C por 20 horas (este es un punto de paro).

4. Agregar 600 ul de M-bindindg buffer en una columna de Symo-spin, colocar la columna dentro de un tubo colector.

5. Invertir la columna varias veces, centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos, descartar el sobrenadante.

6. Agregar 100 ul de M-Wash buffer a la columna, centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos, descartar el sobrenadante.

7. Agregar 200 ul de M-desulphonation buffer a la columna y dejar secar la columna a temperatura ambiente (20-30°C) por 15-20 minutos. Después de la incubación centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos, descartar el sobrenadante.

8. Adicionar otros 200 ul de M-wash buffer y centrifugar por otros 30 segundos adicionales.

9. Coloque la columna dentro de un tubo de 1.5 mL y agregue 10 ul de M-elution buffer directamente a la membrana de la columna, centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos para eluir el ADN.

- Recuperar esta elución esta muestra de ADN está lista para su análisis o puede almacenarse a -20 hasta su uso, para almacenaje prolongado congelar las muestras a -70°C. El ADN eluido puede ser utilizado directamente en técnicas como PCR específica de metilación (MSP), secuenciación sanger o secuenciación de próxima generación (NGS).

Tabla Suplementaria 1: Primers para los cuatro mecanismos epigenéticos (metilación, biogénesis de miRNAs, modificaciones de histonas y regulación de cromatina)

Nombre cebador	Secuencia cebador (5'-3')	Tamaño de producto en pb
DNMT1-F	GGCGGCTCAAAGATTTGGAA	161
DNMT1-R	CAGGTAGCCCTCCTCGGATA	
DNMT3A-F	GGCCATACGGTGGAGCC	120
DNMT3A-R	TATCGTGGTCTTTGGAGGCG	
DNMT3B-F	TCGTGCAGGCAGTAGGAAAT	177
DNMT3B-R	GAAGCCATTTGTTCTCGGCTC	
DNMT3L-F	CGCCCCATGTAAGGACAAGT	128
DNMT3L-R	ATCGGGTGCAATCAGGGTTT	
TET1-F	CGAGTTGGAAAGTTTGCCCG	98
TET1-R	ACACAAGGTTTTGGTCGCTG	
TET2-F	AGCAAGATGGCTGCCCTTTA	99
TET2-R	ATGTTTGCCAGCCTCGTTCT	
TET3-F	GAGTCCCAACTCCGAGGGG	200
TET3-R	CCAGCCTTTATTTCCACCTCC	
MeCP2-F	TGTGTATTTGATCAATCCCCAGG	91
MeCP2-R	GTCCAGGGATGTGTCGCCTA	
MBD1-F	TCTGGTTGCCAAGGTCCAAA	74
MBD1-R	CAGTCTGTAGAAGCCTCCAGT	
MBD2-F	ACAACCGGTAACCAAAGTCACA	94
MBD2-R	CTCCCAGAAAAGCTGACGTG	
MBD4-F	CTCAATCGGACCTCAGGCAA	90
MBD4-R	GTCTGCGGTTCTTGCTACCT	
MBD3-F	GGGAGAGGGAAGAAGTGCCC	80
MBD3-R	CTTCCCGCTCGGGCTATAGTA	
PCGF1-F	GATCAGCCTTTAAGATGGCGT	118
PCGF1-R	ACTCGAACCTCCTCCTCGTTC	
PCGF2-F	TTCACAAACTCCTTTCTTACCGT	150
PCGF2-R	CGTTTCGGCCATCTGGGTT	
PCGF3-F	AAACTCCGGACGGGCTTTTT	136
PCGF3-R	TGCTACATTGTGACGCCTGC	
BMI1-F	TTGTCTTTTCCGCCCGCT	197
BMI1-R	AATACACGTTTTACAGAAGGAATGT	
PCGF6-F	TCTCTCTGAGCTGACCCCAT	200
PCGF6-R	ACTGTCGGTCCAACCTTATGT	
RING1-F	AGATTGCTGTTTCCCCTCGG	153
RING1-R	GACACTCCTTGTTCCCGCTC	
RNF2-F	GCTGTGCAGACAAACGGAAC	95
RNF2-R	GCCATCTGTTATTGCCTCCTGA	
EED-F	TTTCTGGCAAAAGATGCTTGC	197
EED-R	AGCGCCAAATACTGGCATCA	
suz12-F	ACTCGGAATCTCATAGCACCAA	173
suz12-R	AGCTGCAAATGAGCTGACAA	
EZH1-F	GCTGTTGTGTCCTGCCATTC	115
EZH1-R	TGGAGGTAGGGGGATTTGGT	
EZH2-F	GGACTCAGAAGGCAGTGGAG	108
EZH2-R	TCTGGCCCATGATTATTCTTCGT	
KDM6A-F	GAACACAGCACAGCAGGCAT	141
KDM6A-R	GCAGGACTGGACAGGTCATC	
EP300-F	GCAGTGTGCCAAACCAGATG	168
EP300-R	CATAGCCCATAGGCGGGTTG	
KDM5B-F	AAGATGGGGTTTGCTCCTGG	118
KDM5B-R	GCTTCTGCAAACACCTTAGGC	
CREBBP-F	CGTGTCACAGGGACAGGTG	100
CREBBP-R	GTGACTGTGTCACTGGAGGG	
HDAC2-F	CCCCCACGTTTCCCTCAG	177
HDAC2-R	ATAATTTCCAATATCACCGTCGTAG	
SIRT1-F	AGGCCACGGATAGGTCCATA	103
SIRT1-R	GTGGAGGTATTGTTTCCGGC	
KMT2A-F	TCTTTCAGGTACAGAAGATGAGATG	195
KMT2A-R	TAGCGTAGCAAATGGCTGGT	
KMT2D-F	CAGCCCGACGAGGTGATAC	171
KMT2D-R	CAGCAGCTCCTTCCCAAAGA	
KMT2C-F	TTGATCATTCAGATATTGGTCCTGT	188
KMT2C-R	TTTTCCGCCAAGCTCTGGAA	
SMARCA2-F	AGATTCAGCCAGCACACTCC	200
SMARCA2-R	CCATCATGCTGTGGACGGAA	

Nombre cebador	Secuencia cebador (5'-3')	Tamaño de producto en pb
SMARCA1-F	CGGAGAAGGGCGAGAAGAAG	127
SMARCA1-R	GCTCGGTCGGCTTTCATTTT	
SMARCA4-F	CGGCAGAAGCACCAGGAATA	104
SMARCA4-R	GCCTTGGTCAGCTTCTGGAT	
ARID1A-F	AACCCAGACTCGGGGATGTA	182
ARID1A-R	ATTGGCCGCTTGTAATTCTGC	
ARID2-F	AATAATGGCAAACTCGACGGG	106
ARID2-R	AAAAGGCGACCCTCTGCT	
BRD7-F	TGGCCACGTGCCAAGATTAT	174
BRD7-R	GTGGCTCTACTTCTGTAATCTCCA	
PBRM1-F	GAAGGAAGGCTCCAAACGGA	182
PBRM1-R	CCACCCATCATGCCTTCATA	
CHD5-F	TGGATGCTTAAAGGAGCCCAA	116
CHD5-R	AGGCCTTGTAGTTGGTCAGC	
CHD7-F	TCTCGAAGACTAGACAGGAAGGA	151
CHD7-R	TCACACGCTGCACACATTTC	
CHD4-F	CCACCCCACCCAGAAAATGA	155
CHD4-R	TGCCGGCATAAGAGCATACG	
ARID1B-F	GCATGGGCAGTAACCCTCAT	163
ARID1B-R	TACTGAGGTGGCATCTGCTG	
DPF1-F	ACTGTGAAGCACCCCTGAAG	142
DPF1-R	AGCAACTGCTGTTTCTGACA	
PHF10-F	AGGAAATATCCAGATTTAGAGCGAC	117
PHF10-R	ACTGCGCAATGCTGTTAAGC	
BPTF-F	GGAGGGCAAAGAGGTACTGG	190
BPTF-R	GTCTTCTCTGTGCTGGTGCT	
CHD1-F	GGACTCTTGCTTACCCCGAG	135
CHD1-R	ACTCTCCTTTGATTCACCGGC	
HDAC1-F	CATCGCTGTGAATTGGGCTG	119
HDAC1-R	ACCCTCTGGTGATACTTTAGCAG	
HDAC2-F	CCCCCACGTTTCCCTCAG	177
HDAC2-R	ATAATTTCCAATATCACCGTCGTAG	
DROSHA-F	GACAGCTCCTTCAGTGTCTCT	90
DROSHA-R	CGGGAAAAGCAACCTGGAAA	
DGCR8-F	GACAGGCTTTCCAGATGGCT	114
DGCR8-R	GGCACCTTTCTTCTTCTACCTGA	
DICER1-F	GCTTGCTGGTGCCATTTACA	177
DICER1-R	GTTCTCTCAGCCGGGCTAAAT	
AGO2-F	ACCTAGACCCGACTTTGGGA	155
AGO2-R	TGTGTTCCACGATTTCCCTGT	
AGO1-F	GACCTCCGCACGGGTATATG	193
AGO1-R	CCACCTCGTAGTGGTACACG	
AGO4-F	GTCCTGGCCTTGGAACTGT	153
AGO4-R	CCATTGTATCTACTACCTCCCTGT	
TNRC6A-F	CGTAGAAAGAAATCTTAGCAGGGAT	168
TNRC6A-R	CTGAGGCTGGCTTACACTGG	
XPO5-F	AAGACCGGAAGCCCTTGATG	182
XPO5-R	ATCAGAATCTGCACCCAGCA	
TARBP2-F	ACGACCTTCTCAAAGCCGAG	198
TARBP2-R	GGGGAGAAAAAGAACTGCTGTC	
AGO3-F	GCAGGGAAGTGTGGTTTGGA	86
AGO3-R	AGGCAGTGGCAGAAACATCG	
TNRC6C-F	AGCAGCAACAATGGCAAACG	102
TNRC6C-R	TTCTGTTCTTGCTGGCGGAA	
TNRC6B-F	ACTACCCAACGTCAGCCTTG	81
TNRC6B-R	CCATGACTACCGCCTTGTCT	
ACTB-F	CTTCGCGGGCGACGAT	67
ACTB-R	CCACATAGGAATCCTTCTGACC	
GAPDH-F	GACAGTCAGCCGCATCTTCT	104
GAPDH-R	GCGCCCAATACGACCAAATC	
B2M-F	AAGATGAGTATGCCTGCCGT	81
B2M-R	CTGCTTACATGTCTCGATCCCA	
RPLP0-F	CGTCCTCGTGGAAGTGACAT	176
RPLP0-R	CTTGGAGCCCACATTGTCTG	
TBP-F	TCTTTGCAGTGACCCAGCATCA	139
TBP-R	AGAAACCCTTGCGCTGGAA	

Extracción de RNA con TRIzol:

1. Añadir **1 ml de TRIzol** a 50-100 mg de tejido o a células de un cultivo (aproximadamente 1 x 10^6 células).
2. Homogeneizar completamente la muestra usando un homogeneizador, un vórtex, o una pipeta para disgregar completamente la muestra en el TRIzol.
3. Dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente durante **5 minutos** para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
4. Añadir **200 µl de cloroformo** por cada ml de TRIzol utilizado.
5. Tapar el tubo y agitar enérgicamente durante **15 segundos**.
6. Dejar reposar el tubo a temperatura ambiente durante **2-3 minutos**.
7. Centrifugar la muestra a **12,000 x g durante 15 minutos** a 4 °C. Tras la centrifugación, se observarán tres fases:
   - **Fase acuosa superior** (contiene el ARN).
   - **Fase intermedia** (contiene el ADN).
   - **Fase orgánica** (contiene proteínas y lípidos).
8. Transferir cuidadosamente la **fase acuosa** (superior) a un tubo limpio de microcentrífuga, evitando arrastrar las otras fases.
9. Añadir un volumen equivalente de **isopropanol** a la fase acuosa para precipitar el ARN.
10. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante **10 minutos**.
11. Centrifugar a **12,000 x g durante 10 minutos** a 4 °C para precipitar el ARN.
12. El RNA precipitado debe aparecer como un pequeño pellet blanco o transparente en el fondo del tubo.
13. Desechar con cuidado el sobrenadante y lavar el pellet de RNA añadiendo **1 ml de etanol al 70%** por cada ml de TRIzol utilizado al inicio.
14. Centrifugar a **7,500 x g durante 5 minutos** a 4 °C.
15. Desechar el etanol y secar el pellet de ARN al aire durante **5-10 minutos** (evita secar en exceso, ya que esto puede dificultar su resuspensión).

16. Resuspender el pellet de RNA en **20-50 µl de agua libre de nucleasas** o en un buffer adecuado para almacenamiento.

17. El RNA extraído puede almacenarse a **-80 °C** para su uso a largo plazo.

Conversión a cDNA

1. Descongelar los reactivos del kit high capacity en hielo.

2. Calcular el volumen de los componentes necesarios para preparar la transcripción inversa en un termociclador, como se muestra en la tabla:

Reactivo	Concentración del Stock	Volumen en µL
RT buffer	10X	2
25X dNTP Mix	100 mM	0.8
RT random primers	10X	2
MultiScribe reverse transcriptase	--	1
Agua libre de nucleasas	100%	4.2
Mezcla maestra 2X		10 µL

3. Coloque la mezcla maestra 2X RT en hielo y mezcle suavemente.

4. Pipetee 10 µL de mezcla maestra 2X RT en cada tubo individual o placa.

5. Pipetee 10 µL de muestra de RNA en cada pozo, pipeteando hacia arriba y hacia abajo dos veces para mezclar.

6. Centrifugar brevemente los tubos para reducir el contenido y para eliminar cualquier burbuja de aire.

7. Colocar la placa o los tubos en hielo hasta que esté listo para poner en el termociclador con las condiciones siguientes de reacción.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	25ºC	10:00 min	1 ciclo
2	37ºC	120 min	1 ciclo
3	85ºC	5:00 min	1 ciclo

8. Al termino de RT-PCR, colocar los tubos a -20°C hasta su uso.

Análisis de expresión génica por qPCR

La expresión génica se midió mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el sistema de detección Step One Plus (Applied Biosystems™) en un formato de placa de 96 pocillos. Como controles internos se usaron tres genes: Microglobulina Beta-2 (B2M), Deshidrogenasa de Gliceraldehído 3-Fosfato (GAPDH) y Subunidad P0 de la Espiga Lateral de la Proteína Ribosomal (RPLPO). Estos genes también se utilizaron para la normalización de datos.

Se diseñaron primers (Tabla Suplementaria 1) para cada gen de interés de los 4 mecanismos epigeneticos (*DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, TET-1, TET-2, TET-3, MECP-2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 (*Metilación*), AGO1, AGO2, AGO3, AGO4, DGCR8, DICER, DROSHA, TARBP2,TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C, XPO5 (*Biogenesis miRNA*), BMI1, EED, EP300, EZH1, EZH2, KDM5B, KDM6A, PPCGF1, PCGF2, PCRF6, RING1, RNF2, SUZ12, CREBBP, HDAC2, KMT2A, KMT2C, KMT2D, SIRT1 (*Modificación de Histonas*), ARID1B, BPTF, BRD7, CHD1, CHD4, CDH5, CHD7, DPF1, HDAC2-2, PBRM1, PHF10, SMARCA2, ARID2, SMARCA4 (*Regulación de la Cromatina), fueron obtenidas de Applied Biosystems. El protocolo de la reacción de qPCR fue el siguiente:

Paso	Descripción	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización	95ºC	5:00 min	1 ciclo
2	Desnaturalización	95ºC	0:30 seg	50 ciclos
	Alineamiento	60ºC	0:30 seg	
	Extensión	72ºC	0:30 min	
3	Extensión final	60ºC	30:00 min	1 ciclo
	Paso final	25ºC	2:00 min	

Los valores de cuantificación relativa de ARNm se obtuvieron mediante el método de comparación 2^-ΔΔCt. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real sensible a metilación (MS-qPCR)

1. Preparación de las reacciones de digestión:
2. Para analizar el estado de metilación del ADN, prepara tres reacciones:
   - Sin enzima (Control negativo).
   - Digestión con MspI.
   - Digestión con HpaII.

- Cada reacción debe contener los siguientes componentes en un volumen total de 20 µL:
  - ADN: 200-500 ng (dependiendo de la concentración de la muestra).
  - 10X Buffer de digestión: 2 µL.
  - Enzima de restricción (para las reacciones con enzima): 1 µL de MspI o HpaII.
  - Agua nuclease-free: hasta completar 20 µL.

2. Incubación:

- Incuba cada mezcla de reacción en el termociclador a 37°C durante 1-2 horas.
- Después de la digestión, inactiva las enzimas mediante incubación a 65°C durante 20 minutos.

Análisis de MS-qPCR

Para el análisis de la metilación de CpG en un locus CCGG específico mediante qPCR, se realizó lo siguiente:

- Para qPCR, se diseñaron cebadores que flanquean el sitio CCGG de los genes de interés (sitios promotores, islas CpG, sitios factores de transcripción).
- Se utilizó 1-2 µL (2-40 ng) de la plantilla preparada (digestión con enzimas sensibles a metilación).

Recomendaciones para qPCR

- A continuación, se recomiendan los parámetros para qPCR utilizando Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific (#K0221/2/3).

Prepare una mezcla maestra de la reacción añadiendo los siguientes componentes

Reactivos	Volumen (µL)
Maxima™ SYBR Green Master Mix	10
Primer Forward	0.5
Primer Reverse	0.5
Muestra de ADN	1 (2-40 ng)
Agua	cbp 20
Volumen final	20

Programa del termociclador:

Paso	Descripción	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94ºC	10:00 min	1 ciclo
2	Desnaturalización	94ºC	0:15 seg	40 ciclos
	Alineamiento	60ºC	0:15 seg	
	Extensión	72ºC	0:30 seg	

Interpretación de los datos

Cálculo del porcentaje de 5-mC

$$\% \text{ de 5-mC} = 100/(1+E)^{Cq2-Cq1}$$

Donde:
Cq1 es el ciclo de amplificación de la muestra ADN no digerido
Cq2 es el ciclo de amplificación de la muestra digerida con Epi HpaII Cq3 es el ciclo de amplificación de la muestra digerida con Epi MspI E es el valor de eficiencia de la PCR

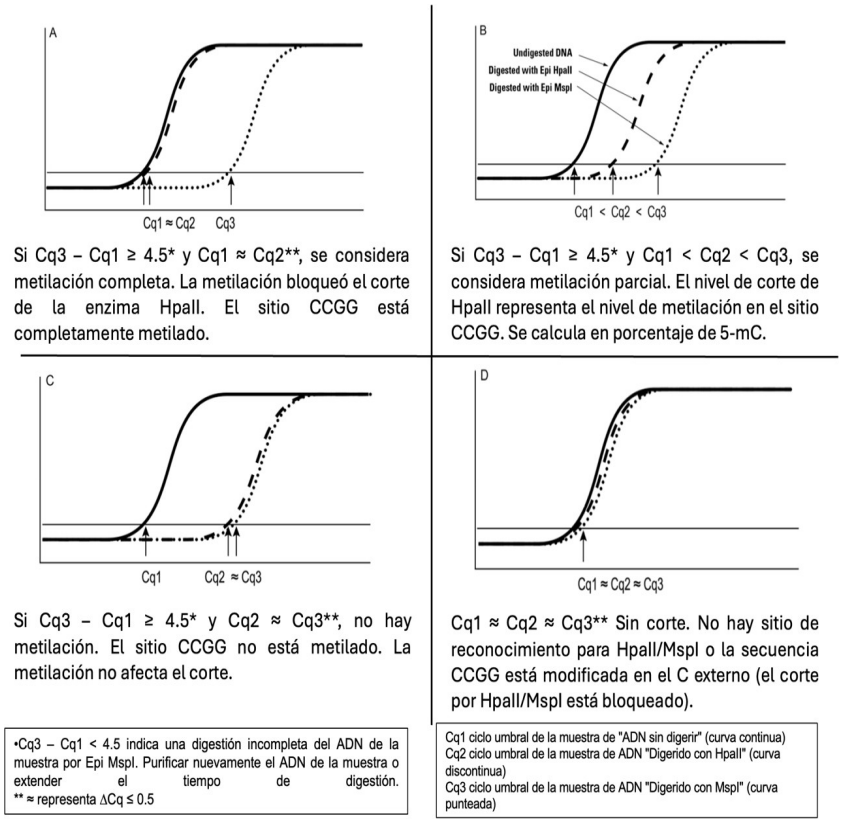


Figura suplementaria 2: Esquema de interpretación de **MS-qPCR.**

Tabla Suplementaria 2: Primers diseñados para la validación de regiones metiladas en la cohorte de seguimiento.

Nombre Cebador	Secuencia cebador (5'-3')	Tamaño de producto en pb
F-PRKCZ	GTGTGGAGGGGCTTGCT	174
R-PRKCZ	CGAGGACCTCCATGCG	
F-CpG64	GAGCAGACCTTCCAGACACC	139
R-CpG64	GTTCAGTTCTGAGCCCGGAT	
F-GH01J086772	TTGCATTATAGCCTCAGTCCTGT	226
R-GH01J086772	GGAATGCACTGTTTGCCAAGAT	
F-GH10J100004	TAACTCCTGACCAACAAGAC	229
R-GH10J100004	ATGGATTACCTACAACATGG	
F-CpG152	CGGCTCGCATTGCTCC	239
R-CpG152	ACCTGTTGTAGCCGCCTG	
F-CpG209	TTCTTCATCGCACTTGCGG	192
R-CpG209	GAACCGAGCTGGATGCCC	
F-CpG100	ACCCCCTTAGTAGCGTCCTT	155
R-CpG100	CTGCCTCTCTGCAGACCAC	
F-CpG46	GGGTGCTTGGTGCCATCTAC	137
R-CpG46	ATGGAGGACACGAATACAGGC	
F-MAP2K3-1	CGTGAACTCACAGGAGCAGA	225
R-MAP2K3-1	CTGCCAGTATGCCAGGTGTC	
F-MAP2K3-2	TGGGGACACCTGGCATACT	200
R-MAP2K3-2	GGGATGCGAATGGTCACACA	
F-CpG116	TGTGGTATACGGGCTTGACG	196
R-CpG116	GTGAGCTTCCAGAAGACGGT	
F-GH17J078733	AGCATTACAACACCACCATCTG	221
R-GH17J078733	GCAGGGTCTGTAGAACTTCCTT	
F-CpG198	AAGCATAAGCTCCACAAAAGCAA	250
R-CpG198	TTTCTCCCTCAGCCGCCC	
F-CpG79-1	GGACTCTGGTGTGACATGGG	168
R-CpG79-1	CCACCCTGAGACTACTCGGA	
F-CpG79-2	GCAAAAACCGCCTACGTC	192
R-CpG79-2	GTCACCCGATCCCAGACC	
F-CpG39	CAGAGGTGTTGGGTGACCTCG	128
R-CpG39	GAATCCTCAGCGGCATGACAAG	
F-CpG33	TAAAGCTCCTCCAGCAGACC	233
R-CpG33	CTGATGCAAGGCATCCAGGT	
F-CpG24	ACCAAGATGTGGGGTCCTCC	135
R-CpG24	CGCCGATCCTCACAAACCAA	
F-GH05J035861	ACAAGCCCTGAATTCCAGTT	80
R-GH05J035861	AAGGACTGCAGCAGAAAGCA	
F-ZFPM2	GGGTTCACGCCATTCTCCTG	263
R-ZFPM2	CGGGTGGATCATGAGGTCAG	
F-CpG30	GTGGCAATGGCAAGACC	219
R-CpG30	TACAGGAATGGAAGAGCCCC	
F-CpG22	GAGGTGAGTGCAGACGAGAG	215
R-CpG22	ACAGGGGAAAGGTGTGCTTG	
F-CpG74	AGGGGGCAGGAAAAACACC	201
R-CpG74	TGTGCGGTCGTGGTGC	
F-GH0XJ068496	TTGGGGCTTGAGCCCGTC	101
R-GH0XJ068496	CACGGCACCTCTAGGAAAGAG	
F-CpG675	GACAGGGTGGCAAGTCTCAA	151
R-CpG675	TTGCGTCCTAGGGAGGAAGG	
F-GH01J008115	CTGAACAAAAGAACGTGCCAG	139
R-GH01J008115	GTAAACCAAGGACACTTCACCC	
F-GH22J027789	TTGGGTCCCTACGATGATGC	162
R-GH22J027789	GACTTGTCCTAGCCACAGCA	

ANEXO B

Tabla Suplementaria 3: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_VCHIK_1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	71.046	70.511	72.312	70.712
NC_000002.12	72.742	72.244	73.938	72.436
NC_000003.12	72.493	71.572	73.776	72.192
NC_000004.12	72.302	71.478	73.633	71.995
NC_000005.10	71.548	69.429	72.634	71.373
NC_000006.12	70.521	69.21	71.713	70.272
NC_000007.14	71.066	69.992	72.292	70.788
NC_000008.11	68.258	64.887	69.039	68.248
NC_000009.12	68.636	68.615	70.088	68.216
NC_000010.11	72.58	72.082	73.96	72.212
NC_000011.10	70.919	69.796	72.131	70.64
NC_000012.12	71.308	70.714	72.725	70.945
NC_000013.11	72.546	71.329	73.675	72.313
NC_000014.9	69.222	67.612	70.135	69.066
NC_000015.10	66.075	64.762	67.156	65.846
NC_000016.10	66.017	65.679	67.165	65.684
NC_000017.11	64.716	63.665	65.966	64.411
NC_000018.10	69.212	67.144	70.259	69.052
NC_000019.10	66.741	67.102	68.374	66.139
NC_000020.11	72.81	71.954	74.235	72.438
NC_000021.9	62.838	59.084	63.593	62.908
NC_000022.11	65.584	65.852	67.367	64.953

Tabla Suplementaria 4: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_CTL_2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	70.656	72.327	72.768	69.926
NC_000002.12	71.988	73.698	74.018	71.313
NC_000003.12	71.523	72.706	73.63	70.876
NC_000004.12	70.956	72.417	73.094	70.309
NC_000005.10	70.471	70.476	72.358	69.952
NC_000006.12	69.471	70.342	71.45	68.875
NC_000007.14	70.466	71.618	72.515	69.802
NC_000008.11	67.425	66.071	68.961	67.077
NC_000009.12	68.359	70.593	70.651	67.543
NC_000010.11	72.212	73.831	74.446	71.45
NC_000011.10	70.478	71.616	72.548	69.803
NC_000012.12	70.625	72.189	72.835	69.896
NC_000013.11	71.305	72.299	73.242	70.724
NC_000014.9	68.595	69.065	70.297	68.077
NC_000015.10	65.882	66.491	67.711	65.298
NC_000016.10	66.433	67.893	68.347	65.697
NC_000017.11	65.377	66.136	67.39	64.655
NC_000018.10	68.302	68.119	70.073	67.819
NC_000019.10	68.161	70.231	70.541	67.106
NC_000020.11	72.955	74.187	75.241	72.159
NC_000021.9	62.494	60.608	64.042	62.191
NC_000022.11	66.831	68.778	69.409	65.765

Tabla Suplementaria 5: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_CHIK1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	73.208	71.66	74.02	73.075
NC_000002.12	75.907	74.353	76.657	75.79
NC_000003.12	76.022	74.185	76.895	75.886
NC_000004.12	77.088	75.139	78.004	76.952
NC_000005.10	75.136	72.077	75.82	75.126
NC_000006.12	73.988	71.635	74.798	73.907
NC_000007.14	73.286	71.125	74.045	73.215
NC_000008.11	71.457	67.081	71.813	71.627
NC_000009.12	71.826	70.661	72.798	71.623
NC_000010.11	74.826	73.431	75.833	74.628
NC_000011.10	73.167	71.011	73.893	73.096
NC_000012.12	73.996	72.24	74.98	73.831
NC_000013.11	76.868	74.685	77.605	76.798
NC_000014.9	71.776	69.092	72.265	71.811
NC_000015.10	67.575	65.705	68.326	67.482
NC_000016.10	66.875	65.831	67.684	66.711
NC_000017.11	65.033	63.388	65.959	64.889
NC_000018.10	72.272	69.232	72.899	72.29
NC_000019.10	67.321	67.219	68.617	66.888
NC_000020.11	73.642	72.088	74.726	73.428
NC_000021.9	65.352	60.652	65.701	65.613
NC_000022.11	65.266	65.262	66.771	64.757

Tabla Suplementaria 6: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_DENV2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	67.369	66.452	68.467	67.11
NC_000002.12	70.531	69.568	71.54	70.306
NC_000003.12	70.724	69.459	71.813	70.495
NC_000004.12	72.148	70.706	73.258	71.933
NC_000005.10	69.968	67.455	70.888	69.862
NC_000006.12	69.001	67.174	70.034	68.827
NC_000007.14	68.06	66.421	69.079	67.88
NC_000008.11	66.473	62.857	67.085	66.524
NC_000009.12	66.206	65.48	67.39	65.912
NC_000010.11	69.16	68.464	70.401	68.846
NC_000011.10	67.444	65.726	68.466	67.259
NC_000012.12	68.636	67.371	69.889	68.364
NC_000013.11	71.953	70.274	72.915	71.793
NC_000014.9	66.338	64.179	67.056	66.274
NC_000015.10	62.19	60.956	63.188	61.981
NC_000016.10	60.932	60.57	62.028	60.618
NC_000017.11	58.978	58.078	60.265	58.648
NC_000018.10	67.418	64.932	68.28	67.336
NC_000019.10	60.27	60.938	62.086	59.57
NC_000020.11	67.374	66.627	68.82	66.987
NC_000021.9	60.557	56.364	61.112	60.719
NC_000022.11	58.589	59.349	60.491	57.87

Tabla Suplementaria 7: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_CTL1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	74.36	75.157	76.338	73.728
NC_000002.12	76.427	77.321	78.353	75.832
NC_000003.12	76.181	76.671	78.197	75.599
NC_000004.12	76.649	77.273	78.713	76.068
NC_000005.10	75.204	74.397	76.977	74.764
NC_000006.12	74.117	74.022	75.979	73.611
NC_000007.14	74.02	74.279	75.934	73.454
NC_000008.11	71.703	69.514	73.122	71.441
NC_000009.12	72.788	74.027	74.912	72.089
NC_000010.11	75.993	76.876	78.168	75.299
NC_000011.10	74.144	74.377	76.045	73.577
NC_000012.12	74.703	75.271	76.795	74.072
NC_000013.11	76.549	76.747	78.368	76.047
NC_000014.9	72.438	72.137	74.04	71.999
NC_000015.10	68.956	69.112	70.747	68.415
NC_000016.10	68.987	69.603	70.808	68.356
NC_000017.11	67.507	67.537	69.434	66.882
NC_000018.10	72.364	71.23	74.054	71.965
NC_000019.10	70.474	71.797	72.727	69.549
NC_000020.11	75.771	76.294	77.969	75.055
NC_000021.9	65.92	63.037	67.291	65.745
NC_000022.11	68.689	70.004	71.235	67.696

Tabla Suplementaria 8: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_CHIK2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	73.731	71.004	74.399	73.719
NC_000002.12	76.35	73.694	76.991	76.331
NC_000003.12	76.511	73.62	77.302	76.457
NC_000004.12	77.388	74.36	78.225	77.332
NC_000005.10	75.559	71.386	76.167	75.635
NC_000006.12	74.415	71.005	75.129	74.423
NC_000007.14	73.613	70.24	74.229	73.666
NC_000008.11	71.832	66.519	72.11	72.083
NC_000009.12	72.135	69.727	72.962	72.058
NC_000010.11	75.31	72.783	76.17	75.232
NC_000011.10	73.664	70.167	74.21	73.732
NC_000012.12	74.437	71.559	75.293	74.382
NC_000013.11	77.104	73.834	77.752	77.123
NC_000014.9	72.189	68.474	72.549	72.329
NC_000015.10	68.132	65.099	68.756	68.159
NC_000016.10	67.006	64.695	67.575	67.03
NC_000017.11	65.36	62.412	66.073	65.408
NC_000018.10	72.543	68.356	73.06	72.665
NC_000019.10	67.294	65.606	68.281	67.15
NC_000020.11	74.128	71.252	74.995	74.081
NC_000021.9	65.422	59.504	65.574	65.834
NC_000022.11	65.396	63.958	66.618	65.125

Tabla Suplementaria 9: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_CTL2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	74.39	74.094	75.733	74.017
NC_000002.12	76.911	76.611	78.197	76.568
NC_000003.12	76.802	76.188	78.165	76.462
NC_000004.12	77.669	77.006	79.108	77.324
NC_000005.10	75.884	73.96	77.071	75.67
NC_000006.12	74.766	73.517	76.05	74.488
NC_000007.14	74.279	73.373	75.584	73.967
NC_000008.11	72.264	69.006	73.127	72.223
NC_000009.12	72.895	73.027	74.427	72.442
NC_000010.11	75.98	75.831	77.549	75.532
NC_000011.10	74.23	73.25	75.51	73.921
NC_000012.12	74.947	74.527	76.461	74.545
NC_000013.11	77.447	76.388	78.712	77.168
NC_000014.9	72.757	71.244	73.748	72.573
NC_000015.10	68.912	68.105	70.146	68.603
NC_000016.10	68.264	68.165	69.566	67.86
NC_000017.11	66.626	65.936	68.061	66.228
NC_000018.10	72.996	70.941	74.125	72.811
NC_000019.10	68.901	69.71	70.741	68.176
NC_000020.11	75.11	74.694	76.739	74.641
NC_000021.9	66.255	62.513	67.108	66.297
NC_000022.11	67.176	67.93	69.291	66.385

Tabla Suplementaria 10: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_CTL_1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	70.549	72.186	72.651	69.825
NC_000002.12	72.033	73.753	74.104	71.347
NC_000003.12	71.576	72.849	73.746	70.906
NC_000004.12	71.127	72.606	73.417	70.44
NC_000005.10	70.608	70.725	72.565	70.063
NC_000006.12	69.59	70.45	71.649	68.973
NC_000007.14	70.484	71.704	72.58	69.801
NC_000008.11	67.407	65.995	69.003	67.046
NC_000009.12	68.007	70.153	70.304	67.196
NC_000010.11	72.079	73.65	74.299	71.325
NC_000011.10	70.328	71.426	72.414	69.652
NC_000012.12	70.534	72.091	72.799	69.79
NC_000013.11	71.214	72.479	73.289	70.58
NC_000014.9	68.422	68.92	70.17	67.889
NC_000015.10	65.563	66.134	67.376	64.987
NC_000016.10	66.074	67.377	67.899	65.381
NC_000017.11	64.881	65.619	66.812	64.187
NC_000018.10	68.147	67.878	69.994	67.648
NC_000019.10	67.661	69.743	69.928	66.643
NC_000020.11	72.518	73.718	74.738	71.744
NC_000021.9	62.079	60.344	63.678	61.749
NC_000022.11	65.896	67.821	68.393	64.859

Tabla Suplementaria 11: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_DENV1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	66.311	62.939	66.704	66.423
NC_000002.12	69.81	66.587	70.178	69.903
NC_000003.12	70.291	66.903	70.837	70.333
NC_000004.12	71.838	68.206	72.428	71.881
NC_000005.10	69.554	64.938	69.939	69.717
NC_000006.12	68.593	64.722	69.088	68.689
NC_000007.14	67.154	63.131	67.485	67.332
NC_000008.11	66.016	60.373	66.098	66.342
NC_000009.12	65.068	61.85	65.559	65.145
NC_000010.11	68.262	65.293	68.838	68.297
NC_000011.10	66.561	62.474	66.884	66.731
NC_000012.12	67.823	64.234	68.434	67.884
NC_000013.11	71.528	67.739	71.948	71.639
NC_000014.9	65.496	61.048	65.646	65.745
NC_000015.10	61.06	57.789	61.452	61.172
NC_000016.10	59.225	56.469	59.552	59.367
NC_000017.11	57.064	53.85	57.558	57.208
NC_000018.10	66.877	62.481	67.232	67.058
NC_000019.10	57.429	55.584	58.296	57.343
NC_000020.11	65.838	62.55	66.485	65.89
NC_000021.9	59.603	53.485	59.486	60.107
NC_000022.11	56.013	54.517	57.01	55.824

ANEXO C

Tabla Suplementaria 12: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_VCHIK_1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	63.04	62.892	63.163	63.019
Down2k	62.072	59.978	62.813	62.027
Up2k	60.532	58.283	61.497	60.554
mRNA	68.151	66.492	68.929	68.042
repeat	65.395	65.337	66.448	65.09
CpGIsland	52.806	53.279	53.931	51.967

Tabla Suplementaria 13: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_CTL_2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	65.56	67.186	66.115	64.971
Down2k	62.905	62.6	64.394	62.452
Up2k	62.536	63.431	64.269	61.801
mRNA	68.058	68.579	69.627	67.55
repeat	64.848	66.552	66.646	64.201
CpGIsland	58.187	59.302	59.497	56.886

Tabla Suplementaria 14: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_CHIK1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	62.964	61.692	62.789	63.315
Down2k	62.917	60.044	63.301	63.06
Up2k	61.598	58.393	62.209	61.892
mRNA	69.969	67.289	70.315	70.066
repeat	68.278	67.489	68.995	68.123
CpGIsland	52.713	52.646	53.573	52.317

Tabla Suplementaria 15: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_DENV2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	56.872	55.52	57.052	57.089
Down2k	57.216	54.824	57.879	57.225
Up2k	55.197	51.859	56.155	55.393
mRNA	64.543	62.355	65.172	64.519
repeat	63.096	63.146	64.057	62.811
CpGIsland	46.208	46.488	47.266	45.511

Tabla Suplementaria 16: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_CTL1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	67.199	68.041	67.665	66.817
Down2k	65.154	64.094	66.505	64.817
Up2k	64.991	65.342	66.607	64.382
mRNA	71.228	70.874	72.655	70.827
repeat	69.095	69.952	70.814	68.531
CpGIsland	59.608	60.387	60.862	58.528

Tabla Suplementaria 17: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_CHIK2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	62.012	59.474	61.619	62.729
Down2k	63.136	58.987	63.296	63.471
Up2k	61.667	57.341	61.999	62.234
mRNA	70.255	66.359	70.425	70.497
repeat	68.69	66.598	69.262	68.67
CpGIsland	50.573	50.074	51.097	50.594

Tabla Suplementaria 18: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_CTL2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	65.872	66.193	66.127	65.694
Down2k	64.482	62.724	65.391	64.353
Up2k	63.536	62.471	64.693	63.306
mRNA	71.152	69.743	72.013	70.999
repeat	69.303	69.341	70.487	68.953
CpGIsland	57.507	58.054	58.698	56.591

Tabla Suplementaria 19: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_CTL_1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	65.339	66.934	65.859	64.772
Down2k	62.573	62.391	64.012	62.124
Up2k	61.961	62.474	63.607	61.315
mRNA	67.762	68.276	69.344	67.25
repeat	64.984	66.639	66.762	64.346
CpGIsland	57.856	58.868	59.201	56.596

Tabla Suplementaria 20: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_DENV1_1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	53.029	49.559	52.556	53.982
Down2k	55.434	50.79	55.38	55.884
Up2k	52.949	47.143	53.148	53.793
mRNA	63.338	58.744	63.27	63.703
repeat	62.377	60.166	62.73	62.429
CpGIsland	40.55	40.05	41.097	40.559

ANEXO D

Nivel medio de metilación del genoma completo

El nivel medio de metilación del genoma completo revela las características generales del metiloma. El nivel de metilación se determinó por la proporción del número de lecturas que apoyan la metilación al número de lecturas que cubren cierto sitio de citosina. En general, la metilación de CG se encuentra tanto en los genes como en las repeticiones, y está involucrada en la regulación de la expresión génica. Los dos tipos de metilación no-CG, CHG y CHH, están mayormente ausentes dentro de los genes y se encuentran principalmente en regiones intergénicas y ricas en repeticiones del genoma, y juegan un papel crítico en el silenciamiento de los transposones.

Tabla Suplementaria 21: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_VCHIK_2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.918	66.587	3.444	3.587
NC_000002.12	6.867	68.259	3.441	3.507
NC_000003.12	6.602	67.393	3.437	3.527
NC_000004.12	6.637	64.24	3.509	3.598
NC_000005.10	6.564	63.56	3.423	3.533
NC_000006.12	6.852	68.38	3.455	3.521
NC_000007.14	7.164	67.556	3.45	3.516
NC_000008.11	6.606	65.352	3.413	3.521
NC_000009.12	7.238	68.626	3.434	3.519
NC_000010.11	7.345	67.161	3.456	3.521
NC_000011.10	6.93	67.172	3.407	3.516
NC_000012.12	7.121	69.008	3.437	3.505
NC_000013.11	6.863	64.371	3.416	3.548
NC_000014.9	6.921	67.06	3.441	3.513
NC_000015.10	7.234	69.788	3.462	3.496
NC_000016.10	9.775	58.098	3.46	3.704
NC_000017.11	8.445	69.541	3.442	3.502
NC_000018.10	6.893	65.931	3.416	3.547
NC_000019.10	9.255	69.415	3.459	3.468
NC_000020.11	7.4	65.72	3.433	3.55
NC_000021.9	7.104	62.79	3.413	3.481
NC_000022.11	8.538	69.291	3.444	3.472

Tabla Suplementaria 22: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_VCHIK_1.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.822	66.539	3.688	3.823
NC_000002.12	6.838	68.334	3.726	3.798
NC_000003.12	6.585	67.262	3.709	3.786
NC_000004.12	6.644	64.446	3.822	3.921
NC_000005.10	6.561	63.691	3.737	3.834
NC_000006.12	6.819	68.047	3.754	3.813
NC_000007.14	7.069	67.378	3.67	3.759
NC_000008.11	6.621	65.014	3.735	3.818
NC_000009.12	7.17	69.006	3.664	3.754
NC_000010.11	7.335	67.115	3.786	3.863
NC_000011.10	6.907	67.399	3.689	3.797
NC_000012.12	7.159	68.923	3.786	3.863
NC_000013.11	6.848	63.938	3.684	3.822
NC_000014.9	6.819	67.042	3.681	3.735
NC_000015.10	7.16	69.684	3.687	3.755
NC_000016.10	9.682	57.764	3.753	3.949
NC_000017.11	8.391	70.471	3.701	3.768
NC_000018.10	6.898	65.932	3.693	3.79
NC_000019.10	9.278	70.833	3.725	3.733
NC_000020.11	7.358	66.215	3.706	3.824
NC_000021.9	7.001	62.719	3.676	3.752
NC_000022.11	8.448	70.195	3.671	3.683

T

Tabla Suplementaria 23: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_CTL_2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.875	66.996	3.408	3.52
NC_000002.12	7.003	68.746	3.384	3.461
NC_000003.12	6.735	67.939	3.404	3.464
NC_000004.12	6.747	65.194	3.43	3.53
NC_000005.10	6.683	64.439	3.39	3.475
NC_000006.12	6.972	68.734	3.406	3.471
NC_000007.14	7.322	68.147	3.382	3.456
NC_000008.11	6.722	65.853	3.379	3.458
NC_000009.12	7.374	68.858	3.384	3.448
NC_000010.11	7.419	67.645	3.397	3.457
NC_000011.10	7.076	67.777	3.37	3.458
NC_000012.12	7.269	69.279	3.395	3.449
NC_000013.11	6.947	65.152	3.375	3.481
NC_000014.9	7.06	67.351	3.379	3.445
NC_000015.10	7.347	69.958	3.399	3.442
NC_000016.10	9.462	59.961	3.415	3.581
NC_000017.11	8.51	69.7	3.397	3.446
NC_000018.10	7.009	66.683	3.376	3.481
NC_000019.10	9.324	69.145	3.417	3.404
NC_000020.11	7.477	66.245	3.388	3.465
NC_000021.9	7.299	63.984	3.399	3.429
NC_000022.11	8.603	69.278	3.421	3.393

Tabla Suplementaria 24: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_CHIK1

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.506	83.684	2.673	2.806
NC_000002.12	6.268	83.933	2.644	2.731
NC_000003.12	6.045	83.464	2.65	2.732
NC_000004.12	5.994	82.867	2.672	2.751
NC_000005.10	6.101	83.434	2.629	2.722
NC_000006.12	6.197	83.649	2.656	2.725
NC_000007.14	6.644	84.162	2.657	2.738
NC_000008.11	6.193	83.412	2.627	2.726
NC_000009.12	6.632	83.822	2.649	2.73
NC_000010.11	6.98	84.321	2.67	2.737
NC_000011.10	6.305	82.902	2.632	2.715
NC_000012.12	6.465	83.919	2.648	2.722
NC_000013.11	6.422	82.025	2.648	2.749
NC_000014.9	6.382	83.862	2.634	2.725
NC_000015.10	6.743	83.866	2.685	2.721
NC_000016.10	10.668	84.684	2.712	2.932
NC_000017.11	8.015	83.303	2.682	2.75
NC_000018.10	6.502	83.597	2.666	2.747
NC_000019.10	9.145	83.698	2.707	2.714
NC_000020.11	7.036	82.68	2.662	2.755
NC_000021.9	6.78	82.244	2.661	2.735
NC_000022.11	8.373	84.055	2.684	2.715

Tabla Suplementaria 25: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_DENV2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	8.489	83.73	3.165	3.304
NC_000002.12	6.909	83.326	3.11	3.175
NC_000003.12	6.656	82.767	3.105	3.179
NC_000004.12	6.66	81.602	3.153	3.227
NC_000005.10	6.781	82.813	3.113	3.194
NC_000006.12	6.829	83.2	3.115	3.172
NC_000007.14	7.284	83.56	3.118	3.193
NC_000008.11	6.831	82.603	3.131	3.206
NC_000009.12	7.306	83.679	3.133	3.198
NC_000010.11	7.777	83.898	3.13	3.202
NC_000011.10	6.967	82.459	3.136	3.206
NC_000012.12	7.15	83.622	3.139	3.194
NC_000013.11	6.993	81.445	3.1	3.218
NC_000014.9	7.02	83.413	3.15	3.2
NC_000015.10	7.446	83.465	3.139	3.184
NC_000016.10	12.435	85.183	3.215	3.496
NC_000017.11	8.843	83.176	3.144	3.221
NC_000018.10	7.121	82.981	3.128	3.213
NC_000019.10	10.011	84.065	3.174	3.183
NC_000020.11	7.781	82.219	3.13	3.247
NC_000021.9	7.506	81.558	3.136	3.207
NC_000022.11	9.203	84.004	3.188	3.197

Tabla Suplementaria 26: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_CTL1.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	8.399	82.869	3.35	3.476
NC_000002.12	7.431	83.282	3.32	3.418
NC_000003.12	7.187	83.048	3.332	3.436
NC_000004.12	7.158	82.605	3.343	3.453
NC_000005.10	7.225	82.798	3.315	3.422
NC_000006.12	7.377	83.108	3.329	3.426
NC_000007.14	7.841	83.543	3.326	3.421
NC_000008.11	7.323	83.039	3.312	3.417
NC_000009.12	7.801	82.576	3.327	3.421
NC_000010.11	8.067	83.47	3.329	3.426
NC_000011.10	7.451	81.795	3.31	3.41
NC_000012.12	7.651	83.265	3.33	3.409
NC_000013.11	7.563	82.259	3.315	3.449
NC_000014.9	7.553	82.856	3.323	3.412
NC_000015.10	7.839	82.764	3.335	3.413
NC_000016.10	10.934	83.786	3.344	3.563
NC_000017.11	8.975	81.649	3.344	3.394
NC_000018.10	7.636	83.559	3.346	3.442
NC_000019.10	9.861	80.947	3.353	3.348
NC_000020.11	8.115	81.707	3.332	3.425
NC_000021.9	7.974	81.678	3.322	3.393
NC_000022.11	9.28	82.962	3.353	3.352

Tabla Suplementaria 27: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_CHIK2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.247	82.885	2.864	2.984
NC_000002.12	6.141	83.157	2.843	2.908
NC_000003.12	5.944	82.702	2.844	2.911
NC_000004.12	5.898	82.2	2.852	2.936
NC_000005.10	5.974	82.61	2.82	2.909
NC_000006.12	6.073	82.747	2.835	2.901
NC_000007.14	6.428	83.151	2.839	2.914
NC_000008.11	6.083	82.564	2.82	2.918
NC_000009.12	6.429	83.054	2.837	2.911
NC_000010.11	6.763	83.545	2.849	2.918
NC_000011.10	6.105	81.904	2.812	2.894
NC_000012.12	6.295	83.019	2.833	2.909
NC_000013.11	6.321	81.149	2.812	2.931
NC_000014.9	6.185	82.782	2.819	2.897
NC_000015.10	6.542	82.93	2.846	2.91
NC_000016.10	10.16	84.037	2.898	3.104
NC_000017.11	7.556	82.09	2.874	2.928
NC_000018.10	6.392	82.821	2.849	2.935
NC_000019.10	8.303	81.761	2.869	2.868
NC_000020.11	6.761	81.449	2.839	2.935
NC_000021.9	6.504	81.062	2.848	2.908
NC_000022.11	7.714	82.287	2.873	2.885

Tabla Suplementaria 28: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_CTL2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	8.328	83.787	3.362	3.473
NC_000002.12	7.27	84.307	3.331	3.399
NC_000003.12	7.011	83.863	3.327	3.404
NC_000004.12	6.958	83.585	3.339	3.428
NC_000005.10	7.07	83.798	3.32	3.407
NC_000006.12	7.186	84.081	3.331	3.395
NC_000007.14	7.674	84.602	3.35	3.41
NC_000008.11	7.175	83.974	3.328	3.404
NC_000009.12	7.649	83.926	3.327	3.41
NC_000010.11	7.936	84.519	3.345	3.405
NC_000011.10	7.296	83.097	3.311	3.393
NC_000012.12	7.491	84.178	3.337	3.399
NC_000013.11	7.337	82.928	3.308	3.432
NC_000014.9	7.375	84.215	3.334	3.395
NC_000015.10	7.742	83.861	3.353	3.399
NC_000016.10	11.157	84.676	3.388	3.588
NC_000017.11	9.053	83.29	3.363	3.407
NC_000018.10	7.457	84.263	3.331	3.429
NC_000019.10	10.162	83.024	3.398	3.38
NC_000020.11	8.022	82.756	3.347	3.42
NC_000021.9	7.88	82.877	3.367	3.406
NC_000022.11	9.442	83.987	3.373	3.375

Tabla Suplementaria 29: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_CTL_1.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	8.147	67.385	3.526	3.656
NC_000002.12	7.152	68.989	3.514	3.583
NC_000003.12	6.894	68.02	3.523	3.592
NC_000004.12	6.893	65.557	3.564	3.66
NC_000005.10	6.828	64.65	3.515	3.594
NC_000006.12	7.122	68.743	3.524	3.59
NC_000007.14	7.52	68.441	3.512	3.58
NC_000008.11	6.884	65.896	3.504	3.59
NC_000009.12	7.552	69.508	3.521	3.57
NC_000010.11	7.616	67.793	3.523	3.585
NC_000011.10	7.241	68.06	3.495	3.587
NC_000012.12	7.449	69.593	3.527	3.582
NC_000013.11	7.121	65.085	3.504	3.622
NC_000014.9	7.22	67.636	3.515	3.571
NC_000015.10	7.529	70.226	3.52	3.567
NC_000016.10	9.868	59.533	3.551	3.74
NC_000017.11	8.851	70.716	3.548	3.581
NC_000018.10	7.174	66.744	3.507	3.616
NC_000019.10	9.784	70.778	3.544	3.523
NC_000020.11	7.669	66.688	3.507	3.606
NC_000021.9	7.475	64.321	3.514	3.564
NC_000022.11	8.971	70.814	3.526	3.535

Tabla Suplementaria 30: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_DENV1.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.822	83.061	3.013	3.149
NC_000002.12	6.183	82.325	2.989	3.031
NC_000003.12	5.98	81.591	2.986	3.049
NC_000004.12	5.994	80.655	3.01	3.065
NC_000005.10	6.061	81.758	2.984	3.027
NC_000006.12	6.118	82.242	2.997	3.022
NC_000007.14	6.461	82.313	2.992	3.041
NC_000008.11	6.128	81.584	2.975	3.04
NC_000009.12	6.455	82.5	2.984	3.041
NC_000010.11	7.018	83.166	3.017	3.053
NC_000011.10	6.126	81.459	2.976	3.02
NC_000012.12	6.315	82.611	2.972	3.034
NC_000013.11	6.387	80.223	2.974	3.055
NC_000014.9	6.196	82.294	2.979	3.03
NC_000015.10	6.653	82.536	3.034	3.033
NC_000016.10	12.086	84.526	3.104	3.356
NC_000017.11	7.645	81.87	3.019	3.055
NC_000018.10	6.464	81.851	3.021	3.058
NC_000019.10	8.358	82.753	3.05	3.026
NC_000020.11	6.844	81.013	3.004	3.086
NC_000021.9	6.519	79.977	3	3.024
NC_000022.11	7.823	82.462	3.049	3.026

ANEXO E

Tabla Suplementaria 31: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_VCHIK_1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.07	57.792	4.624	5.346
Down2k	8.168	72.006	3.685	3.723
Up2k	8.068	53.682	3.662	3.746
mRNA	7.596	73.538	3.716	3.769
repeat	7.675	72.472	3.769	3.798
CpGIsland	19.074	59.299	3.818	3.999

Tabla Suplementaria 32: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_CTL_2.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.475	54.427	4.728	5.707
Down2k	8.348	70.203	3.403	3.401
Up2k	8.017	47.937	3.355	3.435
mRNA	7.827	72.915	3.393	3.432
repeat	7.992	73.695	3.478	3.48
CpGIsland	16.23	48.649	3.581	3.689

Tabla Suplementaria 33: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_CHIK1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	11.686	72.313	3.119	3.533
Down2k	7.551	82.942	2.667	2.695
Up2k	7.634	63.025	2.666	2.704
mRNA	6.845	84.874	2.653	2.711
repeat	7.153	87.102	2.725	2.76
CpGIsland	20.25	67.427	3.073	3.144

Tabla Suplementaria 34: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_DENV2

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.241	63.649	4.329	5.028
Down2k	8.32	83.647	3.143	3.156
Up2k	8.589	65.399	3.17	3.209
mRNA	7.533	84.891	3.129	3.169
repeat	7.902	86.351	3.203	3.227
CpGIsland	21.976	70.912	3.63	3.704

Tabla Suplementaria 35: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_CTL1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.16	65.476	3.777	4.215
Down2k	8.613	80.17	3.331	3.364
Up2k	8.301	53.693	3.318	3.366
mRNA	8.032	83.287	3.326	3.394
repeat	8.398	87.938	3.41	3.436
CpGIsland	16.134	49.021	3.495	3.591

Tabla Suplementaria 36: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_CHIK2.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	10.397	68.486	3.342	3.699
Down2k	7.095	81.685	2.85	2.876
Up2k	7.075	59.924	2.857	2.885
mRNA	6.565	83.864	2.837	2.891
repeat	6.822	86.183	2.91	2.943
CpGIsland	18.47	61.01	3.28	3.453

Tabla Suplementaria 37: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_CTL2.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.714	68.782	3.903	4.418
Down2k	8.586	82.149	3.338	3.377
Up2k	8.529	59.109	3.367	3.389
mRNA	7.909	84.692	3.341	3.385
repeat	8.3	88.186	3.426	3.44
CpGIsland	19.052	59.734	3.618	3.696

Tabla Suplementaria 38: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_CTL_1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	14.127	60.154	5.183	6.622
Down2k	8.64	71.268	3.534	3.54
Up2k	8.418	50.17	3.532	3.564
mRNA	8.059	73.573	3.523	3.563
repeat	8.172	74.047	3.606	3.608
CpGIsland	17.749	53.524	3.73	3.842

Tabla Suplementaria 39: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_DENV1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	10.329	54.532	4.41	5.04
Down2k	7.098	82.751	3.012	2.968
Up2k	7.294	64.614	3.05	3.039
mRNA	6.56	83.964	2.993	3.009
repeat	6.805	84.641	3.066	3.079
CpGIsland	21.74	71.319	3.633	3.783

Tabla Suplementaria 40: Proporción de CG, CHG y CHH en toda la citosina metilada

		mCG	mCHG	mCHH
SINO_VCHIK_1	mC number	4,810,900	389,391	1,355,187
	proportion (%)	73.387	5.94	20.673
SINO_VCHIK_2	mC number	4,498,480	320,572	1,067,621
	proportion (%)	76.418	5.446	18.136
SINO_CTL_1	mC number	5,602,328	382,843	1,221,385
	proportion (%)	77.739	5.312	16.948
SINO_CTL_2	mC number	5,586,187	373,708	1,181,039
	proportion (%)	78.228	5.233	16.539
BLOOD_CTL1	mC number	7,817,937	444,832	1,460,492
	proportion (%)	80.404	4.575	15.021
BLOOD_CTL2	mC number	7,605,719	436,029	1,493,183
	proportion (%)	79.767	4.573	15.66
BLOOD_CHIK1	mC number	6,605,834	275,110	1,019,766
	proportion (%)	83.611	3.482	12.907
BLOOD_CHIK2	mC number	6,151,173	306,770	1,149,172
	proportion (%)	80.861	4.033	15.107
BLOOD_DENV1	mC number	4,009,526	245,142	926,488
	proportion (%)	77.387	4.731	17.882
BLOOD_DENV2	mC number	5,353,360	306,180	1,081,297
	proportion (%)	79.417	4.542	16.041

Figura suplementaria 3. Distribución de los niveles de metilación en el grupo de control SINO_CTL. El gráfico de burbujas muestra el promedio del porcentaje de sitios metilados y no metilados en diferentes contextos genómicos (CG, CHG, CHH, mC, mCG, mCHG y mCHH) distribuidos en rangos del 10% al 100% de nivel de metilación (eje X). El tamaño de los círculos representa el porcentaje relativo de sitios que caen en cada categoría, de acuerdo con la escala indicada en la leyenda inferior.

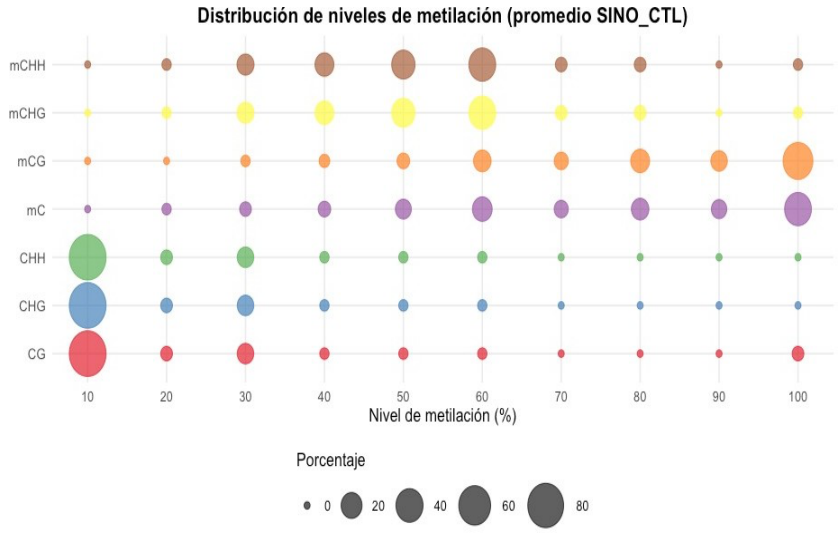


Figura suplementaria 4. Distribución de los niveles de metilación en el grupo de control de sangre (BLOOD_CTL). El gráfico de burbujas muestra el promedio del porcentaje de sitios metilados y no metilados en diferentes contextos genómicos (CG, CHG, CHH, mC, mCG, mCHG y mCHH) distribuidos en rangos del 10% al 100% de nivel de metilación (eje X). El tamaño de los círculos representa el porcentaje relativo de sitios que caen en cada categoría.

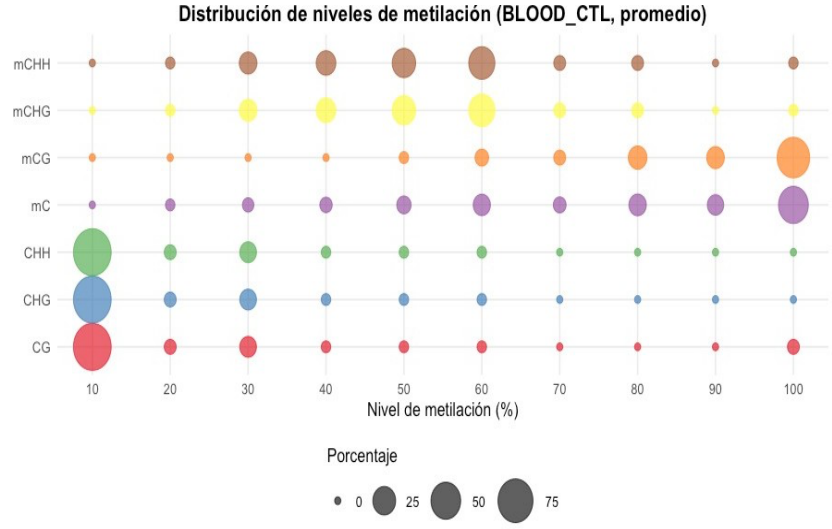
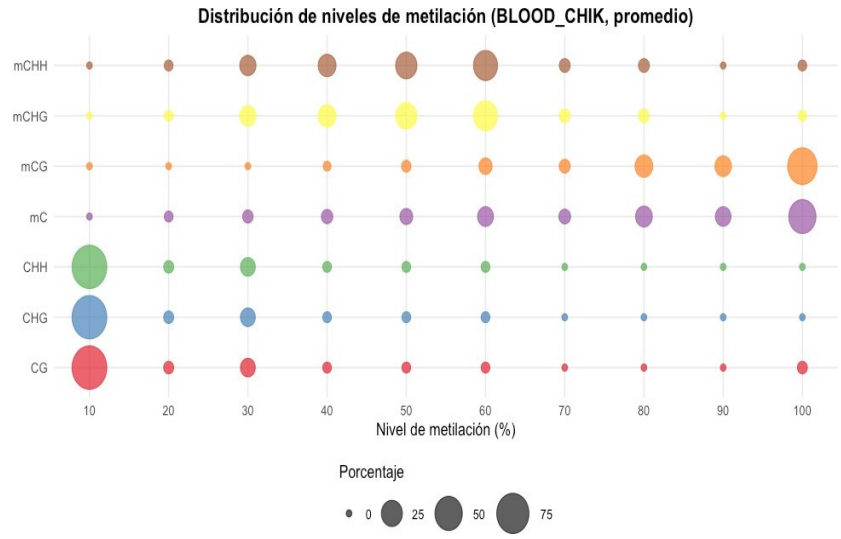


Figura suplementaria 5. Distribución de los niveles de metilación en el grupo de sangre con Chikungunya (BLOOD_CHIK). El gráfico de burbujas muestra el promedio del porcentaje de sitios metilados y no metilados en diferentes contextos genómicos (CG, CHG, CHH, mC, mCG, mCHG y mCHH) distribuidos en rangos del 10% al 100% de nivel de metilación (eje X). El tamaño de los círculos representa el porcentaje relativo de sitios que caen en cada categoría.



ANEXO F

Tabla Suplementaria 41: Evaluación global de la distribución del nivel de metilación de CG en los diferentes elementos.

CG	whole genome	CDS	CDS I %	Downstream 2K	downstream 2K %	Upstream 2K	upstream 2K %	mRNA	mRNA %	repeat	repeat %	CDS	CDS %
blood_CT L1	8397835	327049	3.89	206924	2.46	314569	3.75	3842023	45.75	1508861	17.97	128363	1.53
blood_CT L2	8089420	316124	3.91	188892	2.34	272118	3.36	3661091	45.26	1434778	17.74	121661	1.50
blood_CHI K1	7012159	237978	3.39	157206	2.24	229563	3.27	3103950	44.27	1192415	17.00	94708	1.35
blood_CHI K2	6578425	167492	2.55	140558	2.14	207486	3.15	2862661	43.52	1072512	16.30	71889	1.09
blood_DE NV1	4279250	96689	2.26	80402	1.88	112798	2.64	1775840	41.50	674466	15.76	40044	0.94
blood_DE NV2	5679718	195295	3.44	120081	2.11	173807	3.06	2473600	43.55	1012627	17.83	69382	1.22
SINO_CTL_1	6959147	342068	4.92	188668	2.71	271622	3.90	3346666	48.09	1315175	18.90	135697	1.95
SINO_CTL_2	6976162	319276	4.58	191285	2.74	275962	3.96	3378310	48.43	1333693	19.12	129120	1.85
SINO_CHIK_1	6046983	231988	3.84	151482	2.51	206061	3.41	2847810	47.09	1102859	18.24	98289	1.63
SINO_CHIK_2	5648927	245682	4.35	147348	2.61	209417	3.71	2284771	40.45	1053120	18.64	103265	1.83

Tabla Suplementaria 42: Evaluación global de la distribución del nivel de metilación de CHG en los diferentes elementos.

CHG	whole genome	CGI	CGI %	downstream 2k	Downstream 2k %	upstream 2k	Upstream 2k%	mRNA	mRNA %	repeat	repeat %	CDS	CDS %
blood_CTL1	36555355	377140	1.03	772938	2.11	870705	2.38	15723607	43.01	6965653	19.06	322463	0.88
blood_CTL2	35525164	355982	1.00	704838	1.98	767609	2.16	15052357	42.37	6571151	18.50	296189	0.83
blood_CHIK 1	32180237	261790	0.81	613134	1.91	674589	2.10	13409074	41.67	5715501	17.76	244127	0.76
blood_CHIK 2	32614870	183011	0.56	607212	1.86	658858	2.02	13472932	41.31	5722431	17.55	219194	0.67
blood_DEN V1	21331033	102567	0.48	354270	1.66	370782	1.74	8507356	39.88	3559021	16.68	123193	0.58
blood_DEN V2	25112099	208715	0.83	454182	1.81	494548	1.97	10333293	41.15	4541349	18.08	175164	0.70
SINO_CTL_ 1	27950559	386738	1.38	648581	2.32	718411	2.57	12581050	45.01	5458930	19.53	298947	1.07
SINO_CTL_ 2	28352399	365121	1.29	671633	2.37	740377	2.61	12915729	45.55	5645082	19.91	295430	1.04
SINO_CHIK_1	26437704	255717	0.97	567847	2.15	598612	2.26	11728829	44.36	4980985	18.84	236504	0.89
SINO_CHIK_2	23407148	278255	1.19	520780	2.22	569295	2.43	10486554	44.80	4522522	19.32	237393	1.01

Tabla Suplementaria 43: Evaluación global de la distribución del nivel de metilación de CHH en los diferentes elementos.

CHH	whole genome	CGI	CGI %	Downstream 2k	Downstream 2k %	Upstream 2k	Upstream 2k %	mRNA	mRNA %	repeat	repeat %	CDS	CDS %
blood_CTL1	15383295	76327	0.50	229299	1.49	262715	1.71	6231008	40.51	2096661	13.63	73924	0.48
blood_CTL2	15863571	71829	0.45	229739	1.45	247725	1.56	6355741	40.07	2098540	13.23	71762	0.45
blood_CHIK1	15567251	48006	0.31	220159	1.41	230192	1.48	6164563	39.60	2009572	12.91	62970	0.40
blood_CHIK2	15233212	28841	0.19	211491	1.39	217129	1.43	6012809	39.47	1971467	12.94	56388	0.37
blood_DENV 1	12516616	18836	0.15	162833	1.30	161438	1.29	4810619	38.43	1586800	12.68	41973	0.34
blood_DENV 2	14248489	46104	0.32	195896	1.37	209457	1.47	5573694	39.12	1884336	13.22	55473	0.39
SINO_CTL_1	11403700	84424	0.74	192007	1.68	222282	1.95	4845964	42.49	1600318	14.03	68142	0.60
SINO_CTL_2	11504436	79039	0.69	194763	1.69	220855	1.92	4935610	42.90	1652004	14.36	66646	0.58
SINO_CHIK_ 1	11635667	51989	0.45	184392	1.58	192710	1.66	4900034	42.11	1601125	13.76	57249	0.49
SINO_CHIK_ 2	9983436	58045	0.58	162956	1.63	178770	1.79	4224408	42.31	1389683	13.92	54240	0.54

Con el análisis bioinformático se identificaron diversos sitios diferencialmente metilados como CDS, Down, Up regulados miRNA, islas CpG, ver figura 20.

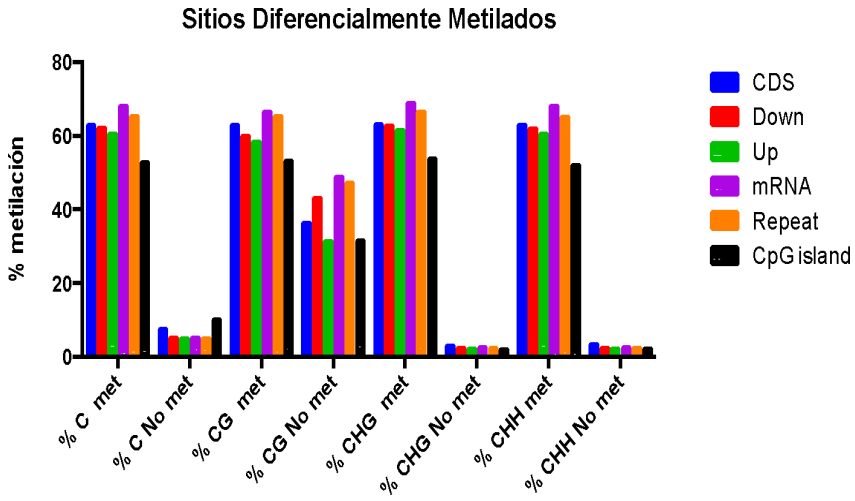


Figura suplementaria 6: Gráfica de los sitios sitios diferencialmente metilados identificados en el análisis bioinformático.

Tabla Suplementaria 44: Enriquecimiento de vías KEGG y Reactome para RDM entre el grupo 1 vs grupo 2.

	#Pathway	Count	Pvalue	Qvalue	gen
Reactome	RHO GTPase cycle	21	3.82E-05	1.42E-02	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;CDC42SE2;DIAPH3;DNMBP;DOCK2;DOCK4;DSP;DST;FMNL2;GOLGA3;MCF2L;NGEF;OPHN1;PCDH7;RHOU;SH3PXD2A;TIAM1;USP9X
Reactome	CDC42 GTPase cycle	13	3.13E-06	2.33E-03	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;CDC42SE2;DIAPH3;DNMBP;FMNL2;MCF2L;NGEF;OPHN1;SH3PXD2A;TIAM1
KEGG	Metabolic pathways	8	0.6114997	0.7323471	PIGK, MGAT4A, INPP5B, PLA2G2C, MTHFD1, B3GALT1, ENTREP1, LDHB
Reactome	RAC2 GTPase cycle	8	1.48E-04	2.74E-02	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;DIAPH3;DOCK2;DOCK4;OPHN1;TIAM1
Reactome	RHOG GTPase cycle	7	3.01E-04	4.48E-02	ARHGAP1;CDC42;DIAPH3;DOCK2;DOCK4;MCF2L;OPHN1
KEGG	Rap1 signaling pathway	6	0.03451792	0.6461343	GNAS; PRKCZ; MAP2K3; MAGI1; LPAR5; CNR1
Reactome	RHOJ GTPase cycle	6	3.77E-04	4.67E-02	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;DIAPH3;OPHN1
KEGG	PI3K-Akt signaling pathway	3	0.8189024	0.8857495	SGK1; XPR1; LPAR5
KEGG	MAPK signaling pathway	2	0.4735297	0.6790758	MAP2K3; CACNA1B
KEGG	mTOR signaling pathway	2	0.6560157	0.7626807	SGK1; XPR1
KEGG	cAMP signaling pathway	2	0.2946427	0.6461343	CNGA1; GNAS
KEGG	Chemokine signaling pathway	2	0.2931908	0.6461343	SH3PXD2A
KEGG	Platelet activation	2	0.5439238	0.6993306	GNAS
KEGG	Influenza A	2	0.2801103	0.6461343	MAP2K3
KEGG	Calcium signaling pathway	2	0.2931908	0.6461343	GNAS; CACNA1B
KEGG	Lysosome	2	0.235058	0.6461343	LGMN, ENTREP1
KEGG	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	2	0.1045393	0.6461343	GNAS; MAP2K3
KEGG	Mismatch repair	2	0.007843073	0.6461343	RPA2; AHNAK
KEGG	Viral myocarditis	2	0.07600791	0.6461343	SGCB; EIF4G3
KEGG	Toll-like receptor signaling pathway	1	0.4103478	0.6790758	MAP2K3
KEGG	Fc gamma R-mediated phagocytosis	1	0.5007078	0.6790758	SH3PXD2A
KEGG	TNF signaling pathway	1	0.4103478	0.6790758	MAP2K3
KEGG	TGF-beta signaling pathway	1	0.3281952	0.6461343	LTBP1
KEGG	FoxO signaling pathway	1	0.4743066	0.6790758	SGK1
KEGG	Wnt signaling pathway	1	0.8883649	0.9250742	XPR1
KEGG	Ras signaling pathway	1	0.741198	0.8264686	PLA2G2C
KEGG	cGMP-PKG signaling pathway	1	0.6219138	0.7323471	CNGA1
KEGG	Arachidonic acid metabolism	1	0.3120896	0.6461343	PLA2G2C
KEGG	Inositol phosphate metabolism	1	0.349092	0.676229	INPP5B
KEGG	Epstein-Barr virus infection	1	0.7338499	0.8255811	MAP2K3
KEGG	MicroRNAs in cancer	1	0.5856947	0.7184915	ZFPM2
KEGG	Lysine degradation	1	0.5007078	0.6790758	PRDM2
KEGG	Fc epsilon RI signaling pathway	1	0.3120896	0.6461343	MAP2K3
KEGG	Fanconi anemia pathway	1	0.2585339	0.6461343	RPA2
KEGG	Nucleotide excision repair	1	0.2407823	0.6461343	RPA2
KEGG	N-Glycan biosynthesis	1	0.2317499	0.6461343	MGAT4A
KEGG	Pentose phosphate pathway	1	0.1251213	0.6461343	RBKS
KEGG	Other glycan degradation	1	0.09714789	0.6461343	ENTREP1

Tabla Suplementaria 45: Enriquecimiento de vías KEGG y Reactome para RDM entre el grupo 3 vs grupo 4.

	#Pathway	Sample1	Pvalue	Qvalue	Genes
Reactome	RHO GTPase cycle	21	3.82E-05	0.01421165	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;CDC42SE2;DIAPH3;DNMBP;DOCK2;DOCK4;DSP;DST;FMNL2;GOLGA3;MCF2L;NGEF;OPHN1;PCDH7;RHOU;SH3PXD2A;TIAM1;USP9X
Reactome	CDC42 GTPase cycle	13	3.13E-06	0.00232676	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;CDC42SE2;DIAPH3;DNMBP;FMNL2;MCF2L;NGEF;OPHN1;SH3PXD2A;TIAM1
KEGG	Rap1 signaling pathway	6	0.03451792	0.6461343	GNAS;PRKCZ;MAP2K3;MAGI1;LPAR5;CNR1
KEGG	Mismatch repair	2	0.00784307	0.6461343	RPA2;AHNAK
KEGG	FoxO signaling pathway	1	0.05071266	0.136261	LOC107987372
KEGG	Fc gamma R-mediated phagocytosis	1	0.05466317	0.136261	TPTE
KEGG	cAMP signaling pathway	1	0.08459616	0.1691923	TPTE
KEGG	Ras signaling pathway	1	0.1036257	0.1884104	TPTE
KEGG	Platelet activation	1	0.1381725	0.2149379	LOC107987372
KEGG	PI3K-Akt signaling pathway	1	0.2250019	0.2368441	LOC107987372, LPAR5
KEGG	Metabolic pathways	1	0.4662364	0.4662364	TPTE, LDHB
KEGG	Ether lipid metabolism	1	0.02142383	0.136261	TPTE
KEGG	Glycerophospholipid metabolism	1	0.04154358	0.136261	TPTE
KEGG	GnRH signaling pathway	1	0.04368961	0.136261	TPTE
KEGG	Glutamatergic synapse	1	0.04796965	0.136261	TPTE
KEGG	Sphingolipid signaling pathway	1	0.04827475	0.136261	TPTE
KEGG	Choline metabolism in cancer	1	0.05557288	0.136261	TPTE
KEGG	Phospholipase D signaling pathway	1	0.06131743	0.136261	TPTE, LPAR5
KEGG	ECM-receptor interaction	1	0.1471209	0.2149379	LOC107987372
KEGG	Endocytosis	1	0.1504565	0.2149379	TPTE
KEGG	Regulation of autophagy	1	0.1694261	0.2259015	TPTE
KEGG	Focal adhesion	1	0.198144	0.227773	LOC107987372
KEGG	Protein digestion and absorption	1	0.201576	0.227773	LOC107987372
KEGG	Amoebiasis	1	0.2049957	0.227773	LOC107987372
KEGG	Propanoate metabolism	1	0.03574766	0.1578808	LDHB
KEGG	Cysteine and methionine metabolism	1	0.04218313	0.1578808	LDHB
KEGG	Pyruvate metabolism	1	0.04857871	0.1578808	LDHB
KEGG	Glycolysis / Gluconeogenesis	1	0.06474324	0.1683324	LDHB
KEGG	Glucagon signaling pathway	1	0.09968095	0.2159754	LDHB
KEGG	Retrograde endocannabinoid signaling	1	0.1308016	0.2231008	CNR1
KEGG	Neuroactive ligand-receptor interaction	1	0.2317414	0.3035266	CNR1
KEGG	Tight junction	1	0.233482	0.3035266	MYH9
KEGG	Pathways in cancer	1	0.6039585	0.6542884	LPAR5

Tabla Suplementaria 46: Top 15 de regiones de factores de transcripción entre el grupo 1 vs grupo 2.

chrom	chromStart	chromEnd	name	score	evidenceSources	elementType	eliteness	Sitios de unión de factores de transcripción	No factores de transcripción
chr1	8115208	8123749	GH01J008115	456	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Enhancer	Elite	KLF6, DPF2, NCOR1, ATF3, KLF9, YY1, CEBPA, NFIC, CE	198
chr12	45356749	45358584	GH12J045356	192	ENCODE(Z-Lab),dbSUPER	Enhancer	Elite	MAFF, ZNF316, RXRA, RARA, MAFK, MAFG, HNF4A, NR2F6, GATA2, CHD2, NR2F2, EMSY,	12
chr17	78733351	78760399	GH17J078733	812	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	KLF6, POLR2A, SP1, ATF2, ZNF580, DPF2, JUND, KLF17	292
chr22	27789815	27792009	GH22J027789	437	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,FANTOM5,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	KLF17, ZIC2, ZNF600, TCF12, FEZF1, ZNF585B, ZNF843	37
chr5	35861582	35862400	GH05J035861	215	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,dbSUPER	Enhancer	Elite	JUND, HIC1, CTCF, CEBPB, TRIM22, EP300, RAD21, IRF4	48
chrX	68496819	68500185	GH0XJ068496	560	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl	Promoter/Enhancer	Elite	HCFC1, POLR2A, ATF2, KLF17, ZNF600, YY1, BRCA1, NF	150
chr1	86772837	86776407	GH01J086772	501	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Enhancer	Elite	ATF2, ZNF580, DPF2, JUND, KLF17, NCOR1, ZNF184, ZI	215
chr10	100004256	100011153	GH10J100004	616	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	DPF2, JUND, ZNF184, CTCF, ZIC2, ZNF600, ZNF10, YY1,	141
chr2	48356201	48357868	GH02J048356	332	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Enhancer	Elite	ZNF592, ZNF316, MYC, ZBTB33, CHAMP1, RFX1, ZNF217, GABPB1, POLR2A, BMI1, CC2D1A,	11
chr2	64402690	64407594	GH02J064402	337	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,dbSUPER	Enhancer	Elite	ATF3, POLR2A, CEBPG, YY1, CEBPA, IRF2, SAP130, HOM	64
chr2	105928464	105928614	GH02J105929	63	ENCODE(Z-Lab),dbSUPER	Enhancer	Elite	KLF9, CEBPA, CHD4, KDM6A, FOXA2, ZNF511, SP1, MA	52
chr3	42936000	42937000	GH03J042936	364	EPDnew,Ensembl	Promoter	Elite	ZBTB40, CREM, L3MBTL2, GABPB1, ATF1, NR2C1, MGA,	7
chr5	131208455	131213672	GH05J131208	409	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl	Promoter/Enhancer	Elite	BCL11A, ZNF207, TRIM22, SIN3A, CHD1, REST, NR2C1,	63
chr1	13699220	13705309	GH01J013699	539	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	POLR2A, SP1, BCL11A, ZNF592, RCOR1, MAZ, SIN3A, C	91
chr1	16611168	16614326	GH01J016611	624	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	KLF6, SP1, JUND, POLR2A, KLF9, DNMT3B, YY1, BRCA1	177

Tabla Suplementaria 47: Top 15 de regiones de regiones CTCF entre el grupo 1 vs grupo 2.

chrom	chromStart	chromEnd	name	score	ccre	encodeLabel	zScore	ucscLabel	ccessionLabe	description
chr1	8121077	8121279	EH38E1315771	450	dELS,CTCF-bound	dELS	4.50635792	enhD	E1315771	distal enhancer-like signature
chr12	45357386	45357575	EH38E1607310	278	dELS,CTCF-bound	dELS	2.78149154	enhD	E1607310	distal enhancer-like signature
chr17	78735865	78736117	EH38E1889427	427	dELS,CTCF-bound	dELS	4.27137603	enhD	E1889427	distal enhancer-like signature
chr22	27789780	27789941	EH38E2155761	191	dELS,CTCF-bound	dELS	1.91622467	enhD	E2155761	distal enhancer-like signature
chr5	35861722	35862068	EH38E2365757	419	dELS,CTCF-bound	dELS	4.19055432	enhD	E2365757	distal enhancer-like signature
chrX	68498416	68498628	EH38E2757107	319	PLS,CTCF-bound	PLS	3.19990709	prom	E2757107	promoter-like signature
chrX	68498628	68498782	EH38E2757108	312	PLS,CTCF-bound	PLS	3.12480039	prom	E2757108	promoter-like signature
chr1	86775494	86775706	EH38E1364483	318	dELS	dELS	3.18534999	enhD	E1364483	distal enhancer-like signature
chr10	100007891	100008108	EH38E1493249	251	pELS	pELS	2.5125751	enhP	E1493249	proximal enhancer-like signature
chr2	48356705	48356921	EH38E1996512	408	dELS	dELS	4.08652678	enhD	E1996512	distal enhancer-like signature
chr2	64403392	64403703	EH38E2003781	235	dELS	dELS	2.35679232	enhD	E2003781	distal enhancer-like signature
chr2	105928181	105928528	EH38E2022275	229	dELS	dELS	2.29475271	enhD	E2022275	distal enhancer-like signature
chr3	42936158	42936504	EH38E2195774	388	PLS	PLS	3.88219967	prom	E2195774	promoter-like signature
chr5	131210487	131210745	EH38E2407659	221	dELS	dELS	2.21324227	enhD	E2407659	distal enhancer-like signature
chr1	8116637	8116940	EH38E1315765	375	dELS	dELS	3.75526283	enhD	E1315765	distal enhancer-like signature

Tabla Suplementaria 48: Top 15 de islas CpG entre el grupo 1 vs grupo 2.

chrom	chromStart	chromEnd	name	length	cpgNum	gcNum	perCpg	perGc	obsExp	Genes
chr1	228635026	228635503	CpG: 45	477	45	309	18.9	64.8	0.9	
chr1	228643959	228644442	CpG: 46	483	46	315	19	65.2	0.9	
chr1	16644360	16644997	CpG: 64	637	64	438	20.1	68.8	0.89	CROCCP2
chr1	228644876	228645627	CpG: 70	751	70	509	18.6	67.8	0.82	RHOU, DUSP5P1
chr10	125895680	125896969	CpG: 152	1289	152	898	23.6	69.7	0.97	DHX32, FANK1
chr10	133664428	133685058	CpG: 1524	20630	1524	10996	14.8	53.3	1.04	
chr10	133740607	133761247	CpG: 1524	20640	1524	10980	14.8	53.2	1.04	
chr14	19097382	19099647	CpG: 209	2265	209	1558	18.5	68.8	0.78	DUXAP9
chr15	20294622	20295605	CpG: 100	983	100	627	20.3	63.8	1.02	
chr17	74356688	74357659	CpG: 116	971	116	667	23.9	68.7	1.02	BTBD17
chr17	4782401	4783020	CpG: 46	619	46	389	14.9	62.8	0.75	TM4SF5
chr20	26208002	26209712	CpG: 198	1710	198	1211	23.2	70.8	0.93	MIR663AHG
chr20	63342509	63342945	CpG: 39	436	39	282	17.9	64.7	0.86	
chr20	29410522	29411565	CpG: 79	1043	79	698	15.1	66.9	0.68	
chr20	29410522	29411565	CpG: 79	1043	79	698	15.1	66.9	0.68	

Tabla Suplementaria 49: Top 15 de cirRNA entre el grupo 1 vs grupo 2.

RNA_1.seqna	circRNA_1.start	circRNA_1.end	circRNA_1.width	circRNA_1.strand	circRNA_1.score	rages.start	rages.end	rages.width
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16543890	16543952	63
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-RPA2_0009	16581587	16581653	67
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-KPNA6_0005	16606452	16606470	19
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-SCMH1_0029	16606966	16607012	47
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-SCMH1_0040	16611730	16611822	93
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-SPATA6_0002	16614499	16614518	20
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-FGGY_0009	16614545	16614579	35
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-PRKACB_0011	16622617	16622625	9
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-EVI5_0011	16627709	16627801	93
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-EVI5_0033	16630168	16630182	15
chr1	27894012	27907282	13271	-	hsa-EVI5_0001	27895603	27895663	61
chr1	32154588	32167296	12709	+	hsa-EVI5_0004	32162959	32163060	102
chr1	41113283	41186250	72968	-	hsa-MAN1A2_0021	41181234	41181268	35
chr1	41142878	41186250	43373	-	hsa-MAN1A2_0025	41181234	41181268	35
chr1	48305787	48359770	53984	-	hsa-ASH1L_0068	48316666	48316744	79

Tabla Suplementaria 50: Top 15 de piRNA entre el grupo 1 vs grupo 2.

bdpiRNA.seqnames	bdpiRNA.start	bdpiRNA.end	bdpiRNA.widt	bdpiRNA.stran	bdpiRNA.score	ges.seqname	rages.start	rages.end	rages.width
chr1	103492801	103492828	28	-	hsa-piR-10185	chr1	103492785	103492806	22
chr1	181278336	181278366	31	+	hsa-piR-11298	chr1	181278274	181278457	184
chr1	60289301	60289328	28	+	hsa-piR-12263	chr1	60289285	60289375	91
chr8	46607850	46607877	28	+	hsa-piR-12263	chr8	46607819	46607894	76
chr1	21135936	21135963	28	+	hsa-piR-12263	chr1	21135920	21136139	220
chr5	176151220	176151247	28	-	hsa-piR-12263	chr5	176151183	176151234	52
chr22	25278331	25278357	27	+	hsa-piR-12653	chr22	25278348	25278428	81
chr10	103606777	103606803	27	-	hsa-piR-12653	chr10	103606747	103606784	38
chr14	76915690	76915716	27	-	hsa-piR-13413	chr14	76915664	76915729	66
chr1	179039963	179039991	29	-	hsa-piR-1408	chr1	179039907	179040150	244
chr21	10616421	10616447	27	+	hsa-piR-14451	chr21	10616390	10616608	219
chr6	36367251	36367280	30	-	hsa-piR-1513	chr6	36367253	36367366	114
chrX	115972226	115972254	29	+	hsa-piR-15181	chrX	115972223	115972253	31
chr9	125458948	125458975	28	-	hsa-piR-18630	chr9	125458940	125458953	14
chr2	32294631	32294656	26	-	hsa-piR-18631	chr2	32294619	32294751	133

Tabla Suplementaria 51: Top 15 de lcnRNA entre el grupo 1 vs grupo 2.

lncRNA_1.seqnames	lncRNA_1.start	lncRNA_1.end	lncRNA_1.width	lncRNA_1.strand	rages.start	rages.end	rages.width	lncRNA_1.score
chr1	16629670	16631109	1440	-	16630168	16630182	15	lnc-NBPF1-1
chr1	16620845	16624878	4034	-	16622617	16622625	9	lnc-NBPF1-1
chr1	16605418	16607691	2274	-	16606452	16606470	19	lnc-NBPF1-2
chr1	16605418	16607691	2274	-	16606966	16607012	47	lnc-NBPF1-2
chr1	629062	629433	372	+	629115	629221	107	lnc-SAMD11-15
chr1	629082	629284	203	-	629115	629221	107	lnc-OR4F16-8
chr1	629832	630220	389	-	630061	630201	141	lnc-OR4F16-8
chr1	631317	631399	83	-	631246	631367	122	lnc-OR4F16-8
chr1	633641	633963	323	-	633712	633944	233	lnc-OR4F16-8
chr1	633641	633963	323	-	633751	634170	420	lnc-OR4F16-8
chr1	633641	633963	323	-	633951	634194	244	lnc-OR4F16-8
chr1	629640	630683	1044	+	629657	629826	170	lnc-SAMD11-14
chr1	629640	630683	1044	+	630061	630201	141	lnc-SAMD11-14
chr1	631084	632680	1597	+	631246	631367	122	lnc-SAMD11-13
chr1	633535	633741	207	+	633712	633944	233	lnc-SAMD11-12

Tabla Suplementaria 52: Top 15 de regiones de factores de transcripción entre el grupo 3 vs grupo 4.

chr	chromStart	chromEnd	name	score	strand	reserved	idenceSourc	elementType	eliteness
chr1	64136369	64139506	GH01J064136	195	.	95,95,95	)E(Z-Lab),Er	Enhancer	Elite
chr10	33261747	33266818	GH10J033261	379	.	95,95,95	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chr12	50783975	50790525	GH12J050783	421	.	95,95,95	nsembl,FAI	Enhancer	Elite
chr16	68655900	68661722	GH16J068655	322	.	95,95,95	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chr19	48780246	48783173	GH19J048780	387	.	95,95,95	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chr2	69692301	69698024	GH02J069692	241	.	95,95,95	)E(Z-Lab),Er	Enhancer	Elite
chr3	30679217	30685883	GH03J030679	344	.	95,95,95	nsembl,FAI	Enhancer	Elite
chr5	59542655	59544916	GH05J059542	228	.	95,95,95	)E(Z-Lab),Er	Enhancer	Elite
chr7	139131200	139132400	GH07J139131	178	.	95,95,95	embl,dbSUI	Enhancer	Elite
chr8	95086800	95089345	GH08J095086	235	.	95,95,95	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chrX	115843220	115889529	GH0XJ115843	125	.	160,160,160	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chr1	16611168	16614326	GH01J016611	624	.	204,0,0	EPDnew,En	Promoter/Enhancer	Elite
chr1	66329493	66338779	GH01J066329	692	.	204,0,0	ew,Ensemb	Promoter/Enhancer	Elite
chr10	11160825	11184915	GH10J011160	800	.	204,0,0	ew,Ensemb	Promoter/Enhancer	Elite
chr11	61391000	61394018	GH11J061391	622	.	204,0,0	Lab),EPDne	Promoter/Enhancer	Elite

Tabla Suplementaria 53: Top 15 de regiones de regiones CTCF entre el grupo 3 vs grupo 4.

#chrom	chromStart	chromEnd	name	score	ccre	encodeLabel	zScore	ucscLabel	description
chr13	38045781	38046128	EH38E1668865	348	CTCF-only,CTCF-bound	CTCF-only	3.48688856	CTCF	CTCF-only
chr15	20252613	20252835	EH38E1747678	170	CTCF-only,CTCF-bound	CTCF-only	1.70202163	CTCF	CTCF-only
chr2	91500625	91500782	EH38E2015814	174	CTCF-only,CTCF-bound	CTCF-only	1.74955622	CTCF	CTCF-only
chr21	9017283	9017527	EH38E2130301	184	CTCF-only,CTCF-bound	CTCF-only	1.84664329	CTCF	CTCF-only
chr1	16608284	16608629	EH38E1322544	429	dELS	dELS	4.29916381	enhD	distal enhancer-like signature
chr1	64138414	64138764	EH38E1354938	351	dELS,CTCF-bound	dELS	3.51373271	enhD	distal enhancer-like signature
chr1	117822167	117822511	EH38E1380722	308	dELS	dELS	3.08183793	enhD	distal enhancer-like signature
chr10	89351006	89351350	EH38E1487115	329	dELS	dELS	3.29189045	enhD	distal enhancer-like signature
chr11	72962144	72962425	EH38E1551257	320	dELS	dELS	3.20107944	enhD	distal enhancer-like signature
chr12	50788582	50788932	EH38E1611258	465	dELS	dELS	4.65434193	enhD	distal enhancer-like signature
chr12	97473458	97473804	EH38E1636133	221	dELS,CTCF-bound	dELS	2.21111025	enhD	distal enhancer-like signature
chr12	131090697	131091039	EH38E1656579	326	dELS	dELS	3.26312982	enhD	distal enhancer-like signature
chr13	77290379	77290727	EH38E1684742	181	dELS	dELS	1.81073721	enhD	distal enhancer-like signature
chr14	97409445	97409684	EH38E1740389	384	dELS	dELS	3.84884341	enhD	distal enhancer-like signature
chr16	55624705	55625046	EH38E1817505	330	dELS,CTCF-bound	dELS	3.30713038	enhD	distal enhancer-like signature

Tabla Suplementaria 54: Top 15 de islas CpG entre el grupo 3 vs grupo 4.

chr	chromStart	chromEnd	name	length	cpgNum	gcNum	perCpg	perGc	obsExp
chr1	16534378	16535801	CpG: 105	1423	105	847	14.8	59.5	0.84
chr1	16646990	16648550	CpG: 131	1560	131	1012	16.8	64.9	0.8
chr1	156216446	156216856	CpG: 44	410	44	275	21.5	67.1	0.95
chr1	228635026	228635503	CpG: 45	477	45	309	18.9	64.8	0.9
chr1	228644876	228645627	CpG: 70	751	70	509	18.6	67.8	0.82
chr10	125895680	125896969	CpG: 152	1289	152	898	23.6	69.7	0.97
chr10	133030938	133031430	CpG: 41	492	41	299	16.7	60.8	0.91
chr19	11033299	11033573	CpG: 22	274	22	179	16.1	65.3	0.75
chr22	10741251	10742442	CpG: 124	1191	124	811	20.8	68.1	0.9
chr22	12693669	12694075	CpG: 33	406	33	297	16.3	73.2	0.61
chr3	75668965	75670008	CpG: 94	1043	94	729	18	69.9	0.74
chr3	75672143	75672758	CpG: 59	615	59	419	19.2	68.1	0.83
chr4	53304	53778	CpG: 46	474	46	325	19.4	68.6	0.83
chr4	131975205	131975729	CpG: 38	524	38	287	14.5	54.8	0.97

Tabla Suplementaria 55: Top 15 de cirRNA entre el grupo 3 vs grupo 4.

circ_gr.seqnames	circ_gr.start	circ_gr.end	circ_gr.width	circ_gr.strand	circ_gr.circAltas_ID	dmr_gr.start	dmr_gr.end	dmr_gr.width
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16535799	16536004	206
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16606266	16606298	33
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16608324	16608334	11
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16612929	16612943	15
chr1	42227883	42278672	50790	-	hsa-FOXJ3_0004	42232727	42232762	36
chr1	42227883	42311110	83228	-	hsa-FOXJ3_0003	42232727	42232762	36
chr1	42227883	42323827	95945	-	hsa-FOXJ3_0035	42232727	42232762	36
chr1	48305787	48359770	53984	-	hsa-SPATA6_0002	48316824	48316853	30
chr1	50655442	50781044	125603	-	hsa-FAF1_0060	50762210	50762312	103
chr1	59315592	59378837	63246	+	hsa-FGGY_0035	59373460	59373751	292
chr1	59316146	59378837	62692	+	hsa-FGGY_0032	59373460	59373751	292
chr1	59321536	59378837	57302	+	hsa-FGGY_0006	59373460	59373751	292
chr1	59321536	59457076	135541	+	hsa-FGGY_0012	59373460	59373751	292
chr1	59321536	59474202	152667	+	hsa-FGGY_0016	59373460	59373751	292
chr1	59331843	59378837	46995	+	hsa-FGGY_0030	59373460	59373751	292

Tabla Suplementaria 56: Top 15 de piRNA entre el grupo 3 vs grupo 4.

chr	bdpiRNA.start	bdpiRNA.end	bdpiRNA.width	bdpiRNA.stra	score	grupo3_rages.start	grupo3_rages.end	grupo3_rages.width
chr2	187557418	187557445	28	+	hsa-piR-1138	187557396	187557662	267
chr21	10331183	10331211	29	-	hsa-piR-11617	10331030	10331287	258
chr2	187557585	187557614	30	+	hsa-piR-11707	187557396	187557662	267
chr2	218527026	218527053	28	-	hsa-piR-12263	218526977	218527039	63
chr3	85394033	85394060	28	-	hsa-piR-12263	85394041	85394087	47
chr1	155577326	155577353	28	-	hsa-piR-12263	155577322	155577379	58
chr1	25415405	25415432	28	+	hsa-piR-12263	25415417	25415606	190
chr13	64329420	64329447	28	-	hsa-piR-12263	64329402	64329471	70
chr1	55117481	55117508	28	+	hsa-piR-12263	55117465	55117555	91
chr1	217704488	217704515	28	-	hsa-piR-12263	217704500	217704545	46
chr22	48045996	48046023	28	-	hsa-piR-12263	48045995	48046028	34
chr7	55729957	55729984	28	-	hsa-piR-12263	55729909	55729966	58
chr9	40998518	40998545	28	-	hsa-piR-12263	40998481	40998566	86
chr3	196243816	196243842	27	-	hsa-piR-12653	196243777	196243866	90
chr2	187557658	187557686	29	+	hsa-piR-1408	187557396	187557662	267

Tabla Suplementaria 57: Top 15 de lcnRNA entre el grupo 3 vs grupo 4.

chr	lncRNA_1.end	lncRNA_1.width	lncRNA_1.strand	lncRNA_1.score	grupo3_rages.end	grupo3_rages.width	grupo3_rages.strand	score
chr1	16647399	16648684	1286	-	16648378	16648448	71	lnc-NBPF1-3
chr1	16605418	16607691	2274	-	16606266	16606298	33	lnc-NBPF1-2
chr1	16534826	16536988	2163	-	16535799	16536004	206	LINC01783
chr1	16535760	16538174	2415	+	16535799	16536004	206	lnc-NECAP2-3
chr1	16605406	16607691	2286	-	16606266	16606298	33	lnc-NBPF1-2
chr1	16607310	16608717	1408	+	16608324	16608334	11	lnc-CROCC-8
chr1	16647463	16648664	1202	+	16648378	16648448	71	lnc-CROCC-3
chr1	16647784	16648664	881	+	16648378	16648448	71	lnc-CROCC-3
chr1	16535780	16536172	393	-	16535799	16536004	206	LINC01783
chr10	41841272	41841907	636	-	41841536	41841550	15	lnc-ZNF33B-13
chr10	94612287	94613904	1618	+	94612756	94612768	13	lnc-CYP2C18-1
chr11	63251257	63252185	929	+	63251356	63251405	50	lnc-SLC22A9-2
chr12	7516185	7516260	76	+	7516234	7516241	8	lnc-ACSM4-4
chr12	97473356	97482545	9190	+	97473620	97473661	42	lnc-NEDD1-8

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL
Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento
El trabajo fue financiado por la convocatoria de Ciencia de Frontera 2019, con el No. De trabajo: FORDECYT-PRONACES/514867/2020.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este camino doctoral, he contado con el apoyo invaluable de muchas personas, sin las cuales este logro no habría sido posible.

En primer lugar, agradezco profundamente al Dr. Gustavo Ponce por permitirme integrarme a su grupo de trabajo, cuya guía, generosidad y compromiso académico marcaron profundamente mi formación, dejando una huella imborrable en mi desarrollo académico y personal.

A mis codirectores/as, el Dr. Iram Pablo Rodríguez Sánchez, Dra. María de Lourdes Ramírez Ahuja, Dr. Gerardo de Jesús Trujillo Rodríguez, Dra. Beatriz López Monroy, Dr. Jesús Dávila Barboza Salas gracias por su apoyo, sus críticas constructivas y los momentos compartidos.

A la Dra. Laura Martínez de Villarreal, por su impulso, apoyo y confianza para llevar a cabo este proyecto.

Agradezco también a SECIHTI, por la beca otorgada y los recursos para llevar a cabo este proyecto.

Y, sobre todo, a mi familia. Gracias a mis padres, Laura Patricia y Federico, por su amor incondicional, sus sacrificios y por enseñarme el valor del esfuerzo y la educación. A mis hermanos Ángel, Aldo y Eva, por su compañía, apoyo constante y por estar siempre presentes en cada etapa de mi vida, brindándome ánimo y confianza cuando más lo necesitaba. A mis hijos Aldo y Diego, gracias por ser mi sostén en los días difíciles y mi alegría en los días de logro. A todos ustedes, les debo la fuerza y la motivación que me han permitido llegar hasta aquí.

A mi esposa Geovana, por su amor, paciencia y comprensión en cada etapa de este camino. Tu apoyo incondicional y tu confianza en mí han sido fundamentales para que esta etapa llegara a su término.

Este trabajo es resultado de un esfuerzo colectivo. A cada una de las personas que me acompañaron en este trayecto: gracias, de corazón.

No somos solo producto de nuestros genes, sino de cómo nuestras experiencias moldean su expresión

Michael Meaney

DEDICATORIA

Primeramente, a mis padres, por ser mi origen, mi motor y mi refugio.
A mis hijos, por ser mi sostén en los días difíciles, mi motivación diaria.
A Geo, por creer en mí incluso cuando yo dudaba.
Y a quienes sueñan con llegar, que sepan que sí se puede.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE FIGURAS
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS
RESUMEN
1.INTRODUCCIÓN……. 1
2.ANTECEDENTES……. 3
2.1 EPIGENÉTICA…… 3
2.2 TIPOS DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS……..……. 3
2.2.1 MODIFICACIÓN DE HISTONAS……..…… 4
2.2.2 RNA NO CODIFICANTE…….…….…….. 5
2.2.3 METILACIÓN DEL ADN…… 7
2.3 PROCESO DE METILACIÓN DEL ADN…….. 9
2.4 CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN LA INTERACCIÓN HUÉSPED- PATOGENO…….. 10
2.5 EPIGENÉTICA EN INFECCIÓN POR VIRUS.....…….…..….. 11
2.6 EPIGENÉTICA EN ARBOVIRUS..... ……... 13
2.7 ASPECTOS CLÍNICOS DEL VIRUS CHIKUNGUNYA.....…….... 14
3. JUSTIFICACIÓN.....…….....…….....…….... 16
4. HIPÓTESIS.....…….....…….....…….... 17
5.OBJETIVOS.....…….....…….....…….... 18
5.1 OBJETIVO GENERAL.....…….....…….....…….... 18
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....…….....…….....…….... 18
6. ESTRATEGIA GENERAL.....…….....…….....…… 19
7. MATERIAL Y MÉTODOS..... .....…….....…….... 20
7.1 LUGAR DE REALIZACIÓN.....…….....…….... 20
7.2 INFECCIÓN VIRAL EN CULTIVOS CELULARES.....…….....…….... 20
7.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN..... .....…….....…….... 21
7.2.2 EXTRACCIÓN DE RNA..... .....…….....…….... 21
7.3 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (CADN)..... 21
7.4 ENSAYOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR QPCR..... 22
7.5 SECUENCIACIÓN BISULFITO DE GENOMA COMPLETO (WGBS) EN PLATAFORMA DNBSEQ..... 22
7.6 PROCESAMIENTO BIOINFORMÁTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE REGIONES METILADAS.....…….....…….....…….... 23
7.7 REGIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS (RDM)..... 24
7.8 RECLUTAMIENTO DE PACIENTES 2015 Y SEGUIMIENTO 2023..... 25
7.9 ENSAYOS BASADOS EN DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN SENSIBLES A METILACIÓN..... 25
7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 26
8. RESULTADOS……... 28
8.1 INFECCIÓN VIRAL EN CULTIVOS CELULARES..... 28
8.2 TITULACIÓN VIRAL MEDIANTE EL MÉTODO DE FORMACIÓN DE PLACAS LÍTICAS CON VIRUS CHIKUNGUNYA……. 29
8.3 REALIZACIÓN DE ENSAYOS DE MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN EN CULTIVO PRIMARIO DE LINFOCITOS A DIFERENTES TIEMPOS …….. 29
8.4 ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE MECANISMOS EPIGENÉTICOS..... 30
8.5 BÚSQUEDA BIOINFORMÁTICA DE REGIONES METILADAS..... 33
8.6 PROPORCIÓN EN LA CITOSINA METILADA (MCG, MCHG Y MCHH)..... 39
8.7 DISTRIBUCIÓN DE NIVELES DE METILACIÓN……..……..... 40
8.8 PAISAJE GENÓMICO DE METILACIÓN..... ……....……..... 41
8.9 REGIONES DIFERENCIALMENTE METILADAS (RDM)..... 43
8.10 GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS (GDM) Y ANÁLISIS FUNCIONAL……. 46
8.11 PAISAJE DE METILACIÓN DIFERENCIAL EN ELEMENTOS REGULADORES……... 47
8.12 SELECCIÓN DE REGIONES CANDIDATAS... .....…….....

8.13 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE MUESTRAS..... 52
8.14 ANÁLISIS COMPARATIVO DE METILACIÓN EN CASOS Y CONTROLES..... 54
8.15 SEGUIMIENTO CLÍNICO A LARGO PLAZO..... 55
9. DISCUSIÓN…..... 58
10. CONCLUSIONES..... 79
11. BIBLIOGRAFÍA..... 82
12. ANEXOS.....
ANEXO A 96
ANEXO B 114
ANEXO C 123
ANEXO D 126
ANEXO E 136

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Grupos incluidos en el ensayo de metiloma y comparaciones realizadas	24
Tabla 2. Lista de genes analizados en el ensayo de expresión	32
Tabla 3. Resumen de datos de secuenciación para cada muestra	34
Tabla 4. Resumen de datos y control de calidad por muestra	35
Tabla 5: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_VCHIK_2	37
Tabla 6. Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_VCHIK_2	38
Tabla 7. Elementos de control de calidad para cada muestra	39
Tabla 8. Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_VCHIK_2	39
Tabla 9. Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_VCHIK_2.	40
Tabla 10. Identificación de RDM y análisis de grupo 1 vs grupo 2	47
Tabla 11. Identificación de RDM y análisis de grupo 3 vs grupo 4	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tipos de modificaciones epigenéticas. imagen adaptada de (Barrès & Zierath, 2016).	4
Figura 2. Ejemplo de modificación de histonas. Imagen tomada de www.cusabio.com/c-20829.html	5
Figura 3. Biogénesis de miRNA. figura tomada de (Winter et al. 2009).	7
Figura 4. Metilación de ADN. Imagen tomada de (Sweatt et al. 2013).	9
Figura 5. Estrategia general	20
Figura 6. Seguimiento microscópico de cultivos de células Vero post-infección con VCHIK	29
Figura 7. Placa de titulación viral de cultivos infectados con sueros de pacientes	30
Figura 8. Viabilidad celular de cultivo primario de linfocitos	31
Figura 9. Mapas de calor de procesos epigenéticos en cultivos celulares de sinoviocitos y cultivos primarios de linfocitos humanos infectados con VCHIK	33
Figura 10. Distribución de la profundidad de secuenciación	35
Figura 11. Distribución acumulada de la profundidad de secuenciaciónefectiva de la citosina	36
Figura 12. Proporción de citosinas metiladas que incluyen mCG, mCHG y mCHH.	41
Figura 13. Distribución del nivel de metilación de mC en cada contexto de secuencia.	42
Figura 14. Distribución de porcentajes de metilación por variable en diferentes regiones genómicas	44
Figura 15. Mapas de calor que representan las RDM identificadas en cada unode los grupos analizados.	46
Figura 16. Dotplot de las 15 vías más significativas enriquecidas en genes diferencialmente metilados para el grupo1 vs grupo2.	48
Figura 17. Dotplot de las vías de señalización enriquecidas en genes diferencialmente metilados para el grupo3 vs grupo4.	49
Figura 18. Paisaje de metilación diferencial en regiones reguladorasentre grupo 1 y grupo 2.	51
Figura 19. Paisaje de metilación diferencial en regiones reguladoras entre grupo 3 y grupo 4.	52
Figura 20. Comparativa de elementos reguladores entre Sinoviocitos y Linfocitos.	53
Figura 21.El flujo de selección de regiones candidatas diferencialmente metiladas (RDM)	54
Figura 22. Manifestaciones clínicas de los casos. Tapachula Chiapas, México, mar-jun 2015.	56
Figura 23. Comparación de los niveles de metilación entre casos y controles para el primer bloque de marcadores.	57
Figura 24: Comparación de los niveles de metilación entre casos y controles para el segundo bloque de marcadores.	58

Figura 25. Heatmap combinado que integra parámetros de biometría hemática, química sanguínea y síntomas clínicos en pacientes de la cohorte de seguimiento. 59
Figura 26. Comparación de los niveles de metilación de los marcadores GH0XJ068496 y GH22J027789 entre grupos de casos, seguimiento y controles. 60

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
VCHIK	Virus Chikungunya
CO_2	Dióxido de carbono
CTL	Control
Ct	Ciclo umbral (Threshold cycle)
CTCF	CCCTC- Factor de transcripción
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DENV	virus del Dengue
DNMT	metiltransferasa de DNA
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EBV	Virus de Epstein-Barr
FBS	Suero bovino fetal
GO	Gene Ontology
HFLS	Celulas de Sinoviocitos similares a fibroblastos humanos
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
miRNAs	Micro RNAs
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
mL	Mililitro
ng	Nanogramos
ncRNA	RNA no codificante
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a retrotranscripción cuantitativa
RDM	Regiones Diferencialmente Metiladas
GDM	Genes Diferencialmente Metilados
CpG	Citosina - fosfato - Guanina
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA
siRNA	RNA de interferencia
SAM	S-adenosilmetionina
SINO	Sinoviocitos

tRNA	RNA de transferencia
TAE	Tris-Acetato-EDTA
VIH	Virus de inmunodeficiencia Humana
°C	Grados celcius
µl	microlito

Resumen

Los arbovirus, como el virus Chikungunya (VCHIK), representan un importante problema de salud pública debido a su capacidad para provocar artralgias persistentes que pueden prolongarse durante meses o incluso años después de la infección aguda. En este contexto, la epigenética, particularmente la metilación del ADN, constituye una herramienta prometedora para comprender los mecanismos moleculares involucrados en la interacción virus-huésped y en la persistencia de los síntomas. Por ello, el objetivo de este estudio fue investigar la presencia de firmas epigenéticas asociadas con la infección por VCHIK y su posible relación con la evolución clínica de los pacientes.

La estrategia experimental comprendió varias etapas. Inicialmente, se infectaron cultivos primarios de sinoviocitos y linfocitos humanos con VCHIK para evaluar la expresión de genes relacionados con mecanismos epigenéticos mediante PCR cuantitativa (qPCR) y analizar el metiloma mediante secuenciación del genoma completo tratado con bisulfito (WGBS). Posteriormente, utilizando herramientas bioinformáticas como Bismark y análisis de enriquecimiento funcional, se identificaron regiones diferencialmente metiladas (RDM) y genes asociados. Paralelamente, se estudió una cohorte de 193 pacientes con infección confirmada durante el brote ocurrido en Tapachula, Chiapas, en 2015, de los cuales 27 participaron en un seguimiento clínico de ocho años para evaluar la persistencia de síntomas y validar regiones candidatas mediante PCR sensible a metilación (MS-qPCR). Los resultados mostraron sobreexpresión de genes de metilación de novo (DNMT3B, DNMT3L, familia MBD). Se hallaron 1,457 RDM en sinoviocitos y 1,016 en linfocitos, con hipometilación predominante en elementos no codificantes (5,170 circRNA). Las RDM se enriquecieron en vías de Rho GTPasas (CDC42, RAC2). Clínicamente, la fase aguda (fiebre 99.5%, poliartralgias 52.9%) presentó hipermetilación en las regiones GH22J027789 y GH0XJ068496. Sin embargo, tras ocho años, los niveles de metilación se normalizaron, coincidiendo con la resolución de síntomas en 26/27 pacientes. En conclusión, la infección por VCHIK induce una reprogramación específica y transitoria del metiloma del hospedador, caracterizada por alteraciones en la metilación del ADN y en vías celulares relacionadas con la respuesta a la infección viral. No obstante, los cambios observados en los loci analizados fueron reversibles a largo plazo y se asociaron con la resolución clínica de la enfermedad. Estos hallazgos amplían el conocimiento sobre la patogenia del chikungunya, aportan evidencia sobre la participación de mecanismos epigenéticos en la respuesta al VCHIK y proporcionan una base para el desarrollo futuro de biomarcadores con valor pronóstico y potencial aplicación clínica.

Abstract

Arboviruses, such as Chikungunya virus (VCHIK), represent a major public health problem due to their ability to cause persistent arthralgia that can last for months or even years after acute infection. In this context, epigenetics, particularly DNA methylation, constitutes a promising tool to understand the molecular mechanisms involved in virus-host interaction and symptom persistence. Therefore, the aim of this study was to investigate the presence of epigenetic signatures associated with VCHIK infection and their possible relationship with the clinical outcome of patients.

The experimental strategy comprised several stages. Initially, primary cultures of human synoviocytes and lymphocytes were infected with VCHIK to evaluate the expression of genes related to epigenetic mechanisms by quantitative PCR (qPCR) and to analyze the methylome by whole-genome bisulfite sequencing (WGBS). Subsequently, using bioinformatics tools such as Bismark and functional enrichment analysis, differentially methylated regions (DMRs) and associated genes were identified. In parallel, a cohort of 193 patients with confirmed infection during the 2015 outbreak in Tapachula, Chiapas, was studied, of whom 27 participated in an eight-year clinical follow-up to assess symptom persistence and validate candidate regions by methylation-sensitive PCR (MS-qPCR). The results showed overexpression of de novo methylation genes (DNMT3B, DNMT3L, MBD family). A total of 1,457 DMRs were found in synoviocytes and 1,016 in lymphocytes, with predominant hypomethylation in non-coding elements (5,170 circRNAs). DMRs were enriched in Rho GTPase pathways (CDC42, RAC2). Clinically, the acute phase (fever 99.5%, polyarthralgia 52.9%) presented hypermethylation in the GH22J027789 and GH0XJ068496 regions. However, after eight years, methylation levels normalized, coinciding with symptom resolution in 26/27 patients. In conclusion, VCHIK infection induces a specific and transient reprogramming of the host methylome, characterized by alterations in DNA methylation and cellular pathways related to the response to viral infection. Notably, the changes observed in the analyzed loci were reversible in the long term and were associated with clinical resolution of the disease. These findings expand knowledge about chikungunya pathogenesis, provide evidence on the involvement of epigenetic mechanisms in the response to VCHIK, and lay the foundation for the future development of biomarkers with prognostic value and potential clinical application.

1. INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son transmitidos a los humanos por artrópodos vectores. Se agrupan en cinco familias: Flaviviridae (Virus Dengue y Zika), Togaviridae (Virus Chikungunya) y Bunyaviridae, Reoviridae y Rhabdoviridae, que se informan con menos frecuencia (Gould et al. 2017).

La distribución de los arbovirus a nivel global está relacionada con las áreas habitadas por sus vectores y la mayoría de ellos ocurre en regiones tropicales y subtropicales (Mayer et al. 2017). Sin embargo, las infecciones de los vectores artrópodos por estos virus no parecen afectar su estado físico y, por lo general, no son patógenas y duran toda la vida (Keirsebelik et al. 2024). Mientras tanto en los huéspedes humanos las infecciones con arbovirus, particularmente las familias Flaviviridae y Togaviridae, son generalmente patógenas, a menudo agudas y causan viremia (Meltzer 2012). Esta combinación contribuye en gran medida a su exitosa propagación viral y persistencia, lo que representa una considerable carga médica y económica para los sistemas de salud de las naciones endémicas (Mayer et al. 2017).

Generalmente los arbovirus carecen de polimerasas con actividad de corrección de errores, por consiguiente experimentan una evolución genética constante y, por lo tanto, exhiben frecuencias de mutación significativas, En consecuencia, suele adaptarse rápido a su entorno, por acumulación mutacional a lo largo de su genoma; así, los arbovirus como muchos otros virus de RNA utilizan características únicas de ARN-dependiente de ARN polimerasa logrando una rápida adaptación, dando como resultado una presión evolutiva en las especies (Jupille et al. 2014).

Por otra parte, dentro del hospedador humano, el virus enfrenta una selección purificadora que elimina mutaciones deletéreas, lo que exige un equilibrio en su aptitud física para garantizar una replicación eficiente. Para lograrlo, despliega mecanismos de interacción como la evasión de la respuesta inmune, la modulación de la apoptosis y el uso diferencial de receptores, lo que le permite adaptarse tanto a hospedadores humanos como a vectores artrópodos, optimizando así su transmisión y persistencia (Coffey et al. 2008). Por consiguiente, estímulos ambientales, como

un trauma o infección, siempre se han asumido, pero en gran parte inexplorado hasta hace poco debido a la falta de disponibilidad de enfoques experimentales. En este sentido, la identificación de tales interacciones puede proporcionar información sobre mecanismos de interacción de las infecciones virales con su huésped.

Un enfoque prometedor en este campo es la epigenética, que representa un cambio de paradigma al considerar los estímulos ambientales que modifican la regulación génica sin alterar necesariamente la secuencia del ADN del huésped. Por esta razón, el presente estudio se enfoca en explorar las modificaciones epigenéticas inducidas por la infección con arbovirus, con el fin de comprender mejor los mecanismos de interacción virus-huésped y su posible impacto en la progresión de la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1 Epigenética

El término epigenética, significa etimológicamente "además de la genética" (Gallou-Kabani et al. 2007), fue introducido por primera vez por Waddington en la década de 1940 para describir la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan vida al fenotipo (Waddington 2012). Esta definición inicial denota las vías moleculares que regulan la expresión de un genotipo en un fenotipo particular (Dupont et al. 2009). El significado de la epigenética ha evolucionado a través del tiempo hasta la definición actual más aceptada: "el estudio de los cambios en la función génica que son mitóticos y/o meioticamente heredable y que no implican un cambio en la secuencia de ADN" (Wu y Morris 2001).

El ADN está empaquetado en la estructura intracelular llamada cromatina, la cromatina se puede diferenciar en heterocromatina, que es altamente condensada y transcripcionalmente inerte, y eucromatina, que es menos compactada y más accesible a los factores de transcripción y a la maquinaria (Putiri y Robertson 2011). La estabilidad de estos estados de cromatina es regulada por firmas epigenéticas (Alabert y Groth 2012), evitando la recombinación de secuencias repetitivas y la transcripción de elementos transponibles (Peng y Karpen 2008), evitando el daño del ADN y definiendo la organización cromosómica en elementos estructurales, como el centrómero o los telómeros (Putiri y Robertson 2011).

2.2 Tipos de modificaciones epigenéticas

Los procesos epigenéticos, junto con otros eventos reguladores de la transcripción, están implicados en la regulación de la actividad y expresión génica durante el desarrollo y la diferenciación, o en respuesta a estímulos ambientales (Martínez et al. 2014). Los tres mecanismos epigenéticos reconocidos principales que regulan la expresión génica son modificaciones covalentes de histonas, RNA no codificante y metilación de ADN (Jiménez-Chillarón et al. 2012) (Figura 1).

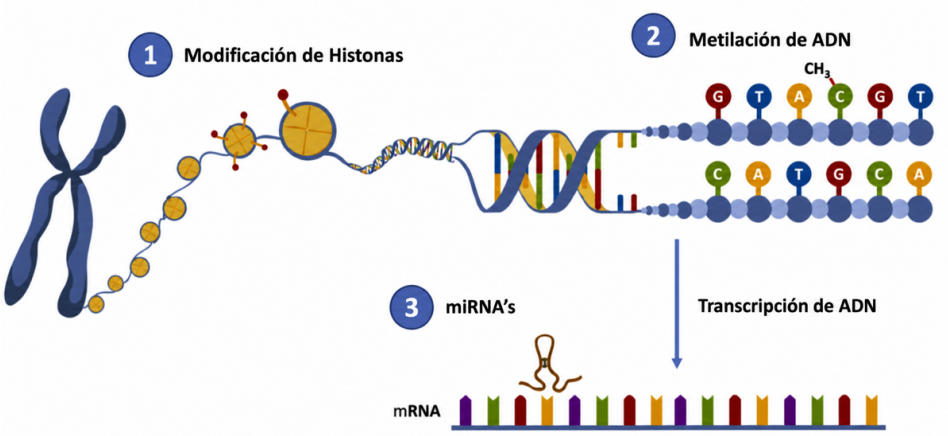


Figura 1. Tipos de modificaciones epigenéticas. Imagen adaptada de (Barrès & Zierath, 2016).

2.2.1 Modificación de histonas

En la célula eucariota, el ADN genómico se empaqueta firmemente en una matriz de nucleosomas, cada uno de los cuales está formado por un octámero de histona (dos heterodímeros de H2A-H2B y un tetrámero de dos homo-dímeros de H3-H4) envuelto por 147 pb de ADN y separado por ADN enlazador, siendo este complejo la unidad básica de la cromatina (Kim et al. 2009; Sharma et al. 2010).

Las histonas están sujetas a modificaciones postraduccionales en su cola N-terminal, que incluyen acetilación, biotinilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación, ribosilación, isomerización, citrulinación, butirilación, propionilación y glicosilación, aunque las más descritas en humanos son la acetilación, biotinilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación (Sadakierska-Chudy y Filip 2015) (Figura 2). El acceso físico al ADN es una propiedad altamente dinámica de la cromatina. Por consiguiente, modificaciones a las histonas anteriormente mencionadas pueden regular la expresión génica alterando el ensamblaje y la compactación de la cromatina, cambiando la accesibilidad a sitios de unión de potenciadores, promotores, sitios de unión para los factores de transcripción y otras proteínas efectoras (Farooqi et al. 2019). Las modificaciones de las histonas son reversibles y reguladas por la acción de varias enzimas, como las acetiltransferasas de histona, las desacetilasas de histona, histonas metiltransferasas, histonas desmetilasas, fosfatasas, quinasas, entre otras, dando un equilibrio a este proceso

(Kanwal y Gupta 2012). Por lo tanto, se ha demostrado que la expresión de genes inflamatorios, la reparación del ADN y la proliferación celular están controlados por el grado de acetilación de las proteínas histonas y no histonas producidas por esta histona acetiltransferasas e histona desacetilasas (Adcock 2007; McKinsey 2011).

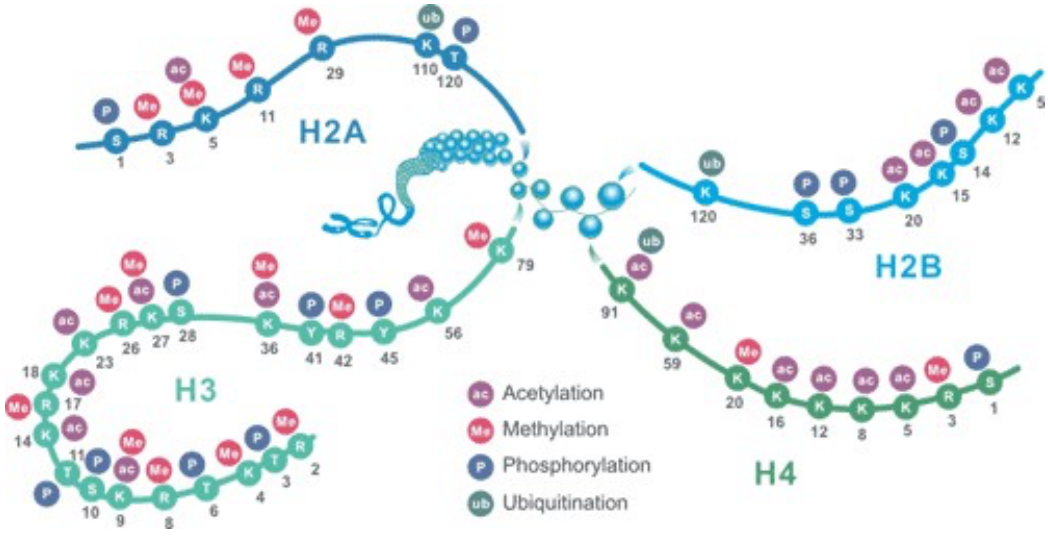


Figura 2. Ejemplo de modificación de histonas. Imagen tomada de www.cusabio.com/c-20829.html

2.2.2 RNA no codificante

Los ARN no codificantes (ncRNA) son un grupo de ARN que no se traducen en proteínas funcionales (Wei et al. 2017). Se pueden clasificar en ncRNA largos, que contienen >200 nucleótidos, y ncRNA cortos, formados por 20-300 nucleótidos (Lillycrop y Burdge 2014). ncRNA largos se han descrito como guías moleculares, andamios, señuelos y moduladores alostéricos en la regulación de la transcripción y la cromatina (Triantaphyllopoulos et al. 2016). Por otro lado, los ncRNA cortos, que generalmente están relacionados con el silenciamiento génico por represión transcripcional o degradación del ADN (Lillycrop y Burdge 2014), incluyen microRNA (miRNAs), pequeños RNA interferentes (siRNA), ARN que interactúan con Piwi y pequeños ARN nucleares (Delpu et al. 2016; Wei et al. 2017).

Los ncRNAs más estudiados son los miRNAs. Son cadenas de RNAs procesadas de aproximadamente 18-22 nucleótidos, que se han sometido a una serie de pasos de maduración de los miRNAs primarios (Dahmer et al. 2016). Algunos miRNAs se encuentran dentro de los intrones de los genes que codifican las proteínas y se transcriben a lo largo de ellos. con la transcripción primaria, mientras que otras se transcriben de su propio gen (Tammen et al. 2013; Wong et al. 2020). Después de la transcripción, el miRNA primario es procesado por la ARNasa Drosha en el núcleo, generando el miRNA precursor, que se exporta al citoplasma. Posteriormente, el precursor de miRNA es escindido por Dicer, produciendo el miRNA maduro (Han et al. 2006) (Figura 3). El miRNA maduro puede regular la traducción de ARNm formando parte del Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC) y emparejándose con regiones 3' no traducidas del mensajero objetivo, lo que resulta en una inhibición traduccional si hay complementariedad parcial o degradación si la complementariedad es completa (Tammen et al. 2013). Por lo tanto, los miRNAs afectan sus genes diana a nivel postranscripcional, regulando así muchos procesos biológicos (De Rosa et al. 2018).

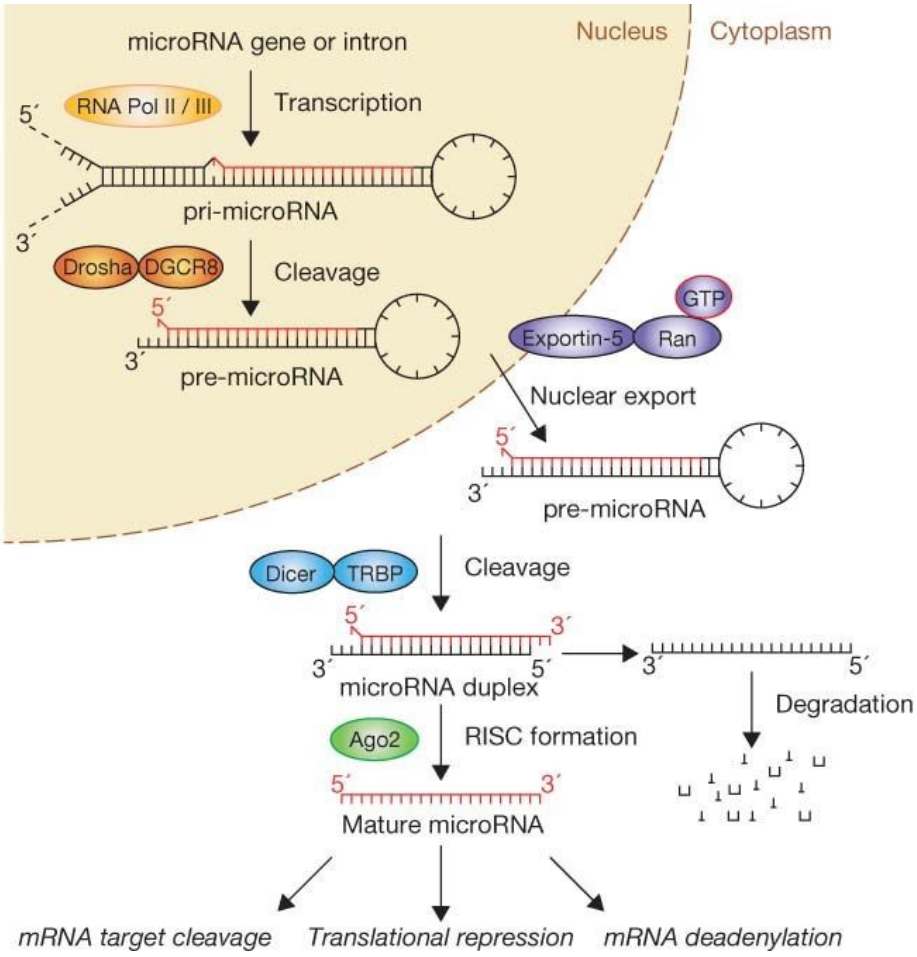


Figura 3. Biogénesis de miRNA (Figura tomada de Winter et al. 2009).

2.2.3 Metilación de ADN

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a la molécula de ADN, ya sea en bases de nucleótidos de adenina o citosina (Iyer et al. 2016). En los mamíferos, la metilación del ADN más común ocurre en los sitios CpG, donde se incorpora un grupo metilo en el quinto carbono de una citosina. adyacente a una guanina, dando como resultado la 5-metilcitosina (Triantaphyllopoulos et al. 2016) (Figura 4).

La metilación del ADN puede ocurrir en diferentes regiones del genoma, como secuencias repetitivas, cuerpo genético, islas CpG relacionadas con el promotor y

costas de islas CpG. Las islas CpG son regiones de aproximadamente 1000 pb con una concentración elevada en bases CG, ubicadas principalmente en los promotores de genes (70% del total de islas CpG) y, en general, con baja metilación del ADN (Deaton y Bird 2011)). Las costas de las islas CpG están ubicadas hasta 2 kb aguas arriba de Isla CpG. La mayoría de los CpG metilados se encuentran dentro de los cuerpos génicos (Portela y Esteller 2010).

La metilación del ADN puede influir en la transcripción génica de tres maneras diferentes:

a) afectando la unión de factores de reconocimiento específicos de la metilación a promotores o cuerpos genéticos; b) modificando la afinidad de un factor de transcripción a un promotor génico; c) alterando la estructura de la cromatina y la accesibilidad espacial de los factores de transcripción u otras proteínas de unión al ADN (Zhang y Pradhan 2014). En general, las secuencias de ADN metiladas están relacionadas con el silenciamiento génico, mientras que los CpG no metilados están asociados con la actividad transcripcional (Burdge y Lillycrop 2010). Sin embargo, hay evidencia de que la metilación del ADN también puede correlacionarse positivamente con la expresión génica (Portela y Esteller 2010).

Si no se mantienen los patrones de metilación adecuados se producen cambios en la transcripción génica que pueden influir en la aparición de enfermedades, incluido el cáncer; enfermedades neurológicas, del neurodesarrollo, neurodegenerativas, autoinmunes, obesidad, entre otros (Barres y Zierath 2011; Tammen et al. 2013; Zhang y Pradhan 2014). E incluso, ayudar a la persistencia de síntomas en algunas enfermedades virales o microbianas (Paschos y Allday 2010).

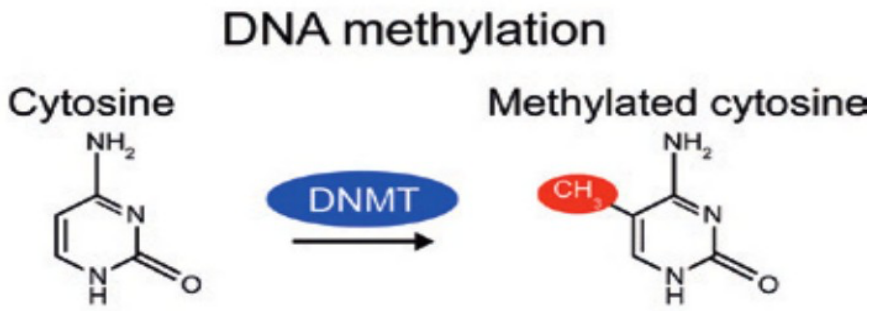


Figura 4. Metilación del ADN (Imagen tomada de Sweatt et al. 2013).

2.3 Proceso de metilación de ADN

La metilación del ADN en los sitios CpG está catalizada por ADN metiltransferasa (*DNMT*), que transfieren un grupo metilo de SAM a la citosina (Kulis y Esteller 2010). En mamíferos, se han informado cinco miembros de *DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L*, aunque solo están presentes *DNMT1, DNMT3a y DNMT3b* actividad de la metiltransferasa (Portela y Esteller 2010).

DNMT1 es responsable del mantenimiento y reproducción de los patrones de metilación existentes durante la replicación del ADN, desde los sitios CpG hemimetilados (cuando un CpG se metila en una cadena, pero no en la otra) hasta las nuevas cadenas de ADN generadas (Kim et al. 2009). Esta enzima, que es el DNMT más abundante en la célula, exhibe una preferencia de 30-40 veces por los sustratos hemimetilados, pero también presenta actividad de DNMT de novo (Portela y Esteller 2010). *DNMT1* se expresa de manera constrictiva en las células en división y se transcribe principalmente durante la fase S del ciclo celular (Smith y Meissner 2013).

DNMT3a y *DNMT3b* son metiltransferasas de novo involucradas en el establecimiento de patrones de metilación del ADN durante el desarrollo de la línea germinal y la embriogénesis (Kanwal y Gupta 2012). La expresión de estas metiltransferasas aumenta en las células madre embrionarias, mientras que se regula negativamente en las células diferenciadas (Portela y Esteller 2010). Sin embargo, también son importantes para la herencia estable y la remodelación activa de los

patrones de metilación del ADN en células diferenciadas (Kadayifci et al. 2018). *DNMT3a* parece ser más importante en el desarrollo tardío o después del nacimiento, mientras que *DNMT3b* puede estar implicado en etapas tempranas del desarrollo y en regiones particulares del genoma (Kulis y Esteller 2010).

DNMT3L estimula la acción de *DNMT3a* y *DNMT3b* al interactuar y colocalizarse con ellas en el núcleo con ellos en el núcleo (Portela y Esteller 2010). En el caso de *DNMT2*, funciona como una tRNA transferasa en lugar de una ADN metiltransferasa (Kadayifci et al. 2018).

Todos los DNMT usan SAM (S-adenosilmetionina) como sustrato (Mann 2017), dependiendo de los donantes de grupos metilo y cofactores de los alimentos ingeridos, como folato, colina, betaína o metionina (Chmurzynska, 2010). Estas sustancias proporcionan el grupo metilo necesario para metilar homocisteína y formar metionina, que será más tarde transformado en SAM. Alternativamente, cuando hay un exceso de metionina, la homocisteína se puede convertir en cisteína (Finkelstein 1998).

2.4 Cambios epigenéticos en la interacción huésped-patógeno

En los últimos años, el campo de la epigenética ha florecido; a pesar de esto, el papel de la epigenética en la conformación de las interacciones huésped-patógeno ha recibido relativamente poca atención. Sin embargo, se ha ido acumulando evidencia sólida que respalda la implicación de la epigenética en la defensa del huésped contra los patógenos en la interacción biológica, como la metilación del ADN, la modificación de histonas y la actividad de los RNA no codificantes, lo cual podría ser un fenómeno generalizado (Morandini et al. 2016; Paschos y Allday 2010)

Con respecto a las modificaciones epigenéticas debidas a infecciones por virus, existen informes que afirman que los virus juegan un papel importante en la metilación del ADN. Esta desregulación afecta vías celulares con el fin de optimizar su propia transcripción o replicación, así como de evadir la respuesta inmune innata

del huésped (Balakrishnan y Milavetz 2017; Milavetz y Balakrishnan 2015) Estos mecanismos no solo favorecen la persistencia viral, sino que también pueden contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas a largo plazo.

Con respecto al sistema inmune innato después del reconocimiento de los patógenos da como resultado la expresión de una serie de genes para producir citocinas, quimiocinas y vías de señalización celular, así como factores de transcripción, que en su mayoría están bien descritos. Hoy en día se sabe qué mecanismos epigenéticos son críticos para ajustar la expresión génica y esta regulación está ampliamente involucrada en la programación de estados de cromatina y patrones de expresión tanto en el huésped como en el patógeno; por un lado, equilibra la homeostasis inmune para las respuestas inmunes innatas del huésped contra el patógeno, y por el otro lado, media la evasión inmune del patógeno (Zhang y Cao 2019).

Para poder sobrevivir y replicarse, los patógenos han desarrollado una variedad de estrategias epigenéticas, como modificar directamente las proteínas del huésped y la cromatina mediante productos génicos específicos de patógenos, para atenuar las vías de detección y modular la expresión de activadores y represores en la inmunidad innata. Sin embargo, los huéspedes pueden anular los cambios inducidos por patógenos en sus epigenomas para mantener una inmunidad anti patógena efectiva. Además, la desregulación epigenética inducida por infección crónica, especialmente por virus oncogénicos, es un mecanismo utilizado por algunos patógenos para persistir en el huésped. (Zhang y Cao 2019).

2.5 Epigenética en infección por virus

Los virus han evolucionado con sus anfitriones, que incluyen todas las especies vivas. Este proceso ha contribuido al desarrollo de sistemas inmunes altamente especializados en los huéspedes. Sin embargo, los virus también han desarrollado formas de regular y evadir la defensa inmune del huésped. Además de los mecanismos mutacionales que emplean los virus para imitar el genoma del huésped y experimentar latencia para evadir el reconocimiento del patógeno por parte del huésped, también han desarrollado mecanismos de reprogramación epigenética

mediante los cuales pueden inactivar las respuestas inmunes del huésped frente a sus antígenos y completar sus ciclos de vida. La regulación epigenética de la expresión génica ocurre de manera activa en el huésped y está involucrada en la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular (Adhya y Basu 2010). La desregulación de la cromatina del huésped, ya sea por cambios en los modificadores de la cromatina del huésped inducidos por el virus o por reguladores epigenéticos codificados viralmente, se ha descrito principalmente durante las infecciones con virus asociados a neoplasias. Los virus han desarrollado diferentes estrategias epigenéticas para modular la respuesta inmune y favorecer su replicación (Zhang y Cao 2019).

Algunos ejemplos que demuestran los diferentes mecanismos que usan los virus para las modificaciones epigenéticas, son los trabajos realizados por Tsai et al. En el 2006 e Hino et al. Enel 2009 donde demuestran que la proteína de membrana latente codificada por el virus Epstein-Barr 1 (LMP1) y LMP2A activando a JNK-AP-1 y STAT3, respectivamente, para regular al alza la expresión del ADN del huésped activando la transcripción de DNMT1 (Hino et al. 2009; Tsai et al. 2006).

Otro trabajo realizado por Periyasamy et al. En el 2018 demuestra el aumento de metilación de ADN por la infección de VIH, en donde indica la regulación negativa epigenética de miR-124, la cual modula los niveles de *STAT3*, lo que conduce a la activación microglial (Periyasamy et al. 2018). De igual manera, el aumento de metilación reduce la expresión del gen *FOXP3* en las células T reguladoras (Tregs), las cuales desempeñan un papel importante en las infecciones que modulan las respuestas inmunitarias del huésped y evitan la inmunidad exagerada, por tal motivo, pierde la capacidad supresora y las alteraciones en el patrón de secreción de citocinas (Pion et al. 2013). También se puede llevar desmetilación específica de genes en elementos reguladores y aumentar la expresión de la proteína 1 de muerte celular programada por el receptor inhibidor (PD1) en las células T CD8 +, incluso después de una terapia antiviral efectiva (Youngblood et al. 2013).

Otro ejemplo de virus estudiado es el caso del Epstein-Barr (EBV) el cual desencadena la hipermetilación del ADN a través de la regulación negativa del componente de desmetilación TET2, sugiriendo que funciona como un factor de

resistencia contra la metilación del ADN en las células epiteliales gástricas y la represión de TET2 contribuye a la adquisición de la metilación del ADN durante la infección por EBV (Namba-Fukuyo et al. 2016).

2.6 Epigenética en arbovirus

Si bien existe una gran cantidad de evidencia que sugiere que los factores epigenéticos juegan un papel crítico en la regulación de las infecciones por virus, en muchos casos no se han aclarado los mecanismos detallados. Aunque varios factores limitantes contribuyen a nuestra relativa falta de comprensión de las complejidades de la regulación epigenética viral, la complejidad inherente de la regulación epigenética probablemente constituye el principal obstáculo (de Aguiar et al. 2019); a pesar de esto, el papel de la epigenética en la conformación de las interacciones huésped-patógeno ha recibido relativamente poca atención. Sin embargo, existe evidencia sólida que respalda la implicación de la epigenética en la defensa del huésped contra los patógenos en la interacción biológica, como la metilación del ADN, la modificación de histonas y la actividad de los ARN no codificantes (Morandini et al. 2016; Paschos y Allday 2010)

Uno de los principales problemas de salud pública en el mundo son las infecciones por arbovirus. En cuanto a los arbovirus que infectan a humanos, todos poseen genomas de ARN de diferentes longitudes y polaridades con genomas segmentados y no segmentados (Vasilakis et al. 2016). En particular, las familias Flaviviridae y Togaviridae son generalmente patógenas, a menudo agudas y causan viremia a nivel de la población, lo que representa una carga médica y económica considerable para los sistemas de salud de las regiones endémicas (Mayer et al. 2017)

Si bien, existen una gran cantidad de estudios epigenéticos en infecciones arbovirales, la gran mayoría se centra en el virus del Dengue (DENV); la literatura disponible para otros arbovirus suele ser escasa. En general, los estudios investigaron una serie de modificaciones epigenéticas, en particular miRNAs/siRNAs, supresión de iRNA, modificaciones de los reguladores de iRNA y metilación del ADN (de

Aguiar et al. 2019).

En el caso del VCHIK, solo se han reportado dos estudios *in vitro* Uno utilizó herramientas de alto rendimiento para detectar posibles marcadores de diagnóstico u objetivos terapéuticos (Saxena et al. 2013), mientras que el otro investigó explícitamente miR-146a (Selvamani et al. 2014).

En el primer estudio, utilizan la tecnología de microarrays y el método de PCR cuantitativa para establecer la firma completa de miRNA, snoRNA y mRNA de la respuesta del huésped a la infección por VCHIK en tres líneas de células de riñón embrionario humano HEK293T, Vero-76 y células de fibroblastos dérmicos humanos primarios. El perfil de expresión de miRNA reveló la regulación de 152 miRNA después de la infección por VCHIK. Los datos de microarrays validados por RT-qPCR revelaron la inducción de miR-744, miR-638, miR-503. Estos autores también investigaron cambios en la expresión de RNA nucleares pequeños (snoRNA), un mecanismo epigenético que guía las modificaciones químicas de otros RNA, principalmente RNA ribosómico. Los resultados mostraron que 48 snoRNAs estaban regulados al alza. De estos, 16 eran del tipo C/D, que se sabe que están asociados a la acetilación de RNA ribosómico (Saxena et al. 2013).

El segundo estudio, centrado en el papel de miR-146a en la patogénesis del VCHIK en células sinoviales humanas y las manifestaciones inflamatorias subyacentes, se realizó la infección por VCHIK en fibroblastos sinoviales humanos primarios. La infección por VCHIK se asoció con un aumento de la expresión celular de miR-146a y la posterior disminución de la expresión génica de TRAF6, IRAK1 e IRAK, así como un aumento de la replicación viral. Por lo tanto, concluyeron que VCHIK redujo la respuesta inmune antiviral en fibroblastos humanos a través de una sobreexpresión de miR-146a (Selvamani et al. 2014).

2.7 Aspectos clínicos del virus chikungunya

El VCHIK es un arbovirus transmitido a los humanos por los mosquitos *Aedes*. El virus se describió por primera vez en 1952 durante un brote febril en la región de

Makonde, al sur de Tanzania (Robinson 1955). La palabra chikungunya proviene del idioma bantú del grupo étnico Makonde de Tanzania y Mozambique y se refiere a la posición curva del paciente debido a un dolor articular debilitante. Desde su descripción, en 1952, VCHIK ha causado millones de infecciones humanas en África, las islas del Océano Índico, Asia, Europa y las Américas (Rodrigues Faria et al. 2016).

La infección aguda por VCHIK es sintomática en aproximadamente el 95% de los casos y se caracteriza por fiebre abrupta (> 39 °C), con poliartralgia o artritis severas. En la mayoría de los casos, la enfermedad es autolimitada. Exceptuando la artralgia, la recuperación suele ocurrir entre 7 y 10 días desde el inicio de los síntomas. La artralgia persistente puede prolongarse de 6 meses hasta 5 años y se caracteriza por recaídas episódicas y períodos de recuperación del dolor articular. Esto puede ocurrir en >50% de los casos. El tiempo total de recuperación aún es incierto y algunas personas infectadas siguen sintomáticas entre seis y ocho años después de la infección inicial, lo que puede resultar altamente incapacitante (Feldstein et al. 2017; Murillo-Zamora et al. 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por arbovirus representan una carga significativa para los sistemas de salud y la productividad laboral, especialmente en los países tropicales y en desarrollo. El potencial no explotado de los marcadores epigenéticos puede constituir un elemento clave para reforzar una comprensión más profunda de la patogénesis y los mecanismos de respuesta compartidos entre las especies de arbovirus que causan enfermedades, lo que puede aportar información crítica sobre la dinámica de las epidemias y los brotes recurrentes. Por esta razón, la búsqueda de perfiles epigenéticos busca identificar biomarcadores para la detección, pronóstico y predicción de la respuesta, y definir objetivos para tratamientos personalizados, subrayando su potencial en la medicina traslacional.

4. HIPÓTESIS

La infección por el virus Chikungunya genera un perfil de metilación específico en genes reguladores de la respuesta inmune, el cual se asocia con la severidad y persistencia de la artralgia en pacientes crónicos, sugiriendo un papel de la epigenética en la persistencia de los síntomas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Investigar la presencia de firmas epigenéticas en pacientes con artralgia persistente derivada de la infección por el virus Chikungunya

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el estado de metilación en cultivos celulares humanos infectados con el virus Chikungunya

2. Analizar bioinformáticamente regiones metiladas y su participación en procesos inflamatorios reguladores del sistema inmune.

3. Caracterización clínica y de laboratorio de la cohorte de pacientes confirmados en fase aguda para VCHIK.

4. Seleccionar regiones metiladas candidatas de los grupos iniciales y control.

6. ESTRATEGIA GENERAL

La estrategia experimental propuesta comprende cuatro fases secuenciales. En primer lugar, se cultivarán células humanas infectadas con el VCHIK a partir de las cuales se realiza el análisis del metiloma y de la expresión génica. Posteriormente, a través de herramientas bioinformáticas, se identificarán regiones genómicas diferencialmente metiladas implicadas en la regulación de la respuesta inmune, con el fin de priorizar candidatos epigenéticos de interés. En una tercera etapa, se seleccionará una cohorte de individuos previamente infectados con VCHIK, a quienes se les dará seguimiento clínico varios años después de la infección aguda, con el objetivo de evaluar la persistencia de alteraciones moleculares. Finalmente, en esta misma cohorte, se validarán las regiones candidatas mediante ensayos específicos de metilación, como la PCR cuantitativa específica de metilación con enzimas de restricción (MS-qPCR), lo que permitirá establecer una firma epigenética asociada a la infección por VCHIK y sus posibles consecuencias a largo plazo la cual se encuentra resumida en la Fig 5.

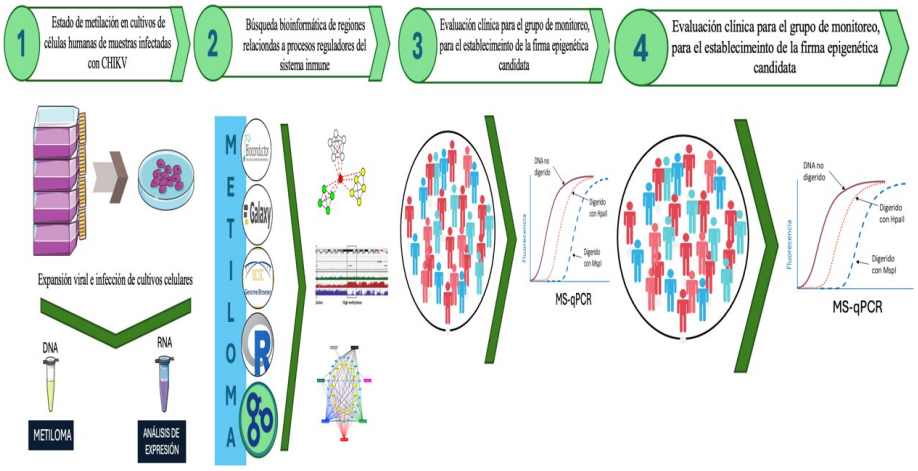


Figura 5. Estrategia general

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Lugar de realización

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los cultivos de sinoviocitos similares a fibroblastos humanos (HFLS; Cell Applications, Inc., catálogo #408K-05a) y los cultivos primarios de linfocitos se establecieron en una campana de flujo laminar BSL-2 (LABCON). Para ello, se empleó medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) y medio RPMI, ambos suplementados con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS; HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM de L-glutamina (Life Technologies, CA, EE.UU.) y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (Gibco, Rockville, MD). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2. El recuento celular se realizó mediante exclusión con azul tripano al 0,4% (GIBCO-BRL, Grand Island, N.Y.) en cámara de Neubauer.

Por otra parte, el VCHIK fue aislado a partir de sueros de pacientes positivos y posteriormente expandido en cultivos de células Vero-76 durante 72 h. El sobrenadante del cultivo se recuperó y se caracterizó mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real. Las alícuotas virales obtenidas se almacenaron a -80 °C hasta su uso en los experimentos posteriores.

7.2 Infección viral en cultivos celulares

Las células HFLS y los cultivos primarios de linfocitos se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta alcanzar aproximadamente un 80 % de confluencia. En ese momento, las células se infectaron con el VCHIK a diferentes multiplicidades de infección (MOI de 1, 10 y 100) durante 2 h. Transcurrido el período de adsorción, se añadió medio fresco suplementado con suero y las células se incubaron en condiciones estándar (37 °C, 5 % CO_2). El medio de cultivo se renovó diariamente para evitar la privación de nutrientes. Tanto las células infectadas como los sobrenadantes de cultivo se recolectaron cada 24 h. En cada punto temporal, la cuantificación viral se realizó mediante RT-PCR en tiempo real, y posteriormente se

extrajo ADN y ARN tanto de las células como de los sobrenadantes. Todos los experimentos se realizaron por triplicado de forma independiente.

7.2.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó a partir de células en monocapa utilizando el kit de purificación RNA/ADN (DaAnGene, Cat. #DA0591), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este procedimiento permitió obtener ADN genómico de alta calidad a partir de las células infectadas y no infectadas. Se empleó etanol (Karal, Cat. #2003) en los pasos de lavado. La concentración y pureza del ADN se determinaron mediante espectrofotometría UV-Visible con un instrumento NanoDrop (NanoDrop Technologies). Las muestras de ADN se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

7.2.2 Extracción de RNA total

El ARN total se aisló a partir de células en monocapa y de sobrenadantes de cultivo viral utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen Corp, Cat. #15,596–026), de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Brevemente, las células fueron lisadas directamente en la placa de cultivo con TRIzol, mientras que los sobrenadantes virales se mezclaron con el reactivo en una proporción adecuada. Para la separación de fases se añadió cloroformo (Sigma-Aldrich, Cat. #C2432), seguido de centrifugación. La fase acuosa se recuperó y el ARN se precipitó con isopropanol (Bio Basic Canada, Cat. #67-63-0). El sedimento de ARN se lavó con etanol (Karal, Cat. #2003) y se resuspendió en agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich, Cat. #W4502). La concentración y pureza del ARN se evaluaron mediante espectrofotometría con un instrumento NanoDrop (NanoDrop Technologies). Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento posterior.

7.3 Síntesis de ADN complementario (cADN)

La síntesis de cADN se realizó a partir de ARN total utilizando el kit High Capacity RNA-to-cADN (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante.

7.4 Ensayos de expresión génica por qPCR

Los ensayos de expresión génica se llevaron a cabo mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando el reactivo Maxima SYBR Green/Rox 2X (Thermo Scientific, Cat. #K0222). Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado en un sistema de detección Step One Plus (Applied Biosystems™) en placas de 96 pocillos.

El diseño de los cebadores (primers) se realizó mediante la herramienta en línea Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Se diseñaron cebadores para los genes de referencia utilizados como controles internos para la normalización de los datos: Beta-2 microglobulina (B2M), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y proteína ribosomal lateral P0 (RPLPO). Simultáneamente, se diseñaron cebadores específicos para genes de interés involucrados en distintos mecanismos epigenéticos:

- **Metilación del ADN:** *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, TET1, TET2, TET3, MECP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4.*
- **Biogénesis de miRNAs:** *AGO1, AGO2, AGO3, AGO4, DGCR8, DICER1, DROSHA, TARBP2, TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C, XPO5.*
- **Modificación de histonas:** *BMI1, EED, EP300, EZH1, EZH2, KDM5B, KDM6A, PCGF1, PCGF2, PCGF6, RING1, RNF2, SUZ12, CREBBP, HDAC2, KMT2A, KMT2C, KMT2D, SIRT1.*
- **Regulación de la cromatina:** *ARID1B, BPTF, BRD7, CHD1, CHD4, CHD5, CHD7, DPF1, HDAC2, PBRM1, PHF10, SMARCA2, ARID2, SMARCA4.*

Los valores de Ct obtenidos se normalizaron con los genes de referencia y la cuantificación relativa de la expresión de mRNA se determinó mediante el método comparativo 2^-ΔΔCt (Livak & Schmittgen, 2001). Las secuencias de todos los cebadores utilizados se detallan en la Tabla Suplementaria 1 (Anexos).

7.5 Secuenciación bisulfito de genoma completo (WGBS) en plataforma DNBseq

La construcción de las bibliotecas para secuenciación bisulfito de genoma completo (WGBS) se realizó por duplicado para un total de ocho muestras (Tabla 1). El ADN genómico de cada muestra se fragmentó por sonicación empleando un equipo Bioruptor (Diagenode, Bélgica) hasta obtener fragmentos de un tamaño medio aproximado de 250 pb. Posteriormente, los fragmentos se sometieron a reparación de extremos, adición de una cola de adenina (dA) en el extremo 3' y ligación de adaptadores metilados, estos últimos diseñados para resistir la desaminación por bisulfito, siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. El ADN ligado se sometió a conversión con bisulfito de sodio utilizando el kit EZ ADN Methylation-Gold (ZYMO). A continuación, los fragmentos convertidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se escindieron del gel aquellos correspondientes al rango de tamaño de inserción deseado. Los productos purificados con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) se amplificaron por PCR. Finalmente, la secuenciación se llevó a cabo en la plataforma DNBseq-T7 de Wuhan Benagen Technology Co., Ltd. (Wuhan, China).

Tabla 1. Grupos incluidos en el ensayo de metiloma y comparaciones realizadas entre grupos.

SAMPLE NAME	
SINO CTL 1	group 1
SINO CTL 2	
SINO CHIKV 1	group 2
SINO CHIKV 2	
BLOOD CTL1	group 3
BLOOD CTL2	
BLOOD CHIKV1	group 4
BLOOD CHIKV2	

COMPARISON		
group 1	vs	group 2
group 1	vs	group 3
group 2	vs	group 4
group 3	vs	group 4

7.6 Procesamiento bioinformático para la identificación de regiones metiladas

Después de obtener los datos sin procesar, las lecturas de secuenciación se alinearon con el genoma de referencia (hg38) antes de realizar el análisis de metilación. El software Bismark se utilizó para realizar una comparación de las alineaciones de las

lecturas tratadas con bisulfito con un genoma de referencia utilizando parámetros predeterminados. Las lecturas que fueron alineadas con la misma región del genoma se tomaron como el número duplicado, y el número duplicado se utilizó para resumir la profundidad y la cobertura de la secuencia. La tasa de conversión de bisulfito se calculó como el porcentaje de las lecturas limpias metiladas como un porcentaje del número total de lecturas limpias en el genoma lambda utilizando el software Bismark. Como la citosina no metilada del genoma se convirtió en T después del tratamiento con bisulfito y la amplificación por PCR, la citosina metilada se mantuvo sin cambios. Bismark puede extraer información sobre los sitios de citosina del genoma a partir de los resultados de la comparación de las lecturas limpias con el genoma de referencia y, de ese modo, obtener estadísticas de cobertura del sitio de citosina y el número de diferentes tipos (CG como CpG, CHG y CHH) de lecturas de citosina metiladas. Como Bismark no puede discriminar el sitio C de metilación individual, se utilizó la prueba de distribución binomial para cada sitio C para confirmar el sitio C metilado mediante condiciones de detección de cobertura ≥4× y tasa de descubrimiento falso (FDR) <0.05.

7.7 Regiones diferencialmente metiladas (RDM)

Las RDM se identificaron mediante la comparación de los metilomas entre grupos (grupo 1 vs grupo 2 y grupo 3 vs grupo 4) utilizando ventanas que contenían al menos 5 sitios CpG (CHG o CHH) con un cambio de 2 veces en el nivel de metilación y un valor p de la prueba de Fisher ≤ 0.05. Además, se requirió que ambos tejidos no estuvieran hipometilados en el descubrimiento de RDM. Dos RDM cercanos se consideraron interdependientes y se unirían en un RDM continuo si la región genómica desde el inicio de un RDM ascendente hasta el final de un RDM descendente también tuviera diferencias de nivel de metilación de 2 veces entre el grupo 1 vs grupo 2 con un valor p ≤ 0.05. De lo contrario, los dos RDM se consideraron independientes. Después de fusionar iterativamente los RDM interdependientes, el conjunto de datos final de RDM se compuso de aquellos que eran independientes entre sí.

Para la búsqueda de sitios de interés de las RDM, las coordenadas establecidas para

las diferentes RDM se ordenaron en tablas de datos para facilitar la búsqueda de regiones promotoras metiladas de genes objetivo o regiones con función regulatoria (genes, iRNA, miRNA, siRNA, eRNA, cirRNA, factores de transcripción, sitios CTFC) con ayuda de Table Browser de la Universidad de California Santa Cruz (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables). De los genes involucrados en la RDM se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO) (https://geneontology.org/), los cuales ayudaron a establecer las funciones biológicas específicas, luego se utilizó una prueba hipergeométrica para encontrar términos GO significativamente enriquecidos en la lista de entrada, de genes relacionados con RDM. De igual manera se realizó un enriquecimiento de vías KEGG, el cual se utilizó con los genes relacionados con RDM, lo que ayuda a identificar vías metabólicas o vías de transducción de señales significativamente enriquecidas en genes relacionados con RDM en comparación con el fondo del genoma completo (https://www.genome.jp/kegg/pathway.html).

7.8 Reclutamiento de pacientes 2015 y seguimiento 2023

Se contó con una N de 193 pacientes que acudieron a la Clínica Hospital Dr. Roberto Nettel Flores del ISSSTE, en Tapachula, Chiapas (la cual brinda servicios de salud a la Región X Soconusco del estado), durante el periodo comprendido entre marzo y junio del 2015. Todos presentaban un cuadro clínico sugestivo de infección por VCHIK, confirmado mediante prueba molecular. Se obtuvieron sus datos telefónicos y, en el año 2023, se les invitó a participar en un estudio de seguimiento. A los pacientes que aceptaron se les convocó para acudir nuevamente a las instalaciones del mismo hospital, con el fin de realizar una toma de muestra de sangre periférica y aplicar un cuestionario clínico.

7.9 Ensayos basados en digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación

Se realizaron ensayos basados en la digestión selectiva del ADN por endonucleasas de restricción específicas a 27 pacientes previamente confirmados para VCHIK para validar las regiones metiladas como parte de los dos primeros objetivos, y 10 sujetos sanos que no hubieran sido infectados con VCHIK. Brevemente, este ensayo se llevó a cabo digiriendo 100 ng de ADN utilizando el Kit de Análisis de Metilación de

ADN EpiJET (MspI/HpaII, Thermo Scientific). En resumen, la endonucleasa HpaII es una enzima sensible a metilación capaz de digerir las secuencias CCGG, pero solo cuando no está metilada. En contraste, la enzima MspI, que también corta el ADN en los sitios CCGG, no se ve afectada por la metilación del ADN. El análisis de metilación se realizó en promotores y regiones reguladoras (PRKCZ, GH01J086772, MAP2K3-1, MAP2K3-2, GH17J078733, GH05J035861, ZFPM2, GH0XJ068496, GH01J008115, GH22J027789) e islas CpG de regiones específicas (CpG64, CpG152, CpG209, CpG100, CpG46, CpG116, CpG198, CpG79-1, CpG39, CpG33, CpG24, CpG30, CpG22, CpG74, CpG75).

Posteriormente se realizó MS-qPCR utilizando cebadores específicos de estos sitios promotores o islas CpG. En la Tabla Suplementaria 2 (Anexos) se encuentran los primers diseñados para este análisis.

Para el procedimiento, una muestra de ADN se dividió en tres tubos, cada uno fue digerido con una endonucleasa diferente que corta de manera preferencial: (1) ADN metilado; (2) ADN no metilado; y (3) ADN sin digerir. Además, se incluyeron los controles de ADN metilado y no metilado. Se incubaron las muestras durante una hora a 37°C. Las regiones confirmadas se buscaron en la segunda toma (muestras de seguimiento) y en el grupo control, esto para mantener las regiones candidatas para realizar pruebas experimentales. Para la MS-qPCR se empleó el termociclador StepOne Plus (Applied BiosystemsTM Foster City, CA, USA), en formato de placa de 96 pozos. Posteriormente se estimó el nivel de metilación de ADN empleando la fórmula: % de 5-mC = 100/(1+E) Cq2-Cq1.

7.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Prism 10 de GraphPad. Se aplicó la prueba t de Student para comparar los diferentes ensayos de cultivo celular. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para identificar las RDM mediante la comparación de los metilomas entre los distintos grupos (grupo 1 vs grupo 2 y grupo 3 vs grupo 4). Para el análisis de enriquecimiento de vías KEGG, se empleó la prueba exacta de Fisher con el fin de determinar si existe una asociación de los genes RDM con las vías KEGG. Se realizó un análisis descriptivo de la media y mediana

de la edad de los pacientes. Se aplicaron pruebas de ANOVA de dos vías para analizar los ensayos de MS-qPCR en los casos y controles con los diferentes blancos, así como entre los grupos Casos vs Controles vs Seguimiento, y también para los análisis de expresión génica en cultivos celulares.

8. RESULTADOS

8.1 Infección viral en cultivos celulares

En los cultivos de células Vero que tenían una confluencia de 80-90%, fueron infectados con sueros de pacientes positivos a VCHIK o con sobrenadantes de cultivos previamente infectados, las células se expusieron al suero durante una hora y al término de este tiempo se agregó el medio con suero al 2% (esto con la finalidad de que las células se mantuvieran vivas, pero evitar que sigan replicándose) y se deja en incubación habitual (37°C con 5% de CO_2), los días siguientes se realizó observación microscópica para identificar cambios morfológicos en las células que indiquen muerte celular; el ensayo de infección con VCHIK tuvo una duración de tres días (Figura 6). Al término de estos se procedió a levantar todo el cultivo haciendo un raspado de las células con un scraper estéril, se centrifugó y se alicuotaron los sobrenadantes y se almacenaron a –80 °C hasta realizar la titulación viral.

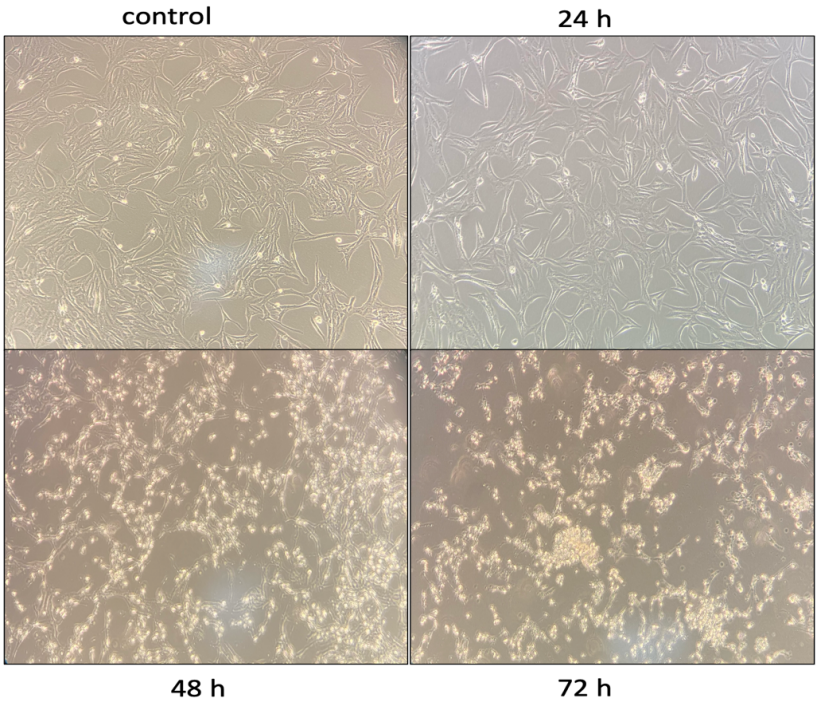


Figura 6. Seguimiento microscópico de cultivos de células Vero post-infección con VCHIK

8.2 Titulación viral mediante el método de formación de placas líticas con virus chikungunya.

La titulación viral por el método de formación de placas líticas es uno de los métodos más precisos para la cuantificación directa de los viriones infecciosos y sustancias antivirales a través del conteo de placas (unidades formadoras de placa (PFU), que corresponden a zonas de lisis celular). Se realizaron diluciones con VCHIK a diferentes concentraciones ($1x10^2$, $1x10^3$, $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$), las células se expusieron al inóculo durante una hora y al término de este tiempo se agregó carboximetilcelulosa y se dejó en incubación por 3-4 días, al término de este tiempo se realizó la tinción con azul de metileno para finalmente hacer el conteo de placas líticas (Figura 7).

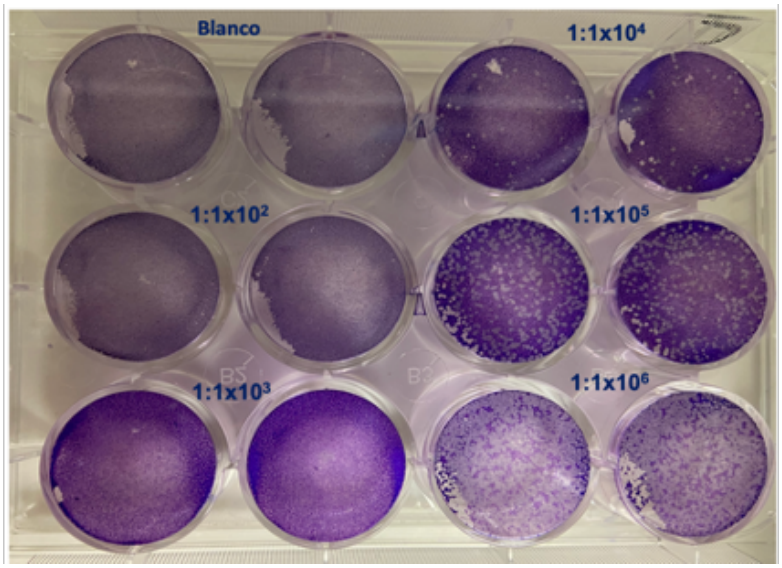


Figura 7. Placa de titulación viral de cultivos infectados con sueros de pacientes

8.3 Realización de ensayos de multiplicidad de infección en cultivo primario de linfocitos a diferentes tiempos

Cuando se terminaron los ensayos de titulación viral, se procedió a realizar ensayos para determinar la concentración viral que se utilizó para los ensayos de expresión de los diferentes mecanismos epigenéticos (metilación, modificación de histonas, etc.).
En este ensayo se sembraron 250 000 células en placas de 12 pozos, las cuales se

utilizarán para realizar ensayos de multiplicidad de infección, a partir de la titulación viral, se emplearon varias concentraciones de MOI (10, 5, 1, 0.1, 0.01 MOI), se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito (infección y titulación viral), Con este ensayo se seleccionó la concentración de 10 y 100 MOI a las 48 horas debido a que se sigue manteniendo la proliferación celular en todas las concentraciones empleadas sin significancia estadística, es decir, que la viabilidad celular a las 48 horas post-infección se mantuvo sin cambios significativos, al término de esto se realizó extracción de RNA total de estos cultivos para posteriormente realizar los ensayos de expresión mediante qPCR (Figura 8).

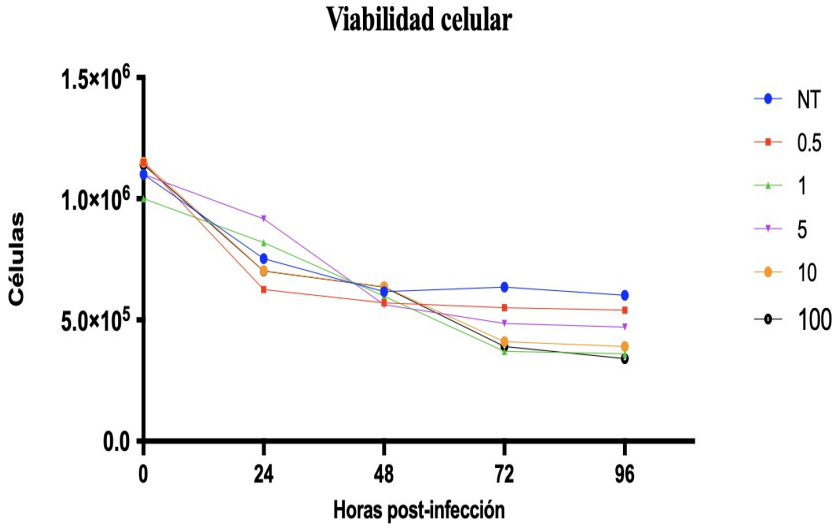


Figura 8. Viabilidad celular de cultivo primario de linfocitos

8.4 Ensayos de expresión de mecanismos epigenéticos

Para los ensayos de expresión de los cuatro mecanismos epigenéticos (metilación, biogénesis de miRNAs, modificaciones de histonas y regulación de cromatina), se diseñaron primers (ver Tabla Suplementaria 1 en ANEXOS) para 57 genes (Tabla 2), se extrajo RNA de los cultivos de sinoviocitos y cultivos primarios de linfocitos humanos post-infección con VCHIK.

Tabla 2. Lista de genes analizados en el ensayo de expresión.

Metilación del ADN	Genes involucrados en la modificación de histonas	Remodelación de cromatina	Biogenesis de miRNA
DNMT1	*PCGF1*	*SMARCA2*	*DROSHA*
DNMT3A	*PCGF2*	*SMARCA1*	*DGCR8*
DNMT3B	*PCGF3*	*SMARCA4*	*DICER1*
DNMT3L	*BMI1*	*ARID1A*	*AGO2*
TET1	*PCGF6*	*ARID2*	*AGO1*
TET2	*RING1*	*BRD7*	*AGO4*
TET3	*RNF2*	*PBRM1*	*TNRC6A*
MeCP2	*EED*	*CHD5*	*XPO5*
MBD1	*suz12*	*CHD7*	*TARBP2*
MBD2	*EZH1*	*CHD4*	*AGO3*
MBD4	*EZH2*	*ARID1B*	*TNRC6C*
MBD3	*KDM6A*	*DPF1*	*TNRC6B*
	EP300	*PHF10*	
	KDM5B	*BPTF*	
	CREBBP	*CHD1*	
	HDAC2	*HDAC1*	
	SIRT1	*HDAC2*	
	KMT2A		
	KMT2D		
	KMT2C		

Los resultados de expresión fueron graficados con el software GraphPad Prism v10, se obtuvieron mapas de calor (Heatmap), de los mecanismos epigenéticos analizados. El Heatmap es una gráfica codificada por colores, en el cual, el color rojo nos indica que hay una sobreexpresión del gen, el color verde nos indica que hay una subexpresión del gen, y el color negro, nos indica una expresión basal del gen.

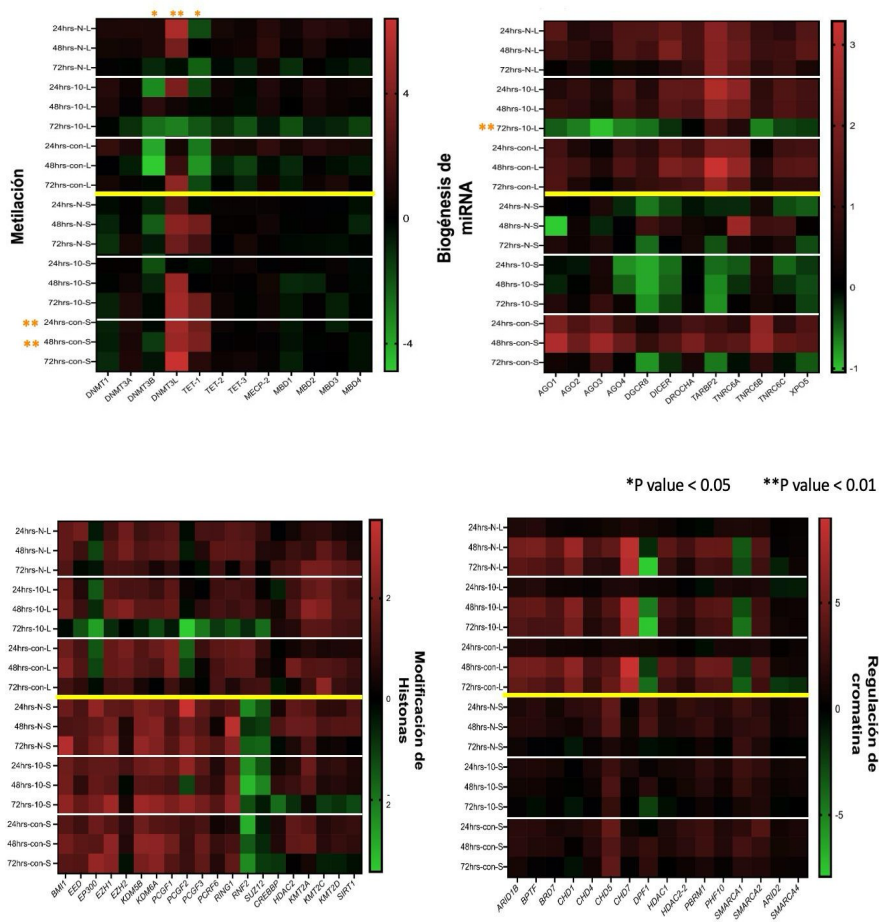


Figura 9. Mapas de calor de procesos epigenéticos en cultivos celulares de sinoviocitos y cultivos primarios de linfocitos humanos infectados con VCHIK.

Los resultados encontrados en los 4 mecanismos epigenéticos analizados (ver figura 9) fueron cambios en la expresión en los genes relacionados en la metilación del ADN a las 72 h post-infección, donde la mayoría de los genes se vieron sobreexpresados, de los cuales se pueden resaltar los genes *DNMT3B* y *DNMT3L* que participan en la metilación *de novo* y la familia de genes *MBD* que juega un papel de represión transcripcional y participan en el silenciamiento génico. En el proceso de biogénesis de miRNA se identificó una expresión activa en la mayoría de los genes, en los cultivos post-infección con VCHIK, al igual que las células no tratadas. Estos datos sugieren que existe una regulación viral que puede involucrar algunos mecanismos que favorezcan el proceso de infección viral lo que refuerza la hipótesis

planteada en la propuesta. En el resto de los mecanismos analizados no se observaron cambios sustanciales en la mayoría de los genes.

8.5 Búsqueda bioinformática de regiones metiladas

Después de realizar el metiloma de muestras de cultivos de sinoviocitos infectados a las 48 y 72 horas se obtuvo un promedio de 15 Gb de bases limpias después de filtrar las lecturas de baja calidad, las lecturas N y las secuencias adaptadoras. A continuación, se muestran los resultados obtenidos del análisis bioinformático desde los puntos de control de calidad (QC), así como los datos analizados.

Después del filtrado, las lecturas limpias se alinearon con la secuencia de referencia hg38 usando BSMAP. La tasa de mapeo del genoma corresponde a la tabla 3 y 4.

Tabla 3. Resumen de datos de secuenciación para cada muestra.

Sample ID	Fragment Length(bp)	Sequencing Strategy	Clean Reads Number	Clean Data Size(bp)	Clean Rate(%)
SINO_CHIKV_2	100-500bp	PE100	150,000,002	15,000,000,200	97.54
SINO_CTL_2	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.25
SINO_CHIKV_1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.22
BLOOD_CHIK1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.25
BLOOD_DENV2	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.74
BLOOD_CTL1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.42
BLOOD_CHIK2	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.27
BLOOD_CTL2	100-500bp	PE100	150,000,006	15,000,000,600	97.37
SINO_CTL_1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.72
BLOOD_DENV1	100-500bp	PE100	150,000,004	15,000,000,400	97.69

Clean Rate (%) = Clean Data Size (bp)/Raw Data Size (bp)

Tabla 4. Resumen de datos y control de calidad por muestra

Sample ID	Clean Reads	Mapped Reads	Mapping Rate (%)	Uniquely Mapped Reads	Uniquely Mapping Rate (%)	Bisulfite Conversion Rate (%)
SINO_CHIKV_2	150,000,002	134,425,922	89.62	122,893,103	81.93	96.82
SINO_CTL_2	150,000,004	136,137,807	90.76	124,750,158	83.17	96.84
SINO_CHIKV_1	150,000,004	136,262,369	90.84	124,425,343	82.95	96.87
BLOOD_CHIK1	150,000,004	141,969,724	94.65	129,757,035	86.50	97.50
BLOOD_DENV2	150,000,004	137,056,891	91.37	125,024,591	83.35	96.95
BLOOD_CTL1	150,000,004	141,990,291	94.66	129,965,951	86.64	96.87
BLOOD_CHIK2	150,000,004	141,714,562	94.48	129,571,259	86.38	97.32
BLOOD_CTL2	150,000,006	141,900,152	94.60	129,942,181	86.63	96.82
SINO_CTL_1	150,000,004	136,767,538	91.18	124,926,010	83.28	96.74
BLOOD_DENV1	150,000,004	136,011,619	90.67	124,020,434	82.68	97.05

Teóricamente, la distribución de la profundidad de secuenciación indica si la secuenciación está bien proporcionada. Y la profundidad del vértice de la distribución es igual o cercana a la profundidad media de secuenciación de todo el genoma (Figura 10).

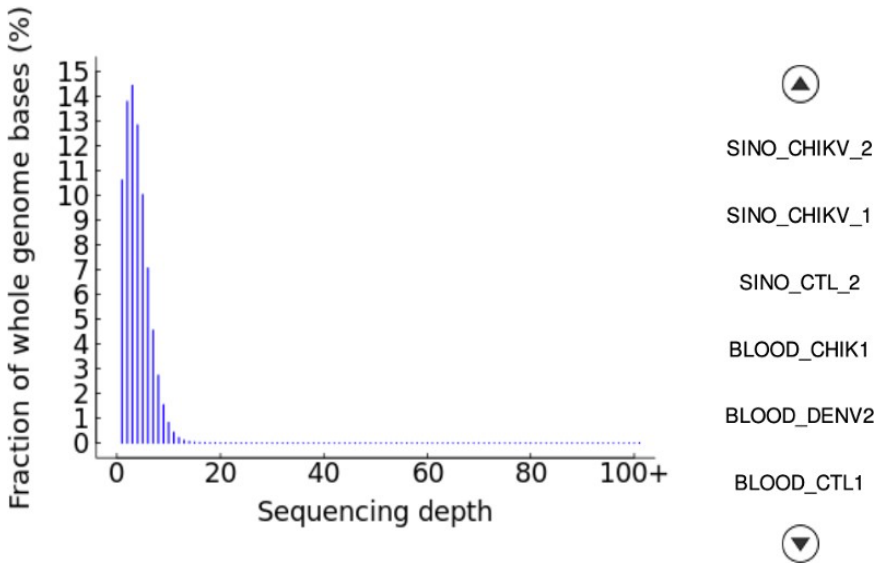


Figura 10. Distribución de la profundidad de secuenciación. Arriba se muestra la distribución principal de la cobertura del genoma que varía con la profundidad de secuenciación. El eje X representa la profundidad de secuenciación, y el eje Y representa el porcentaje de cobertura del genoma a cierta profundidad de secuenciación.

De acuerdo con el contexto de secuencia de la citosina, la citosina en la secuencia de ADN se puede clasificar en tres tipos, CG, CHG y CHH (H = A, G o T). La línea decreciente en la figura 11 revela el rango de profundidad de secuenciación efectiva de la citosina.

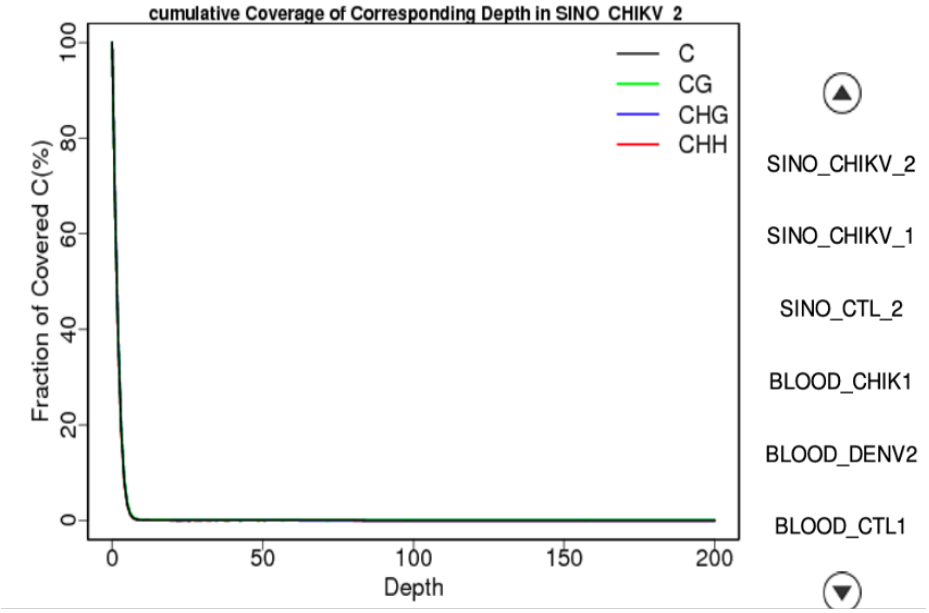


Figura 11. Distribución acumulada de la profundidad de secuenciación efectiva de la citosina. El eje X representa la profundidad de secuenciación efectiva de la base C, mientras que el eje Y representa el porcentaje acumulado de la base C a una cierta profundidad de secuenciación. La línea decreciente en la figura revela el rango de profundidad de secuenciación efectiva de la citosina. H representa una base no G (H = A, T o C).

De acuerdo con la cobertura efectiva del genoma completo en todas las muestras analizadas, se evaluaron los patrones de metilación en distintos cromosomas humanos mediante el porcentaje de citosinas en diferentes contextos (C, CG, CHG y CHH). En conjunto, todas las muestras reflejan una cobertura elevada y consistente, con valores que oscilan en rangos cercanos al 65–78 %, lo que indica una secuenciación robusta y uniforme. Asimismo, se observa que la mayoría de los cromosomas mantienen porcentajes similares entre los distintos contextos de metilación, lo que sugiere una

distribución homogénea de la información epigenética. A continuación, se muestra la Tabla 5 (el resto de los resultados pueden consultarse en el Anexo B).

Tabla 5: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_VCHIK_2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)
NC_000001.11	69.105	70.116	70.836
NC_000002.12	70.668	71.683	72.304
NC_000003.12	70.346	70.833	72.07
NC_000004.12	70.063	70.698	71.833
NC_000005.10	69.383	68.769	70.916
NC_000006.12	68.45	68.559	70.058
NC_000007.14	69.145	69.548	70.81
NC_000008.11	66.28	64.256	67.481
NC_000009.12	66.821	68.332	68.735
NC_000010.11	70.676	71.585	72.524
NC_000011.10	68.978	69.381	70.676
NC_000012.12	69.244	70.105	71.092
NC_000013.11	70.41	70.674	71.978
NC_000014.9	67.284	67.118	68.638
NC_000015.10	64.339	64.416	65.855
NC_000016.10	64.488	65.461	66.096
NC_000017.11	63.225	63.569	64.93
NC_000018.10	67.223	66.312	68.651
NC_000019.10	65.576	67.291	67.658
NC_000020.11	71.078	71.685	72.991

En relación con el análisis de la cobertura efectiva en distintos elementos genómicos, los resultados obtenidos se presentan a continuación para los diferentes contextos de metilación evaluados (C, CG, CHG y CHH). En este apartado se incluyen regiones funcionales como CDS, mRNA, regiones repetitivas e islas CpG, así como zonas regulatorias adyacentes (Up2k y Down2k). En conjunto, los resultados muestran que la cobertura es elevada y relativamente homogénea en la mayoría de los elementos, con valores que oscilan entre el 55 % y el 72 %, lo que refleja tanto la calidad técnica de la secuenciación como la estabilidad de los perfiles epigenéticos. Se observa, además, que las regiones codificantes (CDS y mRNA) tienden a presentar los mayores porcentajes de cobertura, mientras que las islas CpG muestran valores más bajos, lo cual es consistente con su papel regulador y su particular dinámica

epigenética. A continuación, se muestra la Tabla 6 (el resto de los resultados pueden consultarse en el Anexo C).

Tabla 6. Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_VCHIK_2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	63.462	64.479	63.898	63.055
Down2k	60.965	60.224	62.169	60.644
Up2k	60.093	60.257	61.532	59.574
mRNA	66.495	66.343	67.719	66.14
repeat	63.568	64.617	65.015	63.07
CpGIsland	55.222	56.198	56.465	54.036

Cobertura efectiva de cada tipo de elemento, y la cobertura podría variar continuamente desde el 0% hasta el 100% y H representa una base no-G (H = A, T o C). El control de calidad de los datos de secuenciación se evaluó mediante diversos parámetros en todas las muestras analizadas (Tabla 7). En promedio, se obtuvieron 15 Gb de datos limpios por muestra, con una tasa de bases Q20 superior al 93% en todos los casos, lo que indica una alta precisión en la llamada de bases. El porcentaje de alineamiento con el genoma de referencia (hg38) fue superior al 89% en todas las muestras, alcanzando valores cercanos al 94% en las muestras de sangre, lo que refleja una buena calidad de mapeo. La tasa de conversión por bisulfito se mantuvo por encima del 96.7% en todas las muestras, cumpliendo con los estándares requeridos para estudios de metilación. El porcentaje de duplicación fue bajo en todos los casos (1.8%–10.5%), lo que indica una baja redundancia en la librería. La profundidad media de secuenciación osciló entre 3.3X y 3.9X, con una cobertura del genoma que alcanzó entre el 78.6% y el 81.5%, valores considerados adecuados para el análisis global de metilación. En conjunto, estos indicadores confirman que todas las muestras cumplen con los criterios de calidad establecidos.

Tabla 7. Elementos de control de calidad para cada muestra

Sample ID	Clean Reads Q20 Rate (%)	Clean Data Size (bp)	Mapping Rate (%)	Bisulfite Conversion Rate (%)	Duplication Rate (%)	Average Depth (X)	Coverage (%)
SINO_CHIKV_2	93.89;97.29(Pass)	15,000,000,200.00	89.62(Pass)	96.82	10.48(Pass)	3.29	79.438
SINO_CHIKV_1	93.69;97.06(Pass)	15,000,000,400.00	90.84(Pass)	96.87	7.84(Pass)	3.47	80.107
SINO_CTL_2	93.37;97.25(Pass)	15,000,000,400.00	90.76(Pass)	96.84	8.71(Pass)	3.43	80.092
BLOOD_CHIK1	93.91;96.96(Pass)	15,000,000,400.00	94.65(Pass)	97.5	4.41(Pass)	3.79	81.072
BLOOD_DENV2	94.25;97.42(Pass)	15,000,000,400.00	91.37(Pass)	96.95	6.13(Pass)	3.58	79.63
BLOOD_CTL1	93.60;97.32(Pass)	15,000,000,400.00	94.66(Pass)	96.87	2.22(Pass)	3.9	81.461
BLOOD_CHIK2	93.94;97.03(Pass)	15,000,000,400.00	94.48(Pass)	97.32	3.13(Pass)	3.84	81.037
BLOOD_CTL2	93.81;97.10(Pass)	15,000,000,600.00	94.60(Pass)	96.82	1.83(Pass)	3.91	81.46
SINO_CTL_1	94.08;97.40(Pass)	15,000,000,400.00	91.18(Pass)	96.74	7.15(Pass)	3.48	79.862
BLOOD_DENV1	94.37;97.38(Pass)	15,000,000,400.00	90.67(Pass)	97.05	7.32(Pass)	3.51	78.613

En relación con el análisis de metilación por cromosoma**,** se determinó el nivel promedio de citosinas metiladas en la muestra analizada, desglosado en los contextos epigenéticos C, CG, CHG y CHH. Los resultados muestran que la metilación en contexto CG es la más abundante, con valores superiores al 70% en prácticamente todos los cromosomas. En contraste, los niveles de metilación en los contextos CHG y CHH son considerablemente más bajos, cercanos al 1%. El porcentaje global de citosinas metiladas (C %) se mantiene alrededor del 4%, con una distribución estable entre los distintos cromosomas. Tabla 8 (el resto de los resultados pueden consultarse en el Anexo D).

Tabla 8. Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_VCHIK_2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.918	66.587	3.444	3.587
NC_000002.12	6.867	68.259	3.441	3.507
NC_000003.12	6.602	67.393	3.437	3.527
NC_000004.12	6.637	64.24	3.509	3.598
NC_000005.10	6.564	63.56	3.423	3.533
NC_000006.12	6.852	68.38	3.455	3.521
NC_000007.14	7.164	67.556	3.45	3.516
NC_000008.11	6.606	65.352	3.413	3.521
NC_000009.12	7.238	68.626	3.434	3.519
NC_000010.11	7.345	67.161	3.456	3.521
NC_000011.10	6.93	67.172	3.407	3.516
NC_000012.12	7.121	69.008	3.437	3.505
NC_000013.11	6.863	64.371	3.416	3.548
NC_000014.9	6.921	67.06	3.441	3.513
NC_000015.10	7.234	69.788	3.462	3.496
NC_000016.10	9.775	58.098	3.46	3.704
NC_000017.11	8.445	69.541	3.442	3.502
NC_000018.10	6.893	65.931	3.416	3.547
NC_000019.10	9.255	69.415	3.459	3.468
NC_000020.11	7.4	65.72	3.433	3.55
NC_000021.9	7.104	62.79	3.413	3.481
NC_000022.11	8.538	69.291	3.444	3.472

En cuanto al perfil de metilación en distintos elementos genómicos, se observó que las regiones codificantes (CDS) y las secuencias repetitivas presentan los niveles más altos de metilación, especialmente en contexto CG (alrededor del 80 %), mientras que las islas CpG exhiben los porcentajes más bajos, con valores de CG cercanos al 63 % y de CHH por debajo del 9 %. Las regiones adyacentes a genes (Down2k y Up2k) mostraron niveles intermedios, y en todos los elementos la metilación en contextos no-CG (CHG y CHH) fue notablemente inferior a la observada en contexto CG. Tabla 9 (el resto de los resultados pueden consultarse en el Anexo E).

Tabla 9. Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_VCHIK_2.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.038	53.83	4.603	5.487
Down2k	8.29	70.927	3.451	3.465
Up2k	8	48.854	3.435	3.472
mRNA	7.663	72.909	3.44	3.491
repeat	7.772	72.836	3.518	3.543
CpGIsland	16.758	50.367	3.65	3.783

8.6 Proporción en la citosina metilada (mCG, mCHG y mCHH)

En relación con la proporción de los distintos tipos de citosina metilada en el genoma completo, en todas las muestras analizadas, la metilación en contexto CG (mCG) fue la más abundante, representando entre el 73 % y el 84 % del total de citosinas metiladas. Le siguieron los contextos CHH (mCHH), con proporciones que oscilaron entre el 12 % y el 20 %, mientras que la metilación en contexto CHG (mCHG) fue la menos frecuente, con valores entre el 3 % y el 6 %. Este patrón es consistente con lo reportado para células somáticas humanas, donde la metilación CpG constituye el mecanismo epigenético dominante.

Al comparar los grupos experimentales, se observó que las muestras de sangre (BLOOD_CTL y BLOOD_CHIK) presentaron proporciones de mCG ligeramente superiores (≈80 %) a las de sinoviocitos (≈75–77 %), lo que sugiere diferencias

basales en el perfil epigenético entre ambos tipos celulares. Dentro de cada tipo celular, la infección por VCHIK se asoció con un incremento en la proporción de mCG, particularmente en sangre, donde el grupo BLOOD_CHIK alcanzó el valor más alto (83.6 %). En los contextos no-CG, las diferencias fueron más sutiles: los sinoviocitos mostraron valores de mCHG ligeramente superiores a los de sangre, mientras que en mCHH ocurrió lo contrario, con proporciones más altas en sinoviocitos figura 12 (Tabla Suplementaria 40, ANEXOS E). La identificación de la citosina metilada se realizó de acuerdo con el método y el algoritmo de corrección de Lister et al. (2005).

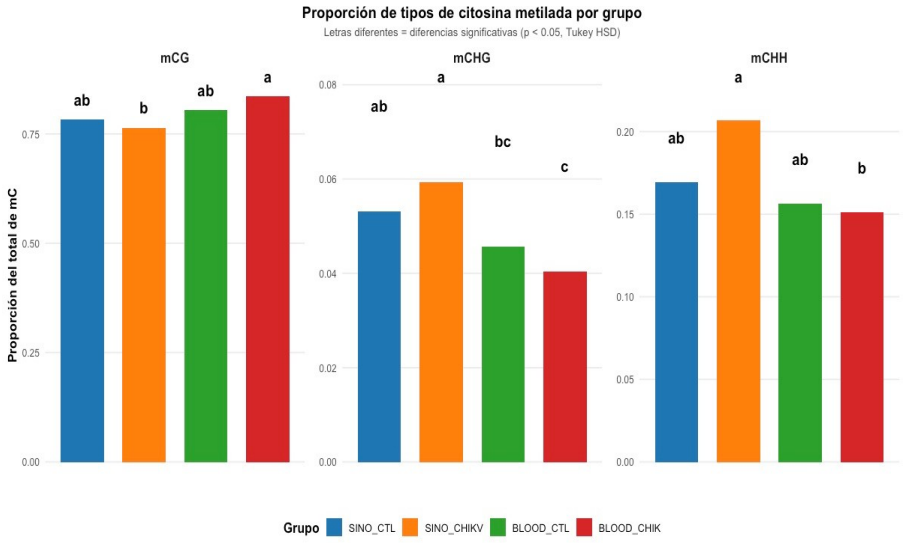


Figura 12. Proporción de tipos de citosina metilada por grupo experimental. La gráfica muestra la proporción promedio de citosinas metiladas en los contextos mCG, mCHG y mCHH en cuatro grupos experimentales: sinoviocitos control (SINO_CTL), sinoviocitos infectados con VCHIK (SINO_VCHIK), muestras de sangre control (BLOOD_CTL) y muestras de sangre de pacientes con infección por VCHIK (BLOOD_CHIK). Cada barra representa la proporción relativa de metilación en cada contexto respecto al total de citosinas metiladas detectadas en el genoma. En general, el contexto mCG presenta la mayor proporción de metilación en todos los grupos, seguido por mCHH y mCHG. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas entre grupos, determinadas mediante ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$), donde letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos dentro de cada tipo de metilación.

8.7 Distribución de niveles de metilación

El estado de metilación de CG, CHG y CHH difiere entre especies, e incluso varía

con diferentes condiciones relacionadas con el tiempo, el espacio y la fisiología dentro de un solo organismo. La figura 13 muestra el porcentaje de citosina metilada según el nivel de metilación en la muestra control de sinoviocitos (SINO_CTL). Se observa que los contextos CG, CHG y CHH se concentran principalmente en niveles bajos (10–30 %), con un 85 % de sitios en el nivel 10 %. En contraste, las citosinas metiladas (mC, mCG, mCHG y mCHH) se desplazan hacia niveles intermedios y altos: mCG alcanza su máxima abundancia en el 100 % (51 %), mientras que mCHG y mCHH predominan en niveles del 50–60 % (hasta 39 %). Este perfil refleja el patrón epigenético basal de los sinoviocitos. Las otras figuras se muestran en el ANEXO E.

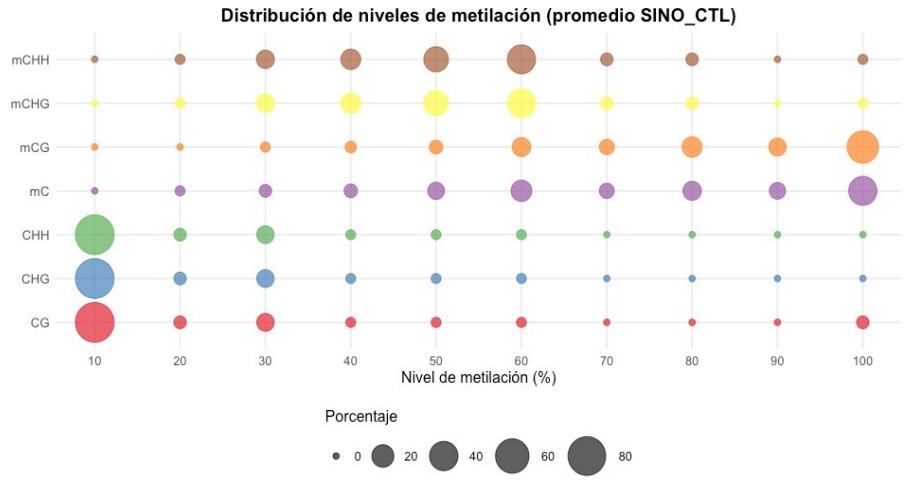


Figura 13. Distribución del nivel de metilación de mC en cada contexto de secuencia. Solo se utilizaron los mC cubiertos por al menos cuatro lecturas para calcular el nivel de metilación.

8.8 Paisaje genómico de metilación

La variación de los porcentajes de metilación en diferentes regiones genómicas (CDS, islas CpG, regiones upstream y downstream, mRNA y secuencias repetitivas) entre los grupos experimentales analizados (blood_CHIK, blood_CTL, blood_DENV, SINO_CHIK y SINO_CTL). Los datos se presentan diferenciados por contexto de metilación (CG, CHG y CHH), lo que permite comparar la contribución relativa de cada tipo de citosina metilada en cada condición (Figura 14).

Para evaluar diferencias entre grupos se aplicó la prueba estadística de Wilcoxon, la cual no mostró diferencias significativas. No obstante, la distribución gráfica permite identificar tendencias relevantes: en las regiones codificantes (CDS) y en mRNA, el contexto CG mantiene porcentajes consistentemente más altos en todos los grupos, confirmando su predominancia en la regulación génica. En contraste, las islas CpG presentan porcentajes más bajos de metilación, especialmente en el contexto CHH, lo que coincide con su papel regulador. Por otro lado, las secuencias repetitivas muestran porcentajes elevados de metilación, reflejando la función de silenciamiento epigenético en estas regiones.

En conjunto, aunque las pruebas estadísticas no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, la visualización revela patrones y tendencias epigenéticas que sugieren variaciones contextuales en la distribución de la metilación, particularmente en los grupos infectados, donde se observan ligeros cambios en la contribución de CHG y CHH respecto a los controles. (Tablas en ANEXO F)

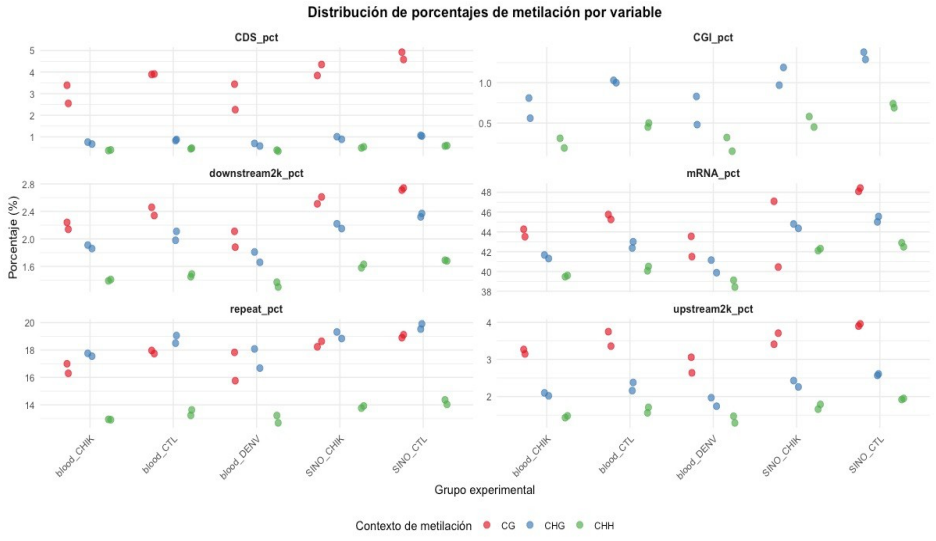


Figura 14. Distribución de porcentajes de metilación por variable en diferentes regiones genómicas (CDS, islas CpG, regiones upstream y downstream, mRNA y secuencias repetitivas) entre los grupos experimentales analizados (blood_CHIK, blood_CTL, blood_DENV, SINO_CHIK y SINO_CTL). El eje de las X corresponde a los grupos experimentales y el eje de las Y al porcentaje de metilación. Los datos se muestran diferenciados por contexto de metilación (CG, CHG y CHH).

8.9 Regiones diferencialmente metiladas (RDM)

Las RDM son extensiones de ADN en el genoma de una muestra que tienen diferentes patrones de metilación de ADN en comparación con otras muestras, para revelar el papel potencial de la metilación en respuesta a la infección por VCHIK, analizamos la RDM de células de sinoviocitos infectados en comparación con células de sinoviocitos no infectados, de igual manera, células de linfocitos infectados vs células de linfocitos no infectados. Se utilizó un enfoque de ventana deslizante para identificar las RDM que contenían al menos cinco sitios CG (CHH o CHG) y los niveles de metilación de las dos muestras diferían. En total, se identificaron 1,457 RDM entre de sinoviocitos infectados con VCHIK en comparación con los sinoviocitos no infectados, y 1,016 RDM entre células de linfocitos infectados vs células de linfocitos no infectados (Figura 15). En contexto de mCG, mCHG y mCHH, se identificaron 362, 79 y 1,016 RDM, respectivamente (Tabla 10). Mientras que, en relación a linfocitos infectados con VCHIK en comparación con los linfocitos no infectados, se identificaron 1,026 RDM y hubo 285, 37 y 704 RDM en contexto de mCG, mCHG y mCHH, respectivamente. Tabla 11

También se realizó un análisis de longitud de RDM para cada cromosoma (Tabla 10 y 11) encontramos que la longitud variaba entre los 22 cromosomas. Al evaluar los patrones más largos de mCG, mCHG y mCHH, se encontró que para los sinoviocitos el cromosoma 1 presentó los mayores valores, mientras que en linfocitos los patrones mCG y mCHH más largos correspondieron al cromosoma 1 y el mCHG al cromosoma 2. Estos resultados pueden estar relacionados con el número de genes, transposones y la aparición de otros elementos dentro de cada cromosoma.

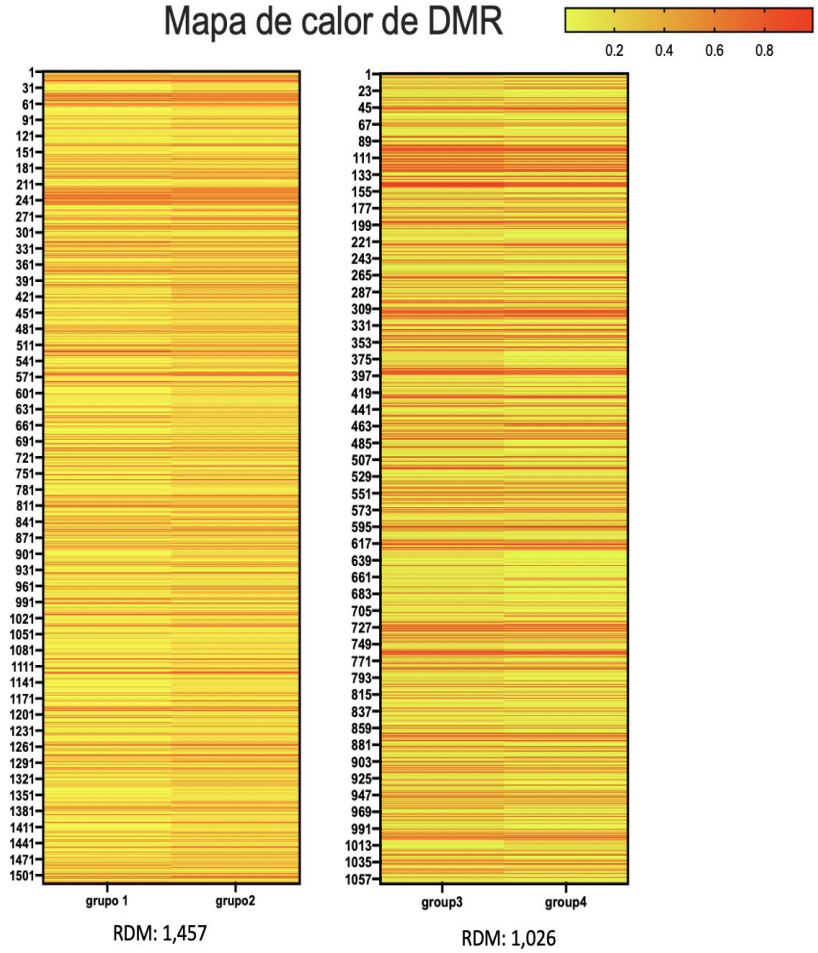


Figura 15. Mapas de calor que representan las RDM identificadas en cada uno de los grupos analizados.

Tabla 10. Identificación de RDM y análisis de grupo 1 vs grupo 2

Cromosoma	mCG		mCHG		mCHH	
	Numero de RDM	Tamaño de RDM	Numero de RDM	Tamaño de RDM	Numero de RDM	Tamaño de RDM
CHR1	98	11987	17	2238	185	11250
CHR2	31	4452	3	147	68	3238
CHR3	9	755	2	204	44	2070
CHR4	15	1963	0	0	44	1689
CHR5	8	452	2	151	37	2126
CHR6	14	1339	4	250	40	2585
CHR7	4	708	2	121	44	2176
CHR8	7	1077	0	0	35	1501
CHR9	9	959	4	598	38	2009
CHR10	21	2759	3	157	41	2120
CHR11	14	2602	0	0	33	2248
CHR12	9	2190	1	159	41	2717
CHR13	23	4853	3	583	53	2493
CHR14	4	192	0	0	15	937
CHR15	12	1714	5	414	40	2681
CHR16	10	1116	4	483	37	1743
CHR17	11	863	3	404	26	1681
CHR18	8	2741	1	111	40	1500
CHR19	7	387	7	777	29	1823
CHR20	17	3040	7	544	40	1860
CHR21	26	3551	6	462	56	2844
CHR22	5	744	5	464	30	2134
TOTAL	362	50444	79	8267	1016	55425

Tabla 11. Identificación de RDM y análisis de grupo 3 vs grupo 4

Cromosoma	mCG		mCHG		mCHH	
	Numero de RDM	Tamaño de RDM	Numero de RDM	Tamaño de RDM	Numero de RDM	Tamaño de RDM
CHR1	65	13520	8	998	112	5367
CHR2	20	4471	9	1169	55	2742
CHR3	22	2657	0	0	24	1593
CHR4	13	2024	3	705	36	1590
CHR5	4	287	0	0	36	1583
CHR6	12	2320	1	41	30	1618
CHR7	9	1138	2	274	27	1506
CHR8	9	1884	0	0	21	601
CHR9	19	2563	4	525	38	1727
CHR10	12	2130	0	0	33	1476
CHR11	5	328	0	0	25	1272
CHR12	8	2395	1	72	27	935
CHR13	28	5783	2	182	45	2956
CHR14	1	26	0	0	12	348
CHR15	14	3185	1	49	28	1251
CHR16	3	717	1	320	17	736
CHR17	7	586	0	0	8	470
CHR18	9	2491	2	172	27	1253
CHR19	7	813	0	0	12	1005
CHR20	9	2192	1	39	42	3416
CHR21	6	658	0	0	33	1060
CHR22	3	863	2	213	16	775
TOTAL	285	53031	37	4759	704	35280

8.10 Genes diferencialmente metilados (GDM) y análisis funcional

Con relación a la comparación entre el grupo 1 vs grupo 2, se identificaron 472 genes diferencialmente metilados (GDM) ubicados en RDM. Para investigar las funciones biológicas de los GDM, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, https://www.genome.jp/kegg/) y Reactome Pathway Database (https://reactome.org/), WikiPathways (https://www.wikipathways.org/). Como se muestra en la tabla suplementaria 44. Los GDM se asignaron a algunas vías como Ciclo GTPasa CDC42, Señalización por Rho GTPasas, ciclo de la GTPasa RAC2, entre otros, que pueden estar estrechamente involucradas en respuesta a infección viral. Figura 16.

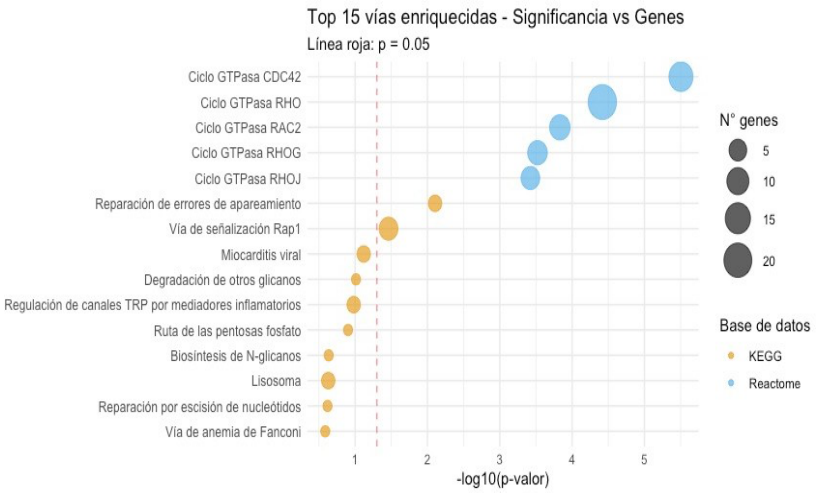


Figura 16. Dotplot de las 15 vías más significativas enriquecidas en genes diferencialmente metilados para el grupo1 vs grupo2. Los puntos representan vías biológicas, ordenadas en el eje Y por su nivel de significancia (las más significativas arriba). El eje X muestra -log10(p-valor), donde valores mayores indican mayor significancia estadística; la línea roja punteada marca el umbral de p = 0.05. El tamaño de cada punto es proporcional al número de genes en la vía, y el color indica la base de datos de origen (naranja = KEGG, azul = Reactome).

Con respecto a la comparativa entre el grupo 3 vs grupo 4, se identificaron 324 genes diferencialmente metilados (GDM) ubicados en RDM. Para investigar las

funciones biológicas de los GDM, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, https://www.genome.jp/kegg/) y Reactome Pathway Database (https://reactome.org/), WikiPathways (https://www.wikipathways.org/). Como se muestra en la tabla suplementaria 45. Los GDM se asignaron a algunas vías como Señalización por GTPasas Rho, Vía GTPasa CDC42, entre otros, que pueden estar estrechamente involucradas en respuesta a infección viral. Ver figura 17.

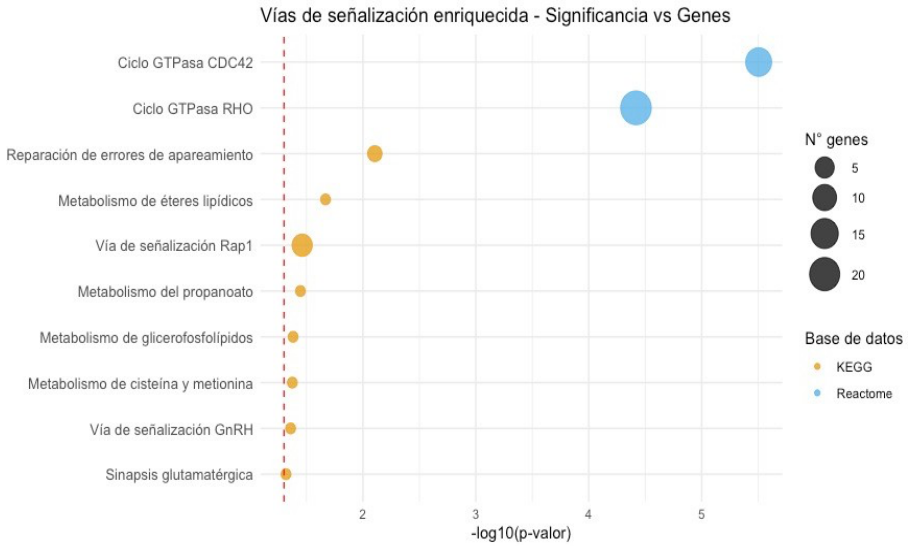


Figura 17. Dotplot de las vías de señalización enriquecidas en genes diferencialmente metilados para el grupo3 vs grupo4. El eje X muestra -log10(p-valor), donde valores mayores indican mayor significancia estadística; la línea roja punteada marca el umbral de p = 0.05. El tamaño de cada punto es proporcional al número de genes en la vía, y el color indica la base de datos de origen (naranja = KEGG, azul = Reactome).

8.11 Paisaje de metilación diferencial en elementos reguladores

El análisis del paisaje genómico de metilación diferencial entre el grupo 1 vs grupo 2 (Figura 18) y grupo 3 vs grupo 4 (Figura 19) reveló una distribución amplia DMRs a lo largo de prácticamente todos los cromosomas. La visualización circular permitió identificar la localización genómica de estas DMRs en diferentes clases de elementos reguladores, incluyendo circRNA, piRNA, elementos reguladores clásicos

(promotores y potenciadores), lncRNA, islas CpG y sitios de unión a CTCF.

En general, se observó una mayor abundancia relativa de eventos de hipometilación (puntos azules) en comparación con eventos de hipermetilación (puntos rojos), lo que sugiere una tendencia global hacia la pérdida de metilación en el grupo comparado. Estas alteraciones epigenéticas se distribuyen a lo largo de múltiples cromosomas, aunque ciertos cromosomas muestran una mayor concentración de DMRs, lo que podría indicar regiones genómicas particularmente susceptibles a cambios epigenéticos.

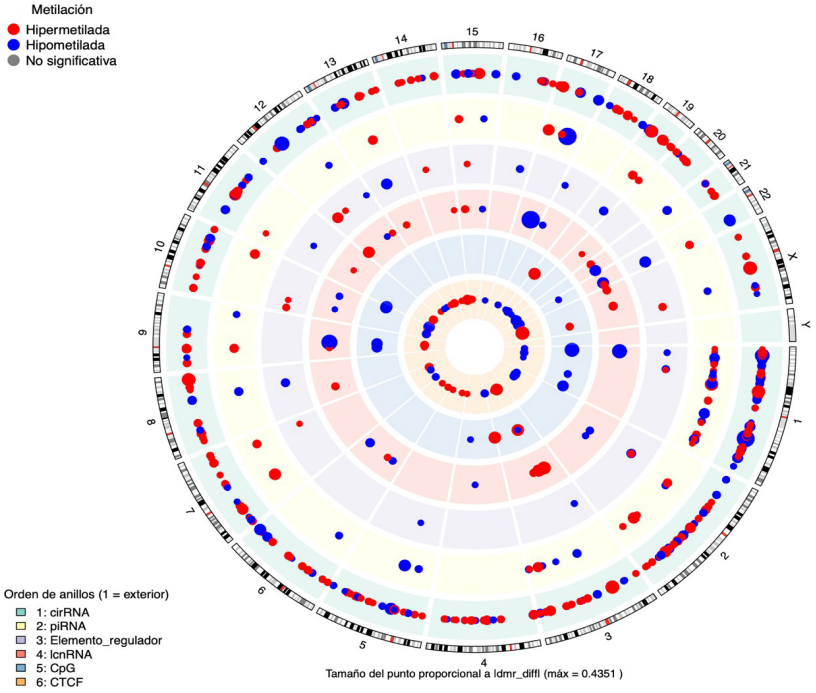


Figura 18. Paisaje de metilación diferencial en regiones reguladoras entre grupo 1 y grupo 2. Representa una distribución de regiones diferencialmente metiladas (DMRs) en distintos tipos de elementos reguladores. Los cromosomas se muestran en el anillo externo. Los anillos internos representan diferentes clases de regiones regulatorias en las que se detectaron DMRs: (1) circRNA, (2) piRNA, (3) elementos reguladores, (4) lncRNA, (5) islas CpG y (6) sitios de unión a CTCF. Cada punto corresponde a una región diferencialmente metilada. El color indica la dirección del cambio epigenético: rojo, hipermetilación; azul, hipometilación; gris, cambios no significativos. El tamaño del punto es proporcional a la magnitud absoluta del cambio de metilación (|Δmetilación|), con un valor máximo observado de 0.3576.

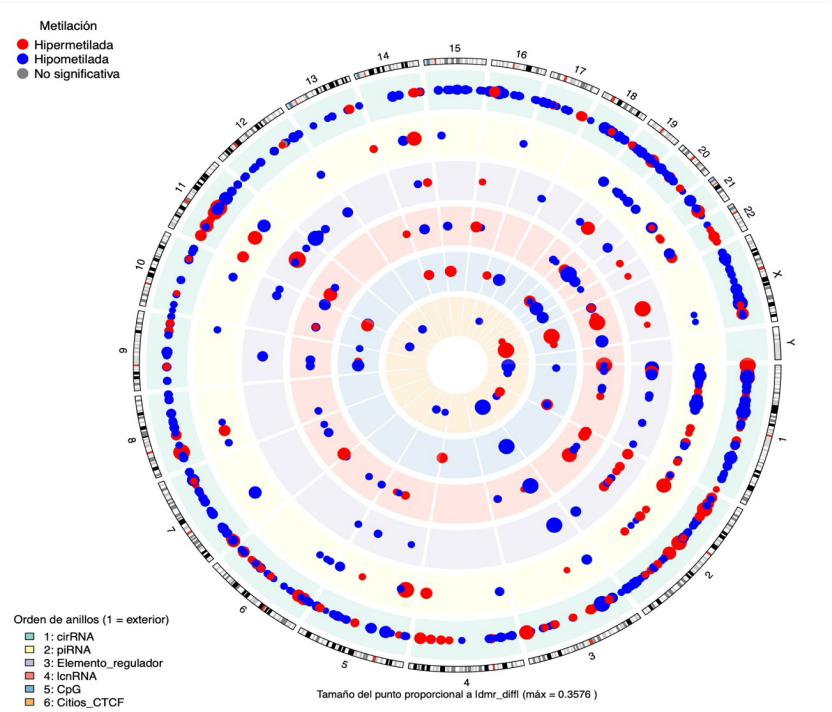


Figura 19. Paisaje de metilación diferencial en regiones reguladoras entre grupo 3 y grupo 4. Representa una distribución de regiones diferencialmente metiladas (DMRs) en distintos tipos de elementos reguladores. Los cromosomas se muestran en el anillo externo. Los anillos internos representan diferentes clases de regiones regulatorias en las que se detectaron DMRs: (1) circRNA, (2) piRNA, (3) elementos reguladores, (4) lncRNA, (5) islas CpG y (6) sitios de unión a CTCF. Cada punto corresponde a una región diferencialmente metilada. El color indica la dirección del cambio epigenético: rojo, hipermetilación; azul, hipometilación; gris, cambios no significativos. El tamaño del punto es proporcional a la magnitud absoluta del cambio de metilación (|Δmetilación|), con un valor máximo observado de 0.4351.

De igual manera se buscaron diversos elementos regulatorios dentro de las RDM, estos abarcan promotores y potenciadores (enhancers), Sitios CTCF, islas CpG, CircRNA, piwiRNA, lcnRNA, los cuales juegan un papel clave en la expresión transcripcional. De esta manera se analizó estas regiones ubicadas dentro de las RDM, entre el grupo 1 vs grupo 2 se identificaron 47 elementos reguladores, 183 sitios CTCF, 23 Islas CpG, 5,170 circRNA, 51 piRNA, 66 lcnRNA. Para las RDM entre los grupos 3 vs grupo 4 se identificaron 23 elementos reguladores, 21 sitios CTCF, 20 Islas CpG, 3,771 circRNA, 39 piRNA, 47 lcnRNA. Resumen en Figura 20. (Tabla Suplementaria 46-57, ANEXOS).

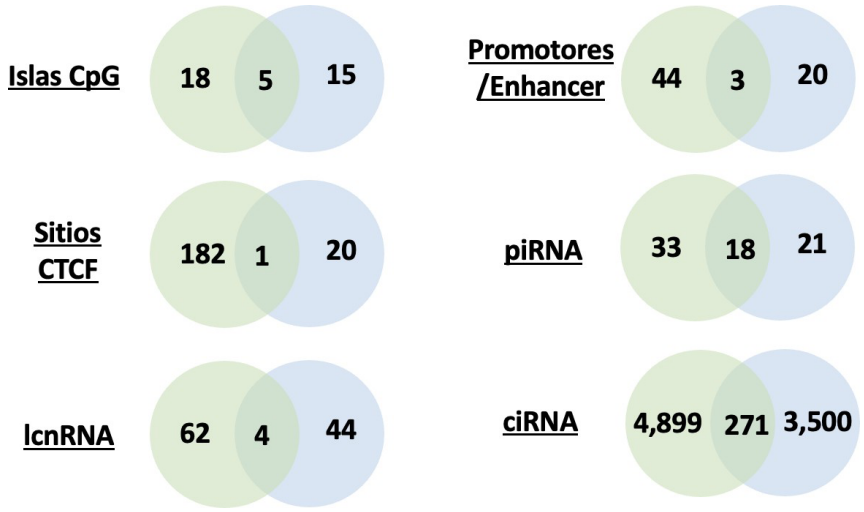


Figura 20. Comparativa de elementos reguladores entre Sinoviocitos y Linfocitos. Las filas corresponden a las categorías en sinoviocitos y las columnas a las categorías en linfocitos. Cada celda indica el número de elementos que pertenecen a la categoría de la fila en sinoviocitos y a la categoría de la columna en linfocitos. Los valores diagonales representan elementos que conservan la misma categoría en ambos tipos celulares, mientras que los valores fuera de la diagonal muestran cambios de clasificación entre sinoviocitos y linfocitos.

8.12 Selección de regiones candidatas

El análisis inicial del metiloma permitió identificar regiones diferencialmente metiladas en dos tipos celulares relevantes: sinoviocitos, con 1,457 RDM, y linfocitos, con 1,026 RDM. A partir de estas regiones, se realizó un filtrado enfocado

en elementos regulatorios funcionales del genoma, incluyendo islas CpG localizadas en promotores génicos, regiones promotoras/enhancer, sitios de unión para CTCF y regiones asociadas a ncRNAs, lo que redujo el conjunto a 52 regiones de interés.

Posteriormente, se aplicó un segundo criterio de selección basado en la relevancia biológica, priorizando regiones asociadas a genes involucrados en la respuesta inmunológica y procesos inflamatorios, lo que resultó en 32 regiones candidatas.

Finalmente, se evaluó la factibilidad técnica para su análisis mediante enzimas de restricción sensibles a metilación. De estas regiones, 25 presentaron sitios de restricción adecuados para el diseño del ensayo, mientras que 7 regiones fueron descartadas debido a la ausencia de sitios específicos que permitieran su evaluación mediante este enfoque enzimático (Figura 21).

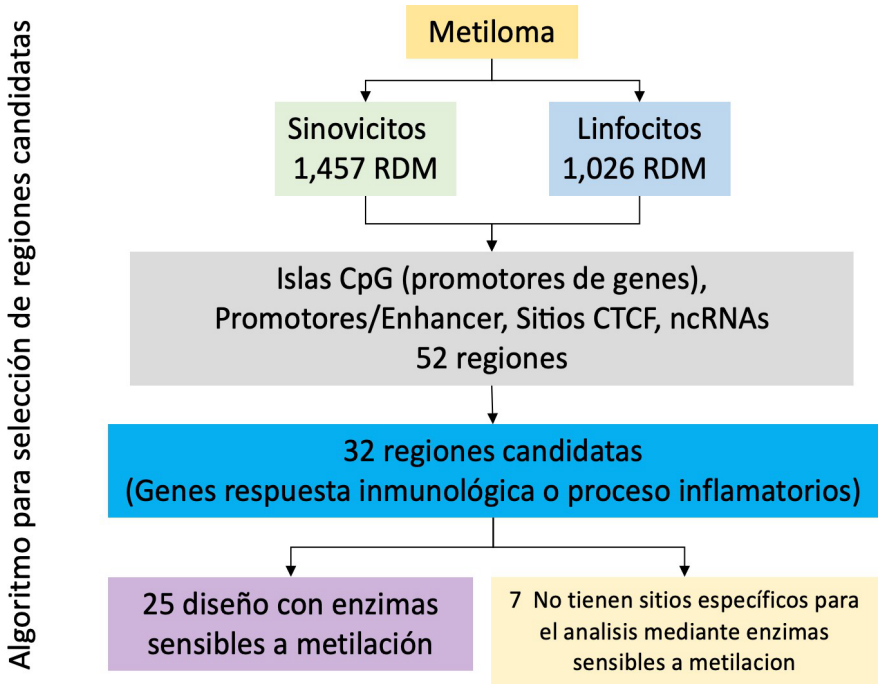


Figura 21: El flujo de selección de regiones candidatas diferencialmente metiladas (RDM) para su análisis posterior mediante enzimas sensibles a la metilación.

8.13 Características de la población de estudio y selección de muestras

De una cohorte de 193 pacientes con cuadro clínico sugerente de infección por VCHIK y confirmados mediante prueba molecular, cuyas muestras fueron recolectadas durante el periodo de marzo a junio de 2015, se seleccionaron 30 muestras de manera aleatoria para la realización de los ensayos de MS-qPCR.

La edad media de presentación fue de 40 años, la mediana de 42 años y el rango fue de 7 a 74 años. El 31.6% (61) de los pacientes fue de género masculino, mientras que el 68.4%

(132) fue femenino.

Las manifestaciones clínicas que se presentaron en los pacientes se describen a continuación: La manifestación clínica más frecuente fue fiebre (99.5%), seguida de cefalea (92.75%), escalofríos (91.7%); exantema, alteración del gusto, prurito, náuseas y artralgias se presentaron en más del 50% de los casos. (Figura 22).

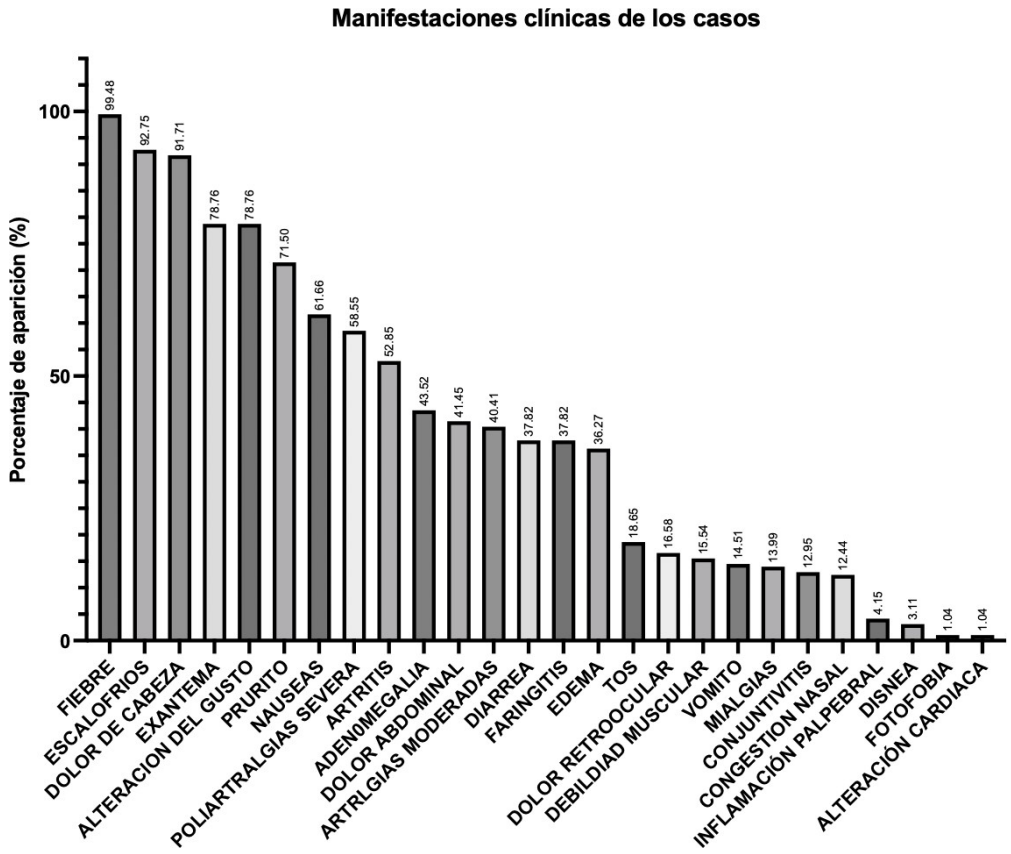


Figura 22. Manifestaciones clínicas de los casos. Tapachula Chiapas, México, mar-jun 2015.

Con el fin de establecer un grupo de referencia para el análisis de metilación, se incluyeron 10 individuos control que no presentaban antecedentes de exposición al virus. Los perfiles de metilación obtenidos en este grupo se utilizaron como base comparativa frente a las muestras analizadas mediante MS-qPCR en las regiones CpG candidatas.

8.14 Análisis comparativo de metilación en casos y controles

En el análisis comparativo de los niveles de metilación entre los grupos de estudio se observaron patrones diferenciados según el conjunto de marcadores evaluados. En el primer bloque de análisis, varios sitios CpG y genes mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, destacando GH0XJ068496, GH22J027789 con valores p significativos (Figura 23).

Por contraste, el segundo bloque de marcadores no evidenció variaciones significativas en los porcentajes de metilación entre ambos grupos. Genes como PRKCZ, ZFPM2 y diferentes sitios CpG (por ejemplo, CpG209, CpG1000 y CpG74) mostraron resultados consistentes con ausencia de diferencias, lo que indica que en estos loci la metilación no parece estar relacionada con la condición analizada (Figura 24).

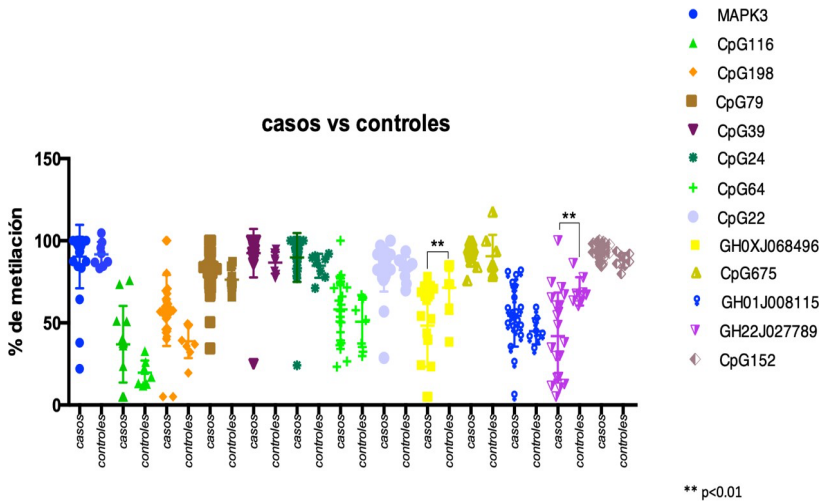


Figura 23. Comparación de los niveles de metilación entre casos y controles para el primer bloque de marcadores.

Se muestran los porcentajes de metilación en los sitios CpG y genes que presentaron diferencias estadísticamente significativas (**, $p < 0.01$). Los marcadores evaluados incluyen: MAPK3, CpG116, CpG198, CpG79, CpG39, CpG24, CpG64, CpG22, GH0XJ068496, CpG675, GH01J008115, GH22J027789 y CpG152. Las barras representan la media ± error estándar. Los valores de p fueron calculados mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

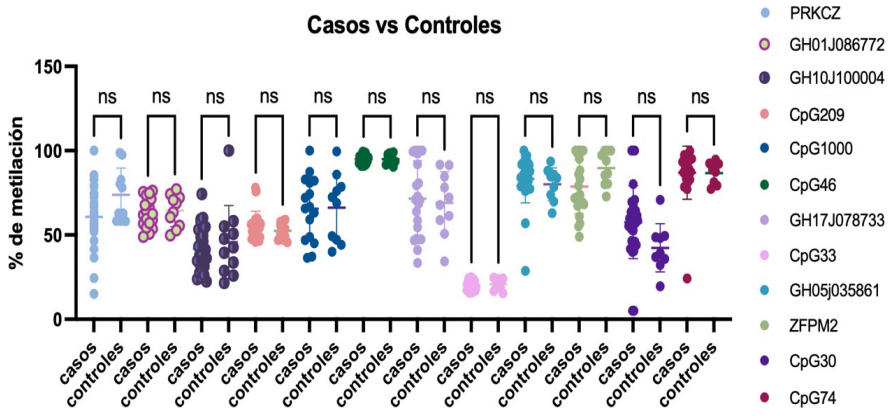


Figura 24: Comparación de los niveles de metilación entre casos y controles para el segundo bloque de marcadores. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los loci analizados, que incluyen: PRKCZ, GH01J086772, GH10J100004, CpG209, CpG1000, CpG46, GH17J078733, CpG33, GH05J035861, ZFPM2, CpG30 y CpG74. Los datos se presentan como media ± error estándar (ns: no significativo). La significancia se evaluó mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

8.15 Seguimiento clínico a largo plazo

La búsqueda de pacientes con artralgia persistente se realizó dentro de la cohorte correspondiente al año 2015. Se logró incluir en el estudio a 27 individuos con un seguimiento de ocho años posteriores a la infección por el VCHIK. De este grupo, 26 pacientes refirieron no presentar secuelas al momento de la evaluación, mientras que un paciente reportó episodios intermitentes de dolor articular. Sin embargo, en la valoración clínica mediante el índice DAS-28, dicho paciente mostró valores inferiores a 2.6, lo que corresponde a ausencia de actividad inflamatoria significativa. Figura 25.

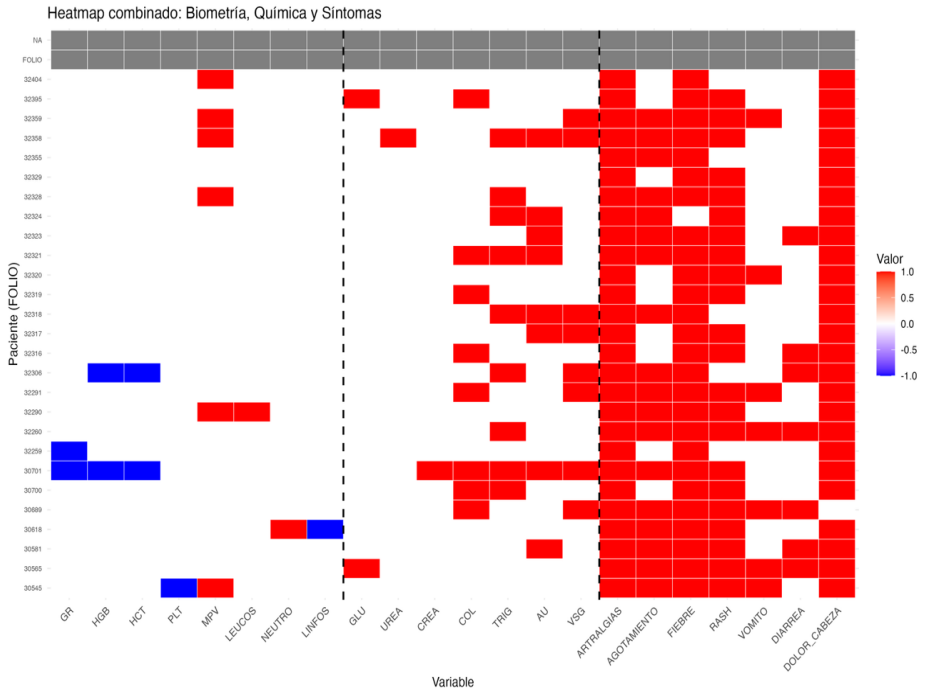


Figura 25. Heatmap combinado que integra parámetros de biometría hemática, química sanguínea y síntomas clínicos en pacientes de la cohorte de seguimiento. Cada fila corresponde a un paciente identificado por su folio, mientras que las columnas representan las variables analizadas. Las abreviaturas corresponden a: GR (glóbulos rojos), HGB (hemoglobina), HCT (hematocrito), PLT (plaquetas), MPV (volumen plaquetario medio), LEUCO (leucocitos), NEUTRO (neutrófilos), LINFOC (linfocitos), GLU (glucosa), UREA (urea), CREA (creatinina), COL (colesterol), TRIG (triglicéridos), AU (ácido úrico), NSG (neutrófilos segmentados). Los síntomas clínicos incluyen: ARTRALGIAS (dolor articular), AGOTAMIENTO, FIEBRE, RASH (exantema), VÓMITO, DIARREA y DOLOR_CABEZA. La escala de color indica la magnitud y dirección de los valores, donde tonos rojos reflejan valores altos, azules valores bajos y blancos valores normales.

En el análisis de los marcadores GHOXJ068496 y GH22J027789, se compararon los porcentajes de metilación entre el grupo de seguimiento y los controles. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, ya que los valores de metilación se mantuvieron en rangos similares. Esta ausencia de variación indica que, tras el periodo de seguimiento, los niveles de metilación en estos loci tienden a estabilizarse y se asemejan a los observados en individuos sin antecedente de infección. Figura 26.

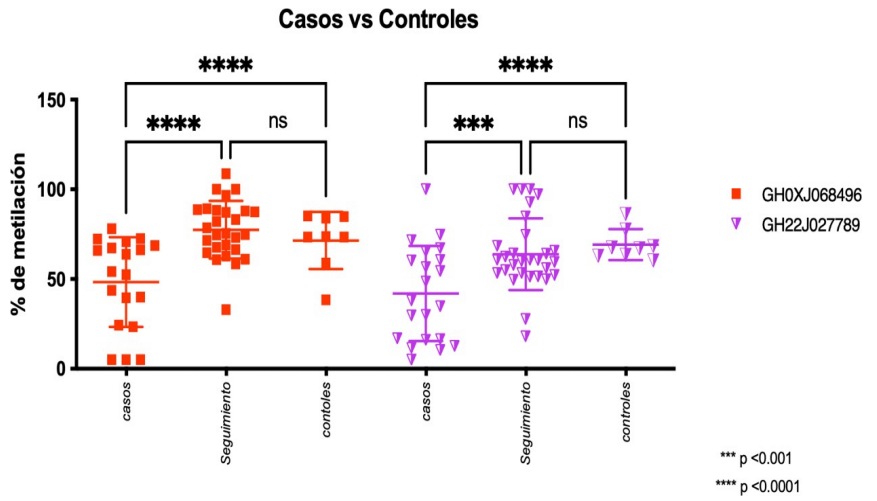


Figura 26. Comparación de los niveles de metilación de los marcadores GH0XJ068496 y GH22J027789 entre grupos de casos, seguimiento y controles. Se muestran los porcentajes de metilación para cada marcador en los tres grupos evaluados. Los casos (pacientes con infección aguda por VCHIK) presentaron diferencias altamente significativas en comparación con los controles (**** $p < 0.0001$ para GH0XJ068496; *** $p < 0.001$ para GH22J027789).Los datos se presentan como media ± error estándar. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

9. DISCUSIÓN

En este estudio, se propuso determinar el estado de metilación en cultivos de células humanas obtenidas de muestras infectadas con el VCHIK para explorar posibles cambios epigenéticos inducidos por la infección.

Para ello, se utilizaron cultivos primarios de sinoviocitos y linfocitos humanos. Inicialmente, se emplearon células Vero para la titulación viral mediante el ensayo de unidades formadoras de placas, se estableció un protocolo de infección de células Vero con sueros de pacientes positivos a VCHIK o con sobrenadantes de cultivos previamente infectados, con el objetivo de evaluar el efecto del virus en la morfología celular y obtener un inóculo con alta carga viral para su posterior análisis. Este ensayo reveló cambios morfológicos característicos de muerte celular en las células Vero expuestas al VCHIK, lo que sugiere una eficiente replicación viral. Este efecto citopático es consistente con estudios previos (Baer A, 2014) que han descrito la capacidad del VCHIK para inducir apoptosis y disrupción de la monocapa celular en líneas celulares susceptibles, se obtuvo un título de 7.25×10^8 PFU/ml en los sobrenadantes recuperados de los cultivos infectados. Posteriormente, se realizaron ensayos de multiplicidad de infección (MOI) en cultivos primarios de linfocitos y sinoviocitos con el objetivo de determinar la concentración viral óptima para evaluar la expresión de diferentes mecanismos epigenéticos. La selección de la MOI adecuada es un paso crucial en los estudios de infección viral, ya que permite garantizar una infección eficiente sin comprometer la viabilidad celular de manera significativa. Los resultados obtenidos muestran que, tras la infección con diferentes concentraciones virales (MOI de 100, 10, 5, 1, 0.1 y 0.01), la proliferación celular se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas a las 48 horas post-infección. Esto indica que, en este tiempo de incubación, el virus no induce una reducción drástica en la viabilidad celular, lo que es fundamental para los análisis posteriores de expresión génica. A partir de estos hallazgos, se seleccionaron las concentraciones de 10 y 100 MOI para continuar con los experimentos de expresión génica, ya que estas condiciones permitieron una adecuada infección sin comprometer la integridad celular.

Se realizó la evaluación del efecto del virus sobre distintos mecanismos epigenéticos mediante qPCR.

La evidencia sobre la modificación de mecanismos epigenéticos, como la biogénesis de miRNAs, la metilación del ADN y la modificación y regulación de la cromatina en el contexto de flavivirus y alfavirus, es un área de investigación emergente.

Los flavivirus, como el virus del dengue y el virus Zika, han mostrado influencias en los mecanismos epigenéticos. Estudios han identificado que la infección por flavivirus puede alterar la expresión de miRNAs, lo que afecta la regulación de la respuesta inmune del hospedador (Cecenarro et al. 2021). En particular, la biogénesis de miRNAs se ha relacionado con la regulación de la expresión génica, lo que puede influir en la patogénesis viral y en la respuesta inflamatoria (Nunes et al. 2023). Esto sugiere que los flavivirus pueden utilizar la biogénesis de miRNAs para evadir las defensas del hospedador, contribuyendo a la patogenicidad (Conceição et al. 2020).

El análisis de expresión de los cuatro mecanismos epigenéticos evaluados (metilación del ADN, biogénesis de miRNA, modificaciones de histonas y regulación de la cromatina) permitió identificar cambios significativos tras la infección con VCHIK, particularmente en genes asociados a la metilación del ADN. A las 72 horas post-infección, los resultados obtenidos mediante la representación en mapas de calor (heatmaps) mostraron una marcada sobreexpresión de genes clave en este mecanismo, destacando *DNMT3B* y *DNMT3L*, que participan en la metilación de novo, así como la familia de genes MBD, que desempeñan un papel crucial en la represión transcripcional y el silenciamiento génico. Estos hallazgos sugieren que la infección por VCHIK podría inducir cambios en la metilación del ADN como un posible mecanismo de regulación viral. En cuanto a la metilación del ADN, se ha observado que los flavivirus pueden inducir cambios en el patrón de metilación del ADN en células infectadas. La metilación del ADN puede regular la expresión de genes clave para la respuesta inmune, y alteraciones en este proceso podrían tener un impacto

significativo en la capacidad del sistema inmunológico para controlar la infección viral (Molero 2023; Rivero 2018). También se ha asociado la metilación del ADN con la regulación de la inflamación en respuesta a la infección por flavivirus, lo que puede tener implicaciones para el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Guillén 2023).

Por otro lado, en el proceso de biogénesis de miRNA se observó una actividad constante en la mayoría de los genes analizados, tanto en los cultivos infectados como en los controles sin infección. Esto podría indicar que el virus no induce una regulación diferencial significativa en este mecanismo, sino que mantiene un perfil de expresión similar al de las células no infectadas, posiblemente como una estrategia para favorecer su replicación sin activar una respuesta antiviral evidente. En particular, la biogénesis de miRNAs se ha relacionado con la regulación de la expresión génica, lo que puede influir en la patogénesis viral y en la respuesta inflamatoria (Nunes et al. 2023). Esto sugiere que los flavivirus pueden utilizar la biogénesis de miRNAs para evadir las defensas del hospedador, contribuyendo a la patogenicidad (Conceição et al. 2020).

En contraste, en los mecanismos de modificaciones de histonas y regulación de la cromatina no se identificaron cambios sustanciales en la mayoría de los genes evaluados. Esto sugiere que, al menos en las primeras 72 horas post-infección, el impacto del VCHIK sobre estos procesos es limitado o bien que su efecto podría depender de otros factores celulares o de tiempos de infección más prolongados.

En el caso de los alfavirus, como el VCHIK, se ha documentado la influencia de estos virus en la regulación de la cromatina y las modificaciones post-traduccionales de histonas. La infección por alfavirus puede inducir la acetilación y metilación de histonas, alterando la estructura de la cromatina y, por ende, la expresión génica de los factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune (Cavagnari 2012; Álvarez-Moran y Ávila-Sánchez 2019). Estas modificaciones pueden desempeñar un papel crucial en la manera en que el virus se replica y se propaga, así como en la respuesta inmune del hospedador

(Casanello et al. 2015).

En resumen, tanto los flavivirus como los alfavirus tienen la capacidad de modificar mecanismos epigenéticos, incluyendo la biogénesis de miRNAs, la metilación del ADN y las modificaciones de la cromatina. Esta interacción entre el virus y los mecanismos epigenéticos del hospedador no solo contribuye a la patogénesis viral, sino que también puede influir en la respuesta inmune y en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la infección viral. En conjunto, estos resultados refuerzan la hipótesis de que el VCHIK podría modular la metilación del ADN como una estrategia para alterar la expresión génica del hospedero, y la homeostasis celular; posiblemente facilitando su replicación y persistencia en las células infectadas o estar relacionada al desarrollo de complicaciones crónicas asociadas al VCHIK, como la artritis persistente.

Con los cultivos de sinoviocitos y linfocitos post-infección, se realizó un análisis de metilación en todo el genoma, con el cual se generaron aproximadamente 15 Gb de bases limpias tras el filtrado de lecturas de baja calidad, lo que garantizó la fiabilidad de los datos analizados, la búsqueda bioinformática de regiones metiladas en cultivos infectados con VCHIK permitió identificar cambios en el perfil de metilación del ADN a las 48 y 72 horas post-infección.

El alineamiento de las lecturas con el genoma de referencia (hg38) mediante BSMAP mostró una adecuada tasa de mapeo, lo que sugiere que la secuenciación se realizó con una cobertura suficiente para detectar cambios en los patrones de metilación. La distribución de la profundidad de secuenciación indica que los datos obtenidos están bien proporcionados y permiten un análisis detallado de la metilación en el genoma.

El análisis de los distintos contextos de metilación de citosina (CG, CHG y CHH) mostró que la cobertura efectiva de cada tipo de elemento varía en un rango del 0% al 100%. En particular, la disminución progresiva observada en la figura 11 sugiere que la profundidad de secuenciación efectiva de la citosina se mantiene

dentro de los rangos esperados para este tipo de estudios.

Dado que la metilación del ADN juega un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y en la modulación de la respuesta inmune, los resultados obtenidos en este estudio podrían estar relacionados con procesos de evasión viral o alteraciones en la inmunomodulación inducidas por la infección con VCHIK. La evidencia sobre la modificación de la metilación del ADN en infecciones por alfavirus ha comenzado a emerger, aunque la investigación específica en esta área está aún en etapas iniciales. Sin embargo, se ha demostrado que la metilación del ADN puede jugar un papel crucial en la respuesta a las infecciones virales, y estudios sugieren que algunos virus modulan la metilación del ADN en genes clave del sistema inmune para facilitar su replicación y evitar la detección por parte del hospedero (Kuss et al. 2018).

Un estudio relevante es el de Nakano et al. Del 2013, que ilustra cómo se establece un perfil de metilación diverso en sinoviocitos afectados por la artritis reumatoide. Este estudio proporciona información significativa sobre cómo las infecciones pueden repercutir en la metilación del ADN en células específicas, revelando que las alteraciones en la metilación podrían influir en la expresión génica, afectando así las funciones celulares de los sinoviocitos (Rowles et al. 2015).

Los flavivirus, como el virus del Zika, han demostrado una capacidad notable para interferir con la biogénesis de miRNAs en células infectadas, contribuyendo potencialmente a su replicación y patogénesis. Por ejemplo, se ha encontrado que el virus del Oeste de Nilo (WNV) codifica un pequeño RNA similar a miRNA en su región no traducida 3', que regula la expresión de *GATA4* y facilita la replicación viral en células de mosquito (Hussain et al. 2011). Esto indica que los flavivirus pueden explotar mecanismos similares a los miRNAs para manipular la respuesta celular, favoreciendo así su propia replicación.

Además, la investigación ha demostrado que los flavivirus pueden alterar no solo la expresión de miRNAs, sino también afectar la biogénesis de organelos como los

peroxisomas. Se ha observado que las proteínas de cápside de los flavivirus se unen a factores de biogénesis peroxosomal como *PEX19*, lo que impide la formación adecuada de peroxisomas y puede debilitar la respuesta antiviral del huésped (Farelo et al. 2022; You et al. 2015). Este mecanismo se considera crucial, ya que la disminución de peroxisomas puede llevar a un aumento de la susceptibilidad a la infección.

La metilación del ADN también se ha implicado en la alteración de la regulación de los genes en infecciones por flavivirus. La investigación sugiere que el impacto del virus del dengue sobre los procesos epigenéticos del huésped puede contribuir a su patogénesis y a la progresión de enfermedades asociadas (Bavia et al. 2016). En este sentido, el análisis de los ARN subgenómicos y la presencia de miRNAs asociados muestra un panorama de cómo el virus altera la expresión genética del hospedador en favor de su replicación (Bavia et al. 2016; Ci et al. 2019).

Whitaker et al. En el 2013 también ha señalado la relevancia de la metilación en sinoviocitos de artritis reumatoide, destacando patrones distintivos de hipermetilación e hipometilación en hasta 2000 sitios CpG localizados en más de 1200 genes (Whitaker et al. 2013). Este tipo de modificación se ha identificado como un potencial mecanismo para la progresión de enfermedades autoinmunes, lo que implica que mecanismos similares podrían ser observados en infecciones virales donde se alteran las respuestas inmunitarias.

En el contexto de los alfavirus, se ha demostrado que regulan la expresión de proteínas que podrían influir en la metilación del ADN. Por ejemplo, el VCHIK, un alfavirus conocido, se ha observado que induce respuestas inflamatorias que podrían desencadenar modificaciones epigenéticas, incluyendo la metilación del ADN (Nakano et al. 2013). Aunque esta área de investigación está en desarrollo, se necesitan más estudios específicos para comprender mejor cómo los alfavirus afectan explícitamente los patrones de metilación del ADN en las células hospedadoras.

Además, el análisis de la metilación del ADN en contextos de infección por otros

virus ha suscitado un interés particular. Virus como el herpes simple (HSV) y el citomegalovirus (CMV) han sido estudiados por su capacidad de modificar el perfil de metilación de las células hospedadoras. Estos cambios son considerados estrategias del virus para evadir el sistema inmune y facilitar la replicación viral (Lewis et al. 2022; Cliffe et al. 2013). Aunque la investigación se ha centrado en otros virus, esto sugiere que los mecanismos de modificación de la metilación del ADN podrían ser un fenómeno común en una amplia gama de infecciones virales, incluidos los alfavirus.

El análisis del paisaje genómico reveló que las características genómicas presentan patrones de metilación distintos, lo que sugiere su participación en funciones de regulación diferencial. La representación en mapas de calor permitió visualizar la distribución del nivel de metilación en relación con la densidad de dinucleótidos CpG, proporcionando una visión global de cómo la metilación del ADN varía en función de la estructura genómica.

La densidad de CpG, medida en ventanas de 200 pb, mostró una distribución heterogénea a lo largo del genoma, con regiones que presentan una alta concentración de estos dinucleótidos y otras donde son escasos. Esta variabilidad es esperada, dado que las islas CpG, regiones tradicionalmente ricas en estos motivos, tienden a localizarse en promotores génicos y estar menos metiladas en genes activos, mientras que regiones con baja densidad de CpG suelen estar más metiladas y asociadas con represión transcripcional.

El gradiente de color rojo en los mapas de calor reflejó la abundancia de CpG en función de su nivel de metilación y densidad, evidenciando que la metilación del ADN sigue patrones específicos según la región genómica analizada. Además, las líneas negras que representan los niveles medios de metilación indican que existe una relación entre la densidad local de CpG y la probabilidad de metilación, lo que coincide con estudios previos que han demostrado que la metilación es más frecuente en regiones con baja densidad de CpG fuera de las islas CpG.

Los gráficos de barras azules y verdes proporcionaron una visión complementaria

sobre la distribución de las densidades de CpG y los niveles de metilación, respectivamente. La proyección de estas distribuciones sobre los ejes del mapa de calor permitió identificar regiones con perfiles de metilación más homogéneos y otras con mayor variabilidad, lo que sugiere que la metilación del ADN puede estar influenciada tanto por la estructura genómica local como por procesos reguladores específicos.

Estos resultados refuerzan la idea de que la metilación del ADN es un mecanismo epigenético altamente organizado que varía en función de la densidad de CpG y su localización en el genoma. Futuros estudios podrían centrarse en correlacionar estos patrones de metilación con la expresión génica y la actividad transcripcional en distintos contextos celulares y condiciones fisiopatológicas, lo que permitiría una mejor comprensión del impacto de la metilación en la regulación génica y la estabilidad del genoma.

Los alfavirus, pertenecientes a la familia Togaviridae, están involucrados en interacciones significativas con los mecanismos epigenéticos del hospedador, como la biogénesis de miRNAs, la metilación del ADN y la regulación de la cromatina. Esta capacidad de interferir en la maquinaria epigenética del hospedador no solo afecta la replicación viral, sino que también puede tener repercusiones severas en la salud del huésped (de Aguiar et al. 2019).

Los alfavirus han demostrado ser capaces de modular la biogénesis de miRNAs en el hospedador. Por ejemplo, el virus Sindbis, un alfavirus conocido, ha sido reportado como capaz de impactar en la biogénesis de miRNAs independientemente de la Dicer canónica, sugiriendo que pueden tener su propia maquinaria integrada en su ciclo vital (Hussain et al. 2011). Esto implica que los alfavirus no solo utilizan las rutas del hospedador, sino que también pueden influir en la expresión génica a su favor y suprimir la respuesta inmune del huésped (Rouha et al. 2010).

Por otro lado, se ha identificado que el alelo de la proteína no estructural NS4B del virus del dengue actúa como un potente supresor del ARN interferente, lo que

resalta un mecanismo específico por el cual los flavivirus, que incluyen algunos alfavirus, pueden disminuir la actividad de la maquinaria de ARN del hospedador y evadir una respuesta inmunitaria eficaz. Esta supresión de miRNAs también ha sido observada en el contexto de la infección por dengue, donde se ha reportado una reducción en la expresión de componentes clave de la maquinaria de ARN en células humanas infectadas por virus del dengue (Kakumani et al. 2013; Casseb et al. 2016).

La regulación de la cromatina también se ve afectada por la infección por alfavirus. Investigaciones han indicado que las interacciones entre proteínas virales y reguladores epigenéticos del hospedador pueden alterar la estructura de la cromatina. Por ejemplo, el virus Sindbis induce cambios en la estructura de la cromatina al interactuar con proteínas estructurales y modificadoras de la cromatina, lo que afecta la expresión de genes que pueden facilitar la replicación viral (Campbell et al. 2013). Se ha sugerido que las perturbaciones en la metilación del ADN y en las modificaciones de histonas durante las infecciones por alfavirus son fundamentales para la regulación de la respuesta inmune y la persistencia viral (Avila-Bonilla y Salas-Benito 2022).

La evidencia sobre la modificación de la metilación del ADN durante la infección por alfavirus es limitada, pero algunos estudios han comenzado a explorar cómo la infección viral puede influir en los mecanismos epigenéticos del hospedador. Los alfavirus manipulan las respuestas celulares, incluidas las modificaciones epigenéticas, para facilitar su replicación y el establecimiento de infecciones.

Un estudio relevante es el de Dai et al. En el 2022 investigó la modificación de N6-metiladenosina en la transcripción del mosquito *Aedes aegypti* y cómo esta se altera durante la infección por el virus del dengue (Dai et al. 2022). Aunque el dengue es un flavivirus, este trabajo proporciona información sobre cómo diferentes virus pueden influir en la maquinaria celular responsable de la metilación y, potencialmente, la metilación del ADN en células hospedadoras. Así, se muestra que las proteínas de metilación, como *METTL3* y *METTL14*, afectan la replicación del virus, sugiriendo una conexión entre la metilación del

ARN y la respuesta antiviral de hospedadores.

Por otro lado, la regulación de los mRNAs durante una infección viral también puede influir en la metilación del ADN. El estudio de Bhattacharya et al. En el 2022 indica que la metilación puede diferir entre las interacciones virales y los hospedadores, sugiriendo que la inhibición de ciertas metilasas, como *DNMT2*, podría ser un enfoque para controlar infecciones virales en artrópodos colonizados por *Wolbachia* (Bhattacharya et al. 2022). Este estudio, aunque centrado en flavivirus, ayuda a entender cómo los mecanismos de metilación pueden cambiar durante infecciones por alfavirus.

Además, el impacto de la metilación del ARN en la replicación viral ha sido objeto de estudio. Este trabajo ha revelado que la modificación de la metilación de ARN puede influir en la interacción viral y la regulación del hospedador, lo que indica que la metilación de ARN puede tener implicaciones más amplias para la replicación de virus, incluidos los alfavirus (Bhattacharya et al. 2021). La información proviene de investigaciones que examinan cómo las modificaciones en la metilación afectan los ciclos de replicación viral.

El estudio de Kim et al. En el 2020 sobre el receptor *Mxra8* y su resistencia a la infección sugiere que los factores epigenéticos pueden influir indirectamente en el proceso de infección por alfavirus, lo que indica que pueden ocurrir modificaciones en los mecanismos epigenéticos durante el proceso infectivo (Kim et al. 2020). Esto refuerza la idea de que la regulación epigenética, incluida la metilación del ADN, puede jugar un papel relevante en cómo los alfavirus establecen infecciones persistentes.

El análisis bioinformático de regiones diferencialmente metiladas (RDM) en células de sinoviocitos y linfocitos infectados con VCHIK permitió identificar múltiples cambios epigenéticos asociados a la infección viral. En total, se detectaron 1,457 RDM en sinoviocitos infectados en comparación con los controles no infectados, mientras que en linfocitos se encontraron 1,016 RDM. Estos resultados sugieren que el virus puede inducir alteraciones en la metilación

del ADN en diferentes tipos celulares, lo que podría influir en la regulación.

El análisis de la distribución de los contextos de metilación (mCG, mCHG y mCHH) reveló una mayor presencia de RDM en el contexto mCHH, seguido por mCG y mCHG, tanto en sinoviocitos como en linfocitos. Estos hallazgos son relevantes, ya que la metilación en contextos no CG se ha asociado con procesos de plasticidad epigenética y regulación transcripcional en respuesta a estímulos externos, incluyendo infecciones virales. Además, el análisis de la longitud de las RDM en cada cromosoma mostró que el cromosoma 1 presentó las regiones metiladas más largas en sinoviocitos, mientras que en linfocitos se observaron diferencias en la localización de los patrones de metilación más extensos, con mCG y mCHH en el cromosoma 1 y mCHG en el cromosoma 2. Esta variabilidad podría estar relacionada con la densidad génica, la presencia de transposones y otros elementos reguladores en cada cromosoma.

El análisis de genes diferencialmente metilados (GDM) dentro de las RDM identificó 472 GDM en la comparativa grupo 1 vs. grupo 2, y 324 GDM en la comparativa grupo 3 vs. grupo 4. El enriquecimiento funcional de estos genes a través de bases de datos como KEGG, Reactome y WikiPathways permitió vincularlos con vías de señalización clave en la respuesta inmune y en la infección viral, incluyendo:

- Ciclo de la GTPasa CDC42
- Señalización por Rho GTPasas
- Vía de reparación de errores de alineamiento
- Ciclo de la GTPasa RAC2

Estos resultados sugieren que la infección por VCHIK puede modular la metilación del ADN en dos tipos celulares clave en la patogenia de la enfermedad: los sinoviocitos y los linfocitos. En particular, el análisis de genes diferencialmente metilados (GDM) reveló que las vías de señalización por Rho GTPasas, incluida la ruta de la GTPasa CDC42 y la señalización por RAC2, se encuentran significativamente enriquecidas en las RDM tanto en sinoviocitos como

en linfocitos infectados. Este hallazgo es de gran relevancia, ya que las Rho GTPasas son reguladores centrales del citoesqueleto de actina, de la endocitosis, de la migración celular y de la respuesta inflamatoria. Diversos estudios han demostrado que virus como el chikungunya, el dengue y otros alfavirus utilizan la maquinaria de endocitosis mediada por CDC42 y RAC2 para ingresar a las células hospedadoras (Zamudio-Meza, et al. 2009; van Duijl-Richter et al. 2015). La metilación anómala de genes que controlan estas GTPasas podría representar un mecanismo epigenético de retroalimentación del hospedero para modular la entrada viral o, por el contrario, una estrategia viral para silenciar la respuesta antiviral.

Asimismo, el análisis de elementos reguladores dentro de las RDM reveló la presencia de promotores, potenciadores (enhancers), sitios de unión CTCF, islas CpG, y diversas moléculas de ARN no codificante, como circRNA, piRNA y lncRNA, todos ellos con un papel clave en la regulación de la expresión génica. Se identificaron 47 elementos reguladores en la comparación grupo 1 vs. grupo 2 y 23 en grupo 3 vs. grupo 4, además de un número considerable de circRNA (5,170 y 3,771, respectivamente), piRNA (51 y 39) y lncRNA (66 y 47).

Un aspecto novedoso de nuestro trabajo es precisamente la integración del paisaje de metilación diferencial en estos elementos reguladores no codificantes. En sinoviocitos se identificaron 5,170 circRNA, 66 lncRNA y 51 piRNA diferencialmente metilados, mientras que en linfocitos las cifras fueron de 3,771 circRNA, 47 lncRNA y 39 piRNA, respectivamente, lo que coincide con los valores obtenidos en el análisis comparativo de grupos. Los circRNA y lncRNA están emergiendo como reguladores críticos de la respuesta inmune innata, actuando como esponjas de miRNA o modulando la estabilidad del mRNA (Chen et al. 2017). Los piRNA, tradicionalmente asociados al silenciamiento de transposones en la línea germinal, han comenzado a reconocerse como actores emergentes en células somáticas durante la infección viral, donde pueden regular la expresión génica post-transcripcionalmente (Wang et al. 2023). La hipometilación predominante observada en estos elementos (puntos azules en figuras 18 y 19) sugiere una pérdida global de metilación que podría desreprimir

la expresión de estos ARN no codificantes, alterando redes regulatorias antivirales. Por ejemplo, se ha descrito que multiples circRNA actúan como supresores de la respuesta inflamatoria en artritis reumatoide (Li et al. 2022), una enfermedad que comparte características fisiopatológicas con la artritis crónica post-chikungunya. Nuestros resultados abren la hipótesis de que la metilación diferencial de circRNA y piRNA en sinoviocitos podría contribuir a la persistencia de la artralgia en pacientes infectados con VCHIK. Cabe resaltar, que los hallazgos de nuestro trabajo requieren de una validación más exhaustiva mediante estudios funcionales y en cohortes independientes para establecer su relevancia clínica.

El análisis funcional mediante enriquecimiento de vías KEGG y Reactome también identificó otras vías relevantes, aunque con menor significancia, como la señalización por el receptor de quimiocinas y la regulación del citoesqueleto mediada por Rho. Es llamativo que no se observara un enriquecimiento significativo de vías clásicas de respuesta antiviral como RIG-I-like receptor signaling o la producción de interferón. Sin embargo, al examinar las regiones reguladoras (promotores y enhancers) asociadas a las RDM identificadas en sinoviocitos y linfocitos infectados, se encontró una elevada frecuencia de sitios de unión para factores de transcripción clave en la inmunidad antiviral, incluyendo miembros de la familia *IRF (IRF2, IRF3, IRF4, IRF9), STAT (STAT1, STAT3, STAT5A), NF-κB (RELB, NFKBIZ, NFATC3),* así como modificadores epigenéticos como *EP300, HDAC2, KDM1A* y proteínas *TRIM* con actividad antiviral (*TRIM22, TRIM24, TRIM28*). Por ejemplo, la región GH01J016611 (clasificada como enhancer elite) contiene 177 sitios de unión para factores de transcripción, incluyendo *SP1, TRIM22, ELF1, BHLHE40, ZBTB33, IKZF1, CTCF, DPF2, ARNT y MLLT1*, entre otros. La presencia de estos motivos en regiones diferencialmente metiladas sugiere que, aunque los genes efectores de la respuesta de interferón no aparecen como diferencialmente metilados a nivel global, la metilación anómala de elementos reguladores podría estar modulando finamente la accesibilidad de estos factores de transcripción a sus dianas, alterando así la cinética o magnitud de la respuesta antiviral. Esta hipótesis se ve

reforzada por la identificación de regiones reguladoras diferencialmente metiladas en elementos no codificantes como circRNA (5,170 en sinoviocitos; 3,771 en linfocitos) y piRNA (51 y 39, respectivamente), los cuales también contienen motivos de unión para estos FT, apoya la idea de una capa regulatoria no codificante que modula la respuesta inmune postranscripcional, un hallazgo que coincide con literatura reciente sobre la función de circRNA y piRNA en respuestas inmunes (Sajjad et al. 2021; Pekáčová et al. 2022). Por lo tanto, la ausencia de enriquecimiento de vías clásicas podría deberse a que los cambios en metilación afectan predominantemente a regiones regulatorias no codificantes y a genes moduladores tempranos (como las Rho GTPasas) en lugar de a los efectores finales de la respuesta inmune, o bien a que las ventanas de tiempo analizadas (48 y 72 horas post-infección) corresponden a una fase en la que la respuesta aguda ya ha sido controlada y el virus ha establecido una infección persistente de bajo grado. De hecho, estudios en modelos animales de artritis por chikungunya han demostrado que el ARN viral puede persistir en articulaciones durante meses, manteniendo una activación crónica de la vía de RhoA/ROCK, la cual está aguas abajo de CDC42 (Dhanwani et al, 2014).

Nuestros hallazgos sobre la presencia de sitios de unión para factores de transcripción como *TRIM22, IRF2/3/9 y STAT1/3* en regiones diferencialmente metiladas son consistentes con estudios previos que demuestran el papel de estos factores en el control epigenético de la infección viral. Por ejemplo, se ha descrito que *TRIM22* restringe la replicación del virus herpes simple tipo 1 mediante el silenciamiento epigenético de genes virales tempranos, actuando como un efector de los interferones tipo I (Reddi et al. 2021; Pagani et al. 2021). En este contexto, la metilación anómala de los enhancers que contienen motivos de unión para *TRIM22* podría comprometer su capacidad para reclutar complejos represivos de cromatina, favoreciendo así la persistencia del VCHIK. Por otro lado, la presencia de sitios de unión para CTCF y SP1 en regiones como GH01J016611 sugiere una posible regulación de la arquitectura cromatínica, ya que se ha demostrado que CTCF organiza dominios topológicos asociados a islas CpG y que su unión puede ser bloqueada por la metilación del ADN (Monteagudo-Sánchez et al. 2024). Un

mecanismo particularmente relevante es el descrito para el factor de transcripción BZLF1 del virus Epstein-Barr, que es capaz de unirse específicamente a secuencias metiladas y revertir el silenciamiento epigenético, reactivando la transcripción viral (Wille et al. 2013). Aunque no identificamos directamente homólogos de BZLF1 en nuestras regiones reguladoras, la alta densidad de sitios de unión para factores de transcripción con dedos de zinc (*ZNF592, ZNF217, ZNF639*, etc.) y para proteínas de la familia *MBD (MBD1, MBD2*) sugiere que el VCHIK podría explotar mecanismos similares de lectura del metiloma para modular la expresión génica del hospedero a su favor. En conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que la reprogramación del metiloma inducida por el VCHIK no solo afecta a vías efectoras clásicas, sino que también altera la accesibilidad de factores de transcripción clave para el establecimiento de la persistencia viral y la cronicidad de la artritis.

La selección de regiones candidatas a partir del metiloma fue un paso crucial para vincular hallazgos epigenómicos con procesos biológicos relevantes. El análisis inicial identificó 1,457 RDM en sinoviocitos y 1,026 en linfocitos, reflejando una amplia remodelación epigenética. Mediante un filtrado funcional centrado en islas CpG, promotores, enhancers, sitios CTCF y ncRNAs, el conjunto se redujo a 52 regiones, lo que fortalece la interpretación biológica y evita la dispersión de resultados.

La priorización basada en relevancia biológica permitió enfocar el análisis en 32 regiones asociadas a genes de respuesta inmunológica e inflamatoria, un criterio clave en enfermedades post-virales donde la regulación epigenética puede influir en la cronicidad de los síntomas. Finalmente, la viabilidad técnica mediante enzimas de restricción sensibles a metilación redujo el conjunto a 25 regiones aptas para validación experimental, excluyendo siete por falta de sitios de restricción.

Los hallazgos epidemiológicos de esta cohorte de 193 pacientes con infección confirmada por VCHIK en Tapachula, Chiapas, durante el brote de 2015, se alinean con las tendencias reportadas en México y en la región de las Américas. La media de edad de presentación fue de 40 años, con un rango de 7 a 74 años. Esta distribución es consistente con lo documentado a nivel nacional, donde se ha señalado que la infección afecta predominantemente a adultos jóvenes, con una afectación significativa en menores de 20 años (28 %) y en el grupo de 45 a 64 años (Rojas et al. 2018). El predominio del sexo femenino (68.4 %) observado en nuestro estudio coincide con múltiples reportes epidemiológicos en México y Latinoamérica, donde se ha documentado consistentemente una mayor proporción de casos en mujeres (aproximadamente dos tercios) (Garay-Morán et al. 2017). Esta diferencia ha sido atribuida a factores conductuales y ocupacionales que podrían incrementar la exposición femenina a los vectores Aedes aegypti y Aedes albopictus, más que a una susceptibilidad biológica intrínseca.

Las manifestaciones clínicas registradas en esta cohorte reflejan el espectro clásico de la infección aguda por VCHIK. La fiebre fue prácticamente universal (99.5 %), seguida de cefalea (92.8 %), escalofríos (91.7 %) y exantema (78.8 %). La frecuencia de artralgias (52.9 % de poliartralgias y 37.8 % de artralgias moderadas) se sitúa dentro del rango reportado en la literatura (70–100 %), aunque ligeramente por debajo de lo descrito en la caracterización nacional (73.5–72.6 % para artralgias leves y graves) (Garay-Morán et al. 2017). El elevado porcentaje de exantema en nuestra serie contrasta con lo notificado en el estudio nacional (58 %) (Garay-Morán et al. 2017), y podría reflejar diferencias en la captación clínica o variaciones geográficas en la presentación fenotípica del virus. Es importante señalar que el brote de 2015 en México ocurrió en un contexto de circulación simultánea de otros arbovirus (dengue y Zika) (Araúz et al. 2016), lo cual pudo haber influido en el espectro clínico observado.

La confirmación molecular mediante prueba de ácidos nucleicos constituye un

punto fuerte de nuestro estudio, ya que asegura la inclusión exclusiva de casos confirmados por laboratorio. La RT-PCR en tiempo real es considerada el estándar de oro para el diagnóstico durante la fase aguda de la infección, con alta sensibilidad y especificidad (Sajith et al. 2025). En nuestro contexto, la confirmación molecular fue particularmente relevante debido a la superposición clínica con dengue y Zika, que puede llevar a diagnósticos erróneos si se basa únicamente en criterios clínico-epidemiológicos.

La inclusión de 10 individuos control sin antecedentes de exposición al virus constituye un elemento metodológico esencial para el análisis de metilación. Estudios previos en infecciones virales han demostrado que la infección aguda puede inducir cambios persistentes en el metiloma, y la comparación con un grupo control no expuesto permite discernir las alteraciones epigenéticas específicamente asociadas a la infección (Balnis et al. 2022). En el contexto del chikungunya crónico, investigaciones recientes han incorporado grupos control de individuos recuperados para identificar firmas transcripcionales y epigenéticas asociadas a la cronicidad (Gérardin et al. 2025). La inclusión de controles en nuestro diseño, por tanto, proporciona una línea basal adecuada para la interpretación de los hallazgos de metilación en las regiones candidatas.

El análisis comparativo de los niveles de metilación entre pacientes con infección aguda por VCHIK y controles sanos reveló un patrón diferencial altamente específico. De todos los marcadores evaluados mediante MS-qPCR, un grupo de loci mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre casos y controles (GH22J027789 - GH0XJ068496), mientras que el resto no evidenció variaciones significativas. Por lo tanto, el hallazgo central es que la infección aguda por VCHIK induce cambios de metilación no generalizados, sino restringidos a regiones genómicas particulares con potencial relevancia funcional. Este patrón es consistente con estudios previos en infecciones por otros virus, donde la reprogramación epigenética suele afectar a loci específicos involucrados

en la respuesta inmune y la señalización inflamatoria, en lugar de inducir una hipo o hipermetilación global del genoma (Paschos et al. 2010).

Dos regiones reguladoras, GH22J027789 y GH0XJ068496 (ambas clasificadas como promotor/enhancer), mostraron una hipermetilación significativa en los casos agudos en comparación con los controles. Ambas regiones son ricas en sitios de unión para factores de transcripción clave, lo que sugiere que su estado de metilación podría modular la accesibilidad de la cromatina y, en consecuencia, la expresión de genes adyacentes o diana.

La región GH22J027789 contiene 37 sitios de unión para factores de transcripción, entre los que destacan KLF17, ZIC2, ZNF600, TCF12, PRDM6, PRDM4, GLIS1, ZNF366, KLF10, BCL11A, KLF8 y WT1. Muchos de estos factores pertenecen a familias con funciones bien documentadas en la regulación de la respuesta inmune, la diferenciación celular y la inflamación. Por ejemplo, los factores de la familia KLF (Krüppel-like factors) participan en la activación de macrófagos, la producción de citocinas y la regulación de la artritis experimental. En particular, se ha demostrado que KLF4 regula positivamente la artritis autoinmune en modelos murinos y en pacientes con artritis reumatoide mediante la modulación de la supervivencia celular (Choi et al. 2018), mientras que KLF2 regula críticamente la activación y función de monocitos, que desempeñan un papel patogénico en la enfermedad articular progresiva (Das et al. 2019). Asimismo, la hipermetilación de regiones que contienen sitios de unión para PRDM6 podría tener implicaciones inmunomoduladoras, ya que se ha identificado que esta histona metiltransferasa suprime la expresión de genes inmunitarios en células tumorales, alineándose con los roles inmunosupresores descritos para otros miembros de la familia PRDM (Wu et al. 2025). Por su parte, BCL11A es un regulador maestro de la linfopoyesis y también se ha implicado en la modulación de la respuesta inflamatoria; estudios recientes demuestran que su sobreexpresión promueve la producción de IL-1β en células mieloides de médula ósea,

impulsando la inflamación y el deterioro funcional de las células madre hematopoyéticas (Wang et al. 2025). La hipermetilación de esta región podría reducir la unión de estos factores de transcripción, alterando así la expresión de genes involucrados en la patogenia de la artritis post-chikungunya.

La región GH0XJ068496 presenta una mayor densidad de sitios de unión (150 factores de transcripción), incluyendo *POLR2A, ATF2, CREM, ATF1, CREB1, NFYC, RELB, SMAD4, GABPB1, TCF12, BCL11A, IKZF1, SP1, SP3, KLF8, ZNF335, E2F1, ELK1,* entre otros. La presencia de múltiples factores de la familia CREB/ATF, CREM, y otros factores sugiere que esta región podría ser sensible a señales de estrés celular y a vías de señalización activadas por la infección viral. En este contexto, se ha demostrado que la metilación del ADN en sitios de unión para factores de transcripción de la familia CREB/ATF regula directamente la latencia y reactivación de diversos virus. Por ejemplo, en el virus de la leucemia bovina (BLV), la hipermetilación de la región CRE en el LTR 5′ impide el reclutamiento de CREB/CREM/ATF, contribuyendo a la latencia proviral y a la evasión del sistema inmunitario del hospedero (Pierard et al. 2010). De manera similar, en el VIH-1, la desmetilación dependiente del ciclo celular de los sitios CREB/ATF en el LTR es crucial para la reactivación del genoma viral latente (Tanaka et al. 2003). Por lo tanto, la hipermetilación de GH0XJ068496 podría alterar la expresión de genes diana involucrados en la respuesta al estrés celular y la inflamación, modulando potencialmente la susceptibilidad o la respuesta del hospedero a la infección viral.

Nuestros resultados aportan evidencia relevante sobre la evolución clínica y epigenética a largo plazo de pacientes infectados por el VCHIK. En primer lugar, el seguimiento a ocho años mostró que la gran mayoría de los individuos (26 de 27) no refirieron secuelas articulares persistentes, y el único paciente que reportó dolor intermitente presentó un índice DAS-28 inferior a 2.6, lo que sugiere ausencia de actividad inflamatoria significativa. Este hallazgo indica que, aunque

la artralgia posinfecciosa puede prolongarse en algunos casos, tiende a no traducirse en una artritis clínicamente relevante a largo plazo, coincidiendo con estudios que reportan una evolución favorable tras la fase aguda de la infección por VCHIK (Rahman et al. 2022; Zaid et al. 2018).

En segundo lugar, el análisis de metilación de los loci GH0XJ068496 y GH22J027789 reveló que, si bien durante la fase aguda (casos) existían diferencias altamente significativas en los niveles de metilación respecto a los controles, dichas diferencias desaparecieron en el grupo de seguimiento. Este hallazgo sugiere que la infección por VCHIK induce cambios epigenéticos transitorios que tienden a normalizarse con el tiempo, alcanzando patrones de metilación comparables a los de individuos sin antecedente infeccioso. La reversión de estas marcas epigenéticas podría reflejar mecanismos de reparación o adaptación celular frente al estrés inflamatorio agudo, y podría estar asociada a la resolución clínica observada en la mayoría de los pacientes. Estudios previos en otras infecciones virales han documentado modificaciones en el metiloma durante la fase aguda, con recuperación parcial o total tras la resolución del cuadro (Mukherjee et al. 2013; Atlante et al. 2020; Gokhale et al. 2019). En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la infección por VCHIK no deja una huella epigenética permanente en los loci analizados, al menos en el contexto de un seguimiento de ocho años.

No obstante, es necesario reconocer las limitaciones del estudio, como el tamaño muestral reducido (n=27), la posible heterogeneidad en el manejo clínico durante el seguimiento y la ausencia de evaluaciones funcionales o de imágenes articulares que podrían haber subestimado cambios subclínicos. A pesar de ello, estos resultados contribuyen a comprender mejor la historia natural de la infección por el VCHIK y refuerzan la importancia de reconocer sus síntomas característicos para el diagnóstico diferencial con otras infecciones febriles, especialmente en áreas endémicas donde coexisten múltiples arbovirus. Asimismo, abren la puerta a investigar si otros loci o mecanismos epigenéticos distintos a la metilación del

ADN podrían explicar los casos excepcionales de sintomatología prolongada, así como a evaluar la persistencia de síntomas articulares crónicos y el impacto de la enfermedad en distintos grupos poblacionales.

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo ha determinado que la infección por VCHIK induce cambios específicos y diferenciales en el estado de metilación del ADN de células humanas, particularmente en sinoviocitos y linfocitos, dos tipos celulares clave en la patogenia de la enfermedad y sus complicaciones crónicas. Los hallazgos obtenidos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. El VCHIK modula selectivamente la metilación del ADN como mecanismo epigenético predominante. A diferencia de otros procesos como la biogénesis de miRNAs o las modificaciones de histonas, que mostraron cambios limitados en las primeras 72 horas post-infección, la maquinaria de metilación del ADN —especialmente los genes *DNMT3B, DNMT3L* y la familia MBD— se encontró significativamente sobreexpresada, sugiriendo que el virus induce una reprogramación epigenética dirigida hacia la regulación transcripcional por metilación.

2. La infección por VCHIK genera un panorama extenso de RDM con especificidad celular. Se identificaron 1,457 RDM en sinoviocitos y 1,016 en linfocitos, demostrando que la respuesta epigenética es celularmente heterogénea. La presencia predominante de metilación en contexto CHH (no CG) apunta a mecanismos de plasticidad epigenética asociados a la respuesta a estímulos infecciosos.

3. Las vías de señalización por Rho GTPasas (*CDC42, RAC2*) constituyen el principal blanco funcional de la metilación diferencial. El enriquecimiento significativo de estas vías, conocidas por su participación en la endocitosis viral y la regulación del citoesqueleto, sugiere que el VCHIK podría inducir cambios epigenéticos que modulan la entrada viral y la migración celular, abriendo nuevas perspectivas sobre la relación virus-hospedador.

4. Los elementos reguladores no codificantes (circRNA, lncRNA, piRNA) muestran una hipometilación predominante y representan un novedoso nivel de regulación epigenética en la infección por alfavirus. La identificación de miles de estos elementos diferencialmente metilados —5,170 circRNA y 51 piRNA en sinoviocitos— sugiere que el VCHIK podría alterar redes regulatorias postranscripcionales, con potencial impacto en la persistencia de la artralgia crónica post-infección.

5. Las regiones diferencialmente metiladas son ricas en sitios de unión para factores de transcripción inmunológicos clave (IRF2/3/9, STAT1/3, NF-κB, TRIM22, CTCF). Aunque no se observó un enriquecimiento global de vías clásicas de respuesta antiviral, la presencia de estos motivos en regiones con metilación alterada sugiere que el VCHIK podría modular finamente la accesibilidad de la cromatina a estos factores, alterando la cinética de la respuesta inmune sin suprimirla completamente.

6. La infección aguda induce hipermetilación transitoria en regiones reguladoras específicas, como GH22J027789 y GH0XJ068496. Estas regiones, ricas en sitios de unión para factores de las familias KLF, CREB/ATF, PRDM y BCL11A, mostraron diferencias altamente significativas entre pacientes agudos y controles, vinculando la metilación anómala con la regulación de la inflamación y la respuesta al estrés celular.

7. Los cambios epigenéticos inducidos por el VCHIK son reversibles a largo plazo. El seguimiento a ocho años de los pacientes demostró que los niveles de metilación en los loci analizados se normalizaron, alcanzando patrones comparables a los de individuos sin antecedente infeccioso. Esta reversión se acompañó de una resolución clínica favorable, sin artritis persistente clínicamente relevante, lo que sugiere que el VCHIK no deja una huella epigenética permanente en los loci estudiados.

Limitaciones y perspectivas futuras. El tamaño muestral reducido para el análisis de metilación a largo plazo (n=27), la ausencia de evaluaciones funcionales

articulares y la falta de validación funcional de las regiones candidatas limitan la generalización de los resultados. Futuros estudios deberán: (i) validar mediante técnicas funcionales (CRISPR, ensayos reporteros) el papel causal de las RDM identificadas; (ii) explorar si otros mecanismos epigenéticos (modificaciones de histonas, ARN no codificantes) explican los casos excepcionales de artritis persistente; (iii) ampliar el seguimiento a cohortes multicéntricas para confirmar la reversibilidad de las marcas epigenéticas; y (iv) evaluar si la metilación diferencial de circRNA y piRNA puede servir como biomarcador pronóstico de cronicidad.

Conclusión final. El VCHIK induce una reprogramación específica y transitoria del metiloma del hospedador, afectando preferentemente a vías de señalización por Rho GTPasas y a elementos reguladores no codificantes. Estos cambios epigenéticos, que revierten tras la resolución clínica, aportan una nueva comprensión de la patogenia del chikungunya y abren la puerta a futuras intervenciones diagnósticas o terapéuticas basadas en el epigenoma. Esta tesis constituye un avance significativo en el conocimiento de las interacciones entre alfavirus y los mecanismos epigenéticos del hospedador, sentando las bases para investigar el papel de la metilación del ADN en las artritis post-infecciosas y otras enfermedades virales crónicas.

11. BIBLIOGRAFÍA

Adcock IM. 2007. HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents [Review of HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents]. British Journal of Pharmacology 150:829-831.

Adhya D, Basu A. 2010. Epigenetic modulation of host: new insights into immune evasion by viruses. Journal of Biosciences 35:647-663.

Alabert C, Groth A. 2012. Chromatin replication and epigenome maintenance. Nature Reviews Molecular Cell Biology 13:153-167.

Álvarez-Morán AM, Ávila-Sánchez P. 2019. Panorama epigenético del mesotelioma pleural maligno. Neumología y Cirugía de Tórax 78:395-403. doi:10.35366/NT194H.

Araúz D, De Urriola L, Jones J, Castillo M, Martínez AA, Murillo ESR, Troncoso L, Chen-Germán M, Ábrego L, Armién B, Pascale JM, Sosa N, López-Vergès S, Moreno B. 2016. Febrile or exanthematous illness associated with Zika, Dengue, and Chikungunya viruses, Panama. Emerging Infectious Diseases 22:1515-1517. doi:10.3201/eid2208.160292.

Atlante S, Mongelli A, Barbi V, Martelli F, Farsetti A, Gaetano C. 2020. The epigenetic implication in coronavirus infection and therapy. Clinical Epigenetics 12:156.

Avila-Bonilla RG, Salas-Benito JS. 2022. Interactions of host miRNAs in the flavivirus 3′UTR genome: From bioinformatics predictions to practical approaches. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 12:976843. doi:10.3389/fcimb.2022.976843.

Baer A, Kehn-Hall K. 2014. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. Journal of Visualized Experiments 93:e52065. doi:10.3791/52065.

Balakrishnan L, Milavetz B. 2017. Epigenetic Regulation of Viral Biological Processes. Viruses 9. doi:10.3390/v9110346.

Balnis J, Madrid A, Hogan KJ, Drake LA, Adhikari A, Vancavage R, Singer HA, Alisch RS, Jaitovich A. 2022. Persistent blood DNA methylation changes one year after SARS-CoV-2 infection. Clinical Epigenetics 14:94. doi:10.1186/s13148-022-01313-8.

Barres R, Zierath JR. 2011. DNA methylation in metabolic disorders. The American Journal of Clinical Nutrition 93:897S-900.

Barrès R, Zierath JR. 2016. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. Nature Reviews Endocrinology 12:441-451.

Bavia L, Mosimann ALP, Aoki MN, Duarte dos Santos CN. 2016. A glance at subgenomic flavivirus RNAs and microRNAs in flavivirus infections. Virology Journal 13:84. doi:10.1186/s12985-016-0541-3.

Bertolín-Guillén JM. 2023. Salud mental intergeneracional. Revista de Neuro-Psiquiatría 86:35-44. doi:10.20453/rnp.v86i1.4465.

Bhattacharya T, Yan L, Crawford JM, Zaher H, Newton ILG, Hardy RW. 2022. Differential viral RNA methylation contributes to pathogen blocking in Wolbachia-colonized arthropods. PLoS Pathogens 18:e1010393. doi:10.1371/journal.ppat.1010393.

Braun KVE, Voortman T, Dhana K, Troup J, Bramer WM, Troup J, Chowdhury R, Dehghan A, Muka T, Franco OH. 2016. The role of DNA methylation in dyslipidaemia: A systematic review. Progress in Lipid Research 64:178-191.

Burdge GC, Lillycrop KA. 2010. Bridging the gap between epigenetics research and nutritional public health interventions. Genome Medicine 2:80.

Campbell CL, Harrison T, Hess AM, Ebel GD. 2014. MicroRNA levels are modulated in Aedes aegypti after exposure to Dengue-2. Insect Molecular Biology 23:132-139. doi:10.1111/imb.12070.

Canalejo SR. 2018. Qué es la epigenética. Ius et Scientia 4:50-62. doi:10.12795/iestscientia.2018.i02.04.

Carrillo C, Toro M, Bolivar M, Seijas ME, Rotondo J. 2018. La epigenética en el tratamiento del dolor. Revista de la Sociedad Española del Dolor 25:166-169. doi:10.20986/resed.2017.3620/2017.

Casseb SM, Simith DB, Melo KF, Mendonça MH, Santos AC, Carvalho VL, Cruz AC, Vasconcelos PF. 2016. Drosha, DGCR8, and Dicer mRNAs are down-regulated in human cells infected with dengue virus 4, and play a role in viral pathogenesis. Genetics and Molecular Research 15:gmr.15027891. doi:10.4238/gmr.15027891.

Cavagnari BM. 2012. Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. Archivos Argentinos de Pediatría 110:132-136. doi:10.5546/aap.2012.132.

Chen X, Yang T, Wang W, Xi W, Zhang T, Li Q, Yang A, Wang T. 2019. Circular RNAs in immune responses and immune diseases. Theranostics 9:588-607. doi:10.7150/thno.29678.

Chmurzynska A. 2010. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. Nutrition Reviews 68:87-98.

Choi S, Lee K, Jung H, Park N, Kang J, Nam K-H, Kim E-K, Ju JH, Kang KY. 2018. Krüppel-like factor 4 positively regulates autoimmune arthritis in mouse models and rheumatoid arthritis in patients via modulating cell survival and inflammation factors of fibroblast-like synoviocyte. Frontiers in Immunology 9:1339. doi:10.3389/fimmu.2018.01339.

Ci Y, Liu ZY, Zhang NN, Niu Y, Yang Y, Xu C, Yang W, Qin CF, Shi L. 2020. Zika NS1-induced ER remodeling is essential for viral replication. The Journal of Cell Biology 219:e201903062. doi:10.1083/jcb.201903062.

Ci Y, Shi L. 2021. Compartmentalized replication organelle of flavivirus at the ER and the factors involved. Cellular and Molecular Life Sciences 78:4939-4954. doi:10.1007/s00018-021-03834-6.

Cliffe AR, Coen DM, Knipe DM. 2013. Kinetics of facultative heterochromatin and polycomb group protein association with the herpes simplex viral genome during establishment of latent infection. mBio 4:e00590-12. doi:10.1128/mBio.00590-12.

Coffey LL, Vasilakis N, Brault AC, Powers AM, Tripet F, Weaver SC. 2008. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:6970-6975.

Conceição MG, França CE, Conceição SMP. 2020. Identificação de microRNAs modificados em doenças autoimunes. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento 5:114-120. doi:10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/doencas-autoimunes.

Dahmer MK, Cornell T, Quasney MW. 2016. Genetic and epigenetic factors in the regulation of the immune response. Current Opinion in Pediatrics 28:281-286.

Dai Z, Etebari K, Asgari S. 2022. N6-methyladenosine modification of the Aedes aegypti transcriptome and its alteration upon dengue virus infection in Aag2 cell line. Communications Biology 5:607. doi:10.1038/s42003-022-03566-8.

Das M, Deb M, Laha D, Joseph M, Kanji S, Aggarwal R, Iwenofu OH, Pompili VJ, Jarjour W, Das H. 2019. Myeloid Krüppel-like factor 2 critically regulates K/BxN serum-induced arthritis. Cells 8:908. doi:10.3390/cells8080908.

De Aguiar GPCG, Leite CMGS, Dias B, Vasconcelos SMM, de Moraes RA, de Moraes MEA, Vallinoto ACR, Macedo DS, Cavalcanti LPG, Miyajima F. 2019. Evidence for Host Epigenetic Signatures Arising From Arbovirus Infections: A Systematic Review. Frontiers in Immunology 10:1207.

Deaton AM, Bird A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. Genes & Development 25:1010-1022.

Delpu Y, Larrieu D, Gayral M, Arvanitis D, Dufresne M, Cordelier P, Torrisani J. 2016. Noncoding RNAs: Clinical and Therapeutic Applications. In: Drug Discovery in Cancer Epigenetics, Egger G and Arimondo PB (eds). Academic Press: Amsterdam, pp. 305-326.

De Rosa S, Arcidiacono B, Chiefari E, Brunetti A, Indolfi C, Foti DP. 2018. Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. Frontiers in Endocrinology 9:2.

Desiderio A, Spinelli R, Ciccarelli M, Nigro C, Miele C, Beguinot F, Raciti GA. 2016. Epigenetics: spotlight on type 2 diabetes and obesity. Journal of Endocrinological Investigation 39:1095-1103.

Dhanwani R, Khan M, Lomash V, Rao PVL, Ly H, Parida M. 2014. Characterization of Chikungunya virus induced host response in a mouse model of viral myositis. PLoS ONE 9:e92813. doi:10.1371/journal.pone.0092813.

Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, Meduri E, Morange PE, Gagnon F, Grallert H, Waldenberger M, Peters A, Erdmann J, Hengstenberg C, Cambien F, Goodall AH, Ouwehand WH, Schunkert H, Thompson JR, Spector TD, Gieger C, Trégouët DA, Deloukas P, Samani NJ. 2014. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. The Lancet 383:1990-1998.

Dupont C, Armant DR, Brenner CA. 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. Seminars in Reproductive Medicine 27:351-357.

Farelo MA, Korrou-Karava D, Brooks KF, Russell TA, Maringer K, Mayerhofer PU. 2022. Dengue and Zika Virus Capsid Proteins Contain a Common PEX19-Binding Motif. Viruses 14:253. doi:10.3390/v14020253.

Farooqi AA, Fuentes-Mattei E, Fayyaz S, Raj P, Goblirsch M, Poltronieri P, Calin GA. 2019. Interplay between epigenetic abnormalities and deregulated expression of microRNAs in cancer. Seminars in Cancer Biology 58:47-55.

Feldstein LR, Rowhani-Rahbar A, Staples JE, Weaver MR, Halloran ME, Ellis EM. 2017. Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus Outbreak, US Virgin Islands, December 2014-February 2016. Emerging Infectious Diseases 23:673-676.

Finkelstein JD. 1998. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. European Journal of Pediatrics 157(Suppl 2):S40-S44.

Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross M-S, Junien C. 2007. Nutri-epigenomics: lifelong remodelling of our epigenomes by nutritional and metabolic factors and beyond. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 45:321-327.

Garay-Morán C, Román-Pedroza JF, López-Martínez I, Rodríguez-Martínez JC, Ruiz-Matus C, Kuri-Morales P, Díaz-Quiñonez JA. 2017. Clinical and epidemiological characterization of chikungunya fever in Mexico. Revista Panamericana de Salud Pública 41:e65. doi:10.26633/RPSP.2017.65.

Gérardin P, Medina-Santos R, Le Clerc S, Bruneau L, Maillot A, Labib T, Rahmouni M, Spadoni J-L, Meyniel J-P, Cornet C, Lefebvre C, El Jahrani N, Savara J, Mathew MJ, Fontaine C, Payet C, Ah-You N, Chabert C, Mussard C, Porcherat S, Medjane S, Noirel J, Marimoutou C, Hocini H, Zagury J-F. 2025. Transcriptomic analysis of chronic chikungunya in the Reunionese CHIKGene cohort uncovers a shift in gene expression more than 10 years after infection. Travel Medicine and Infectious Disease 65:102825. doi:10.1016/j.tmaid.2025.102825.

Gokhale NS, McIntyre ABR, Mattocks MD, Holley CL, Lazear HM, Mason CE, Horner SM. 2019. Altered m6A modification of specific cellular transcripts affects Flaviviridae infection. Molecular Cell 77:542-555.e8.

Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. 2017. Emerging arboviruses: Why today? One Health 4:1-13.

Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, Sohn SY, Cho Y, Zhang B-T, Kim VN. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell 125:887-901.

Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M. 2009. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. Cancer Research 69:2766-2774.

Hossain S, Choudhury MR, Islam MA, Hassan MM, Yeasmin S, Hossain F, Zaman MM. 2022. Post-chikungunya arthritis: A longitudinal study in a tertiary care hospital in Bangladesh. Tropical Medicine and Health 50:21. doi:10.1186/s41182-022-00412-9.

Hussain M, Torres S, Schnettler E, Funk A, Grundhoff A, Pijlman G, Khromykh A, Asgari S. 2012. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3′ untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. Nucleic Acids Research 40:2210-2223. doi:10.1093/nar/gkr848.

Iyer LM, Zhang D, Aravind L. 2016. Adenine methylation in eukaryotes: Apprehending the complex evolutionary history and functional potential of an epigenetic modification. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology 38:27-40.

Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, Plösch T. 2012. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. Biochimie 94:2242-2263.

Jirtle RL, Skinner MK. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nature Reviews Genetics 8:253-262.

Jupille H, Vega-Rua A, Rougeon F, Failloux A-B. 2014. Arboviruses: variations on an ancient theme. Future Virology 9:733-751.

Kadayifci FZ, Zheng S, Pan Y-X. 2018. Molecular Mechanisms Underlying the Link between Diet and DNA Methylation. International Journal of Molecular Sciences 19. doi:10.3390/ijms19124055.

Kakumani K, Ponia S, Sood V, Chinnappan M, Banerjea C, Medigeshi R, Malhotra P, Mukherjee K, Bhatnagar K. 2013. Role of RNA interference (RNAi)

in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. Journal of Virology 87:8870-8883. doi:10.1128/JVI.02774-12.

Kanwal R, Gupta S. 2012. Epigenetic modifications in cancer. Clinical Genetics 81:303-311.

Keirsebelik MSG, David MR, Pavan MG, Couto-Lima D, Palomino M, Rahman RU, Hoffmann AA, Bahia AC, Caljon G, Maciel-de-Freitas R. 2024. Dengue virus serotype 1 effects on mosquito survival differ among geographically distinct Aedes aegypti populations. Insects 15:393.

Kim AS, Zimmerman O, Fox JM, Nelson CA, Basore K, Zhang R, Durnell L, Desai C, Bullock C, Deem SL, Oppenheimer J, Shapiro B, Wang T, Cherry S, Coyne CB, Handley SA, Landis MJ, Fremont DH, Diamond MS. 2020. An Evolutionary Insertion in the Mxra8 Receptor-Binding Site Confers Resistance to Alphavirus Infection and Pathogenesis. Cell Host & Microbe 27:428-440.e9. doi:10.1016/j.chom.2020.01.008.

Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S. 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. Cellular and Molecular Life Sciences 66:596-612.

Kulis M, Esteller M. 2010. DNA methylation and cancer. Advances in Genetics 70:27-56.

Kuss-Duerkop SK, Westrich JA, Pyeon D. 2018. DNA tumor virus regulation of host DNA methylation and its implications for immune evasion and oncogenesis. Viruses 10:82. doi:10.3390/v10020082.

Lewis H, Kelnhofer-Millevolte L, Brinkley M, Arbach H, Arnold E, Ramachadran S, Avgousti D. 2022. HSV-1 exploits host heterochromatin for egress. bioRxiv. doi:10.1101/2022.05.31.494218.

Li Z, Wang J, Lin Y, Fang J, Xie K, Guan Z, Ma H, Yuan L. 2022. Newly discovered circRNAs in rheumatoid arthritis, with special emphasis on functional roles in inflammatory immunity. Frontiers in Pharmacology 13:983744. doi:10.3389/fphar.2022.983744.

Lillycrop KA, Burdge GC. 2014. Environmental challenge, epigenetic plasticity and the induction of altered phenotypes in mammals. Epigenomics 6:623-636.

Lister R, Adams E, Fitzgerald S, Fone W, Hamer J, Lindholm M, McCartney R, Moström J, Sanders K, Seppälä O, Simon B, Thomas L. 2005. A Multi-National

Study of Reading and Tracing Skills in Novice Programmers. ACM SIGCSE Bulletin 36:119-150. doi:10.1145/1044550.1041673.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Mann J. 2017. Epigenetics in Liver Disease. In: Liver Pathophysiology, Muriel P (ed). Academic Press: Amsterdam, pp. 199-211.

Martínez JA, Milagro FI, Claycombe KJ, Schalinske KL. 2014. Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes. Advances in Nutrition 5:71-81.

Mayer SV, Tesh RB, Vasilakis N. 2017. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. Acta Tropica 166:155-163.

McKinsey TA. 2011. Targeting inflammation in heart failure with histone deacetylase inhibitors. Molecular Medicine 17:434-441.

Meltzer E. 2012. Arboviruses and viral hemorrhagic fevers (VHF). Infectious Disease Clinics of North America 26:479-496.

Milavetz BI, Balakrishnan L. 2015. Viral epigenetics. Methods in Molecular Biology 1238:569-596.

Monteagudo-Sánchez A, Noordermeer D, Greenberg MVC. 2024. The impact of DNA methylation on CTCF-mediated 3D genome organization. Nature Structural & Molecular Biology 31:404-412. doi:10.1038/s41594-024-01056-2.

Morandini AC, Santos CF, Yilmaz Ö. 2016. Role of epigenetics in modulation of immune response at the junction of host-pathogen interaction and danger molecule signaling. Pathogens and Disease 74. doi:10.1093/femspd/ftw082.

Mukherjee S, Vipat VC, Chakrabarti AK. 2013. Infection with influenza A viruses causes changes in promoter DNA methylation of inflammatory genes. Influenza and Other Respiratory Viruses 7:979-986.

Murillo-Zamora E, Mendoza-Cano O, Trujillo-Hernández B, Sánchez-Piña RA, Guzmán-Esquivel J. 2017. Persistent arthralgia and related risks factors in laboratory-confirmed cases of Chikungunya virus infection in Mexico. Revista Panamericana de Salud Pública, Pan American Journal of Public Health 41:1.

Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS. 2013. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 72:110-117. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201526.

Nakano K, Boyle DL, Firestein GS. 2013. Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes. Journal of Immunology 190:1297-1303. doi:10.4049/jimmunol.1202572.

Namba-Fukuyo H, Funata S, Matsusaka K, Fukuyo M, Rahmutulla B, Mano Y, Fukayama M, Aburatani H, Kaneda A. 2016. TET2 functions as a resistance factor against DNA methylation acquisition during Epstein-Barr virus infection. Oncotarget 7:81512-81526.

Pagani I, Poli G, Vicenzi E. 2021. TRIM22: A multitasking antiviral factor. Cells 10:1864. doi:10.3390/cells10081864.

Paschos K, Allday MJ. 2010. Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. Trends in Microbiology 18:439-447.

Pekáčová A, Baloun J, Švec X. 2022. Non-coding RNAs in diseases with a focus on osteoarthritis. WIREs RNA 13:e1756. doi:10.1002/wrna.1756.

Peng JC, Karpen GH. 2008. Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. Current Opinion in Genetics & Development 18:204-211.

Pereira Nunes GH, Londe de Lima MF, Capelari Orsolin P. 2023. The cooperation between genetic and epigenetic factors in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Research, Society and Development 12:e3881227383. doi:10.33448/rsd-v12i2.38806.

Periyasamy P, Thangaraj A, Guo M-L, Hu G, Callen S, Buch S. 2018. Epigenetic Promoter DNA Methylation of miR-124 Promotes HIV-1 Tat-Mediated Microglial Activation via MECP2-STAT3 Axis. The Journal of Neuroscience 38:5367-5383.

Petit de Molero N. 2023. Programación fetal y modificaciones epigenéticas relacionadas con el maltrato intrauterino. Colección Razetti 28. doi:10.59542/CRANM.2023.XXVIII.8.

Pierard V, Guiguen A, Colin L, Wijmeersch G, Vanhulle C, Van Driessche B, Dekoninck A, Blazkova J, Cardona C, Merimi M, Vierendeel V, Calomme C, Nguyen TL-A, Nuttinck M, Twizere J-C, Kettmann R, Portetelle D, Burny A, Hirsch I, Rohr O, Van Lint C. 2010. DNA cytosine methylation in the bovine

leukemia virus promoter is associated with latency in a lymphoma-derived B-cell line: Potential involvement of direct inhibition of cAMP-responsive element (CRE)-binding protein/CRE modulator/activation transcription factor binding. Journal of Biological Chemistry 285:19441-19449. doi:10.1074/jbc.M110.107607.

Pion M, Jaramillo-Ruiz D, Martínez A, Muñoz-Fernández MA, Correa-Rocha R. 2013. HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene. AIDS 27:2019-2029.

Portela A, Esteller M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. Nature Biotechnology 28:1057-1068.

Putiri EL, Robertson KD. 2011. Epigenetic mechanisms and genome stability. Clinical Epigenetics 2:299-314.

Reddi TS, Merkl PE, Lim S-Y, Letvin NL, Knipe DM. 2021. Tripartite Motif 22 (TRIM22) protein restricts herpes simplex virus 1 by epigenetic silencing of viral immediate-early genes. PLoS Pathogens 17:e1009281. doi:10.1371/journal.ppat.1009281.

Robinson MC. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952-1953. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 49:28-32.

Rodrigues Faria N, Lourenço J, Marques de Cerqueira E, Maia de Lima M, Pybus O, Carlos Junior Alcantara L. 2016. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. PLoS Currents 8. doi:10.1371/currents.outbreaks.c97507e3e48efb946401755d468c28b2.

Rojas DP, Barrera-Fuentes GA, Pavia-Ruz N, Salgado-Rodriguez M, Che-Mendoza A, Manrique-Saide P, Vazquez-Prokopec GM, Halloran ME, Longini IM, Gomez-Dantes H. 2018. Epidemiology of dengue and other arboviruses in a cohort of school children and their families in Yucatan, Mexico: Baseline and first year follow-up. PLoS Neglected Tropical Diseases 12:e0006847. doi:10.1371/journal.pntd.0006847.

Rouha H, Thurner C, Mandl C. 2010. Functional microRNA generated from a cytoplasmic RNA virus. Nucleic Acids Research 38:8328-8337. doi:10.1093/nar/gkq681.

Sadakierska-Chudy A, Filip M. 2015. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. Neurotoxicity Research 27:172-197.

Sajith A, Iyengar V, Varamballi P, Mukhopadhyay C, Nittur S. 2025. Diagnostic utility of real-time RT-PCR for chikungunya virus detection in the acute phase of infection: A retrospective study. Annals of Medicine 57:2523559. doi:10.1080/07853890.2025.2523559.

Sajjad N, Wang S, Liu P. 2021. Functional roles of non-coding RNAs in the interaction between host and influenza A virus. Frontiers in Microbiology 12:123456. doi:10.3389/fmicb.2021.742984.

Saxena T, Tandon B, Sharma S, Chameettachal S, Ray P, Ray AR, Kulshreshtha R. 2013. Combined miRNA and mRNA signature identifies key molecular players and pathways involved in chikungunya virus infection in human cells. PLoS ONE 8:e79886.

Selvamani SP, Mishra R, Singh SK. 2014. Chikungunya virus exploits miR-146a to regulate NF-κB pathway in human synovial fibroblasts. PLoS ONE 9:e103624.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. 2010. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis 31:27-36.

Smith ZD, Meissner A. 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. Nature Reviews Genetics 14:204-220.

Sweatt JD, Nestler EJ, Meaney MJ, Akbarian S. 2013. An Overview of the Molecular Basis of Epigenetics. In: Epigenetic Regulation in the Nervous System, Sweatt JD, Meaney MJ, Nestler EJ and Akbarian S (eds). Elsevier: Amsterdam, pp. 3-33.

Tammen SA, Friso S, Choi S-W. 2013. Epigenetics: the link between nature and nurture. Molecular Aspects of Medicine 34:753-764.

Tanaka J, Ishida T, Iwakura Y. 2003. Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle-dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. AIDS 17:209-217. doi:10.1097/00002030-200301240-00005.

Triantaphyllopoulos KA, Ikonomopoulos I, Bannister AJ. 2016. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. Epigenetics & Chromatin 9:1-18.

Tsai C-L, Li H-P, Lu Y-J, Hsueh C, Liang Y, Chen C-L, Tsao SW, Tse K-P, Yu J-S, Chang Y-S. 2006. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 Involves c-Jun NH (2)-terminal kinase signaling. Cancer Research 66:11668-11676.

Van Duijl-Richter MKS, Hoornweg TE, Rodenhuis-Zybert IA, Smit JM. 2015. Early events in Chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion. Viruses 7:3647-3674. doi:10.3390/v7072792.

Vasilakis N, Lambert A, MacLachlan NJ, Brault AC. 2016. Genomic Organization of Arboviral Families. In: Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control, Vasilakis N and Gubler DJ (eds). Caister Academic Press: Poole, UK, pp. 31-44.

Vásquez-Moctezuma I, Fernández-Navarrete E, Márquez-Mendoza JM, Luna-Palencia GR. 2020. Epigenética del cáncer de mama. Revista Mexicana de Mastología 10:39-47. doi:10.35366/97713.

Waddington CH. 2012. The epigenotype. (1942). International Journal of Epidemiology 41:10-13.

Wang J, Zhang L, Cui X, Xu X, Guo R, Li K, Zhang L, Xu B, Jiang C, Yu Y. 2025. Bcl11a maintains hematopoietic stem cell function but accelerates inflammation-driven exhaustion during aging. Science Immunology 10:eadr2041. doi:10.1126/sciimmunol.adr2041.

Wang X, Huang P, Lei M, Ma Y, Chen H, Sun J, Hu Y, Shi J. 2023. Global expression and functional analysis of human piRNAs during HSV-1 infection. Virus Research 328:199087. doi:10.1016/j.virusres.2023.199087.

Wei J-W, Huang K, Yang C, Kang C-S. 2017. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). Oncology Reports 37:3-9.

Whitaker JW, Shoemaker R, Boyle DL, Hillman J, Anderson D, Wang W, Firestein GS. 2013. An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype. Genome Medicine 5:40. doi:10.1186/gm444.

Wille CK, Nawandar DM, Panfil AR, Ko MM, Hagemeier SR, Kenney SC. 2013. Viral genome methylation differentially affects the ability of BZLF1 versus BRLF1 to activate Epstein-Barr virus lytic gene expression and viral replication. Journal of Virology 87:935-950. doi:10.1128/JVI.01790-12.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature Cell Biology 11:228-234.

Withers JB, Mondol V, Pawlica P, Rosa-Mercado NA, Tycowski KT, Ghasempur S, Torabi SF, Steitz JA. 2019. Idiosyncrasies of Viral Noncoding RNAs Provide Insights into Host Cell Biology. Annual Review of Virology 6:297-317. doi:10.1146/annurev-virology-092818-015811.

Wong RR, Abd-Aziz N, Affendi S, Poh CL. 2020. Role of microRNAs in antiviral responses to dengue infection. Journal of Biomedical Science 27:4.

Wu CT, Morris JR. 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. Science 293:1103-1105.

Wu Z, Lepcha TT, Zhou D, He Z, Fiches GN, Park Y, He J, Chen J, Shanaka KASN, Oghumu S, Zhao W, Ma A, Ma Q, Zhu J, Santoso NG. 2025. Analysis of head and neck cancer scRNA-seq data identified PRDM6 promotes tumor progression by modulating immune gene expression. Frontiers in Immunology 16:1596916.

You J, Hou S, Malik-Soni N, Xu Z, Kumar A, Rachubinski RA, Frappier L, Hobman TC. 2015. Flavivirus Infection Impairs Peroxisome Biogenesis and Early Antiviral Signaling. Journal of Virology 89:12349-12361. doi:10.1128/JVI.01365-15.

Youngblood B, Noto A, Porichis F, Akondy RS, Ndhlovu ZM, Austin JW, Bordi R, Procopio FA, Miura T, Allen TM, Sidney J, Sette A, Walker BD, Ahmed R, Boss JM, Sékaly R-P, Kaufmann DE. 2013. Cutting edge: Prolonged exposure to HIV reinforces a poised epigenetic program for PD-1 expression in virus-specific CD8 T cells. Journal of Immunology 191:540-544.

Zaid A, Gérardin P, Taylor A, Mostafavi H, Malvy D, Mahalingam S. 2018. Chikungunya arthritis: Implications of acute and chronic inflammation mechanisms on disease management. Arthritis & Rheumatology 70.

Zamudio-Meza H, Castillo-Álvarez A, González-Bonilla C, Meza I. 2009. Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. Journal of General Virology 90:2902-2911. doi:10.1099/vir.0.014159-0.

Zhang G, Pradhan S. 2014. Mammalian epigenetic mechanisms. IUBMB Life 66:240-256.

Zhang Q, Cao X. 2019. Epigenetic regulation of the innate immune response to infection. Nature Reviews Immunology 19:417-432.

12. ANEXOS.

ANEXO A

TÉCNICAS Y PROTOCOLOS

CULTIVO CELULAR

1. SUPLEMENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning.

Cat. 4488. Puntillas de 10, 100 y 1000 µL

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Pipetor.
- Microscopio
- Incubadora de CO_2
- Centrifuga

Reactivos

- HFLS Growth Medium 500 mL Cell applications. cat. 414-500
- Medio MEM 500 mL (Eagle's Minimal Essential Medium**)**

ThermoScientific, cat. 12492013

- Suero Bovino Fetal. 500 mL. HyClone. Cat. sh30396.03.
- Solución de antibiótico-antimicótico (100X) Penicilina
- Estreptomicina Anfotericina B, 100 mL, In vitro, S.A. Cat. A-07.
- Tripsina EDTA 1x Corning, cat. 25-053-CI

I. HFLS Growth Medium (Human Fibroblast-Like Synoviocytes)

Protocolo

a) Medio al 10% SBF para mantenimiento de células de sinoviocitos. Para suplementar 500 mL de medio se requieren 50 mL de suero bovino fetal, 5.5 mL de solución antibiótico/antimicótico (100X). El medio al 10% es el que se debe utilizar para subcultivar.

b) Medio al 2% SBF para infección viral de células Vero-76. El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% con respecto al SBF. A 500 mL de medio L-15 se añaden 10 mL SBF + 5 mL de antibiótico/antimicótico.

II. Medio MEM (Eagle's Minimal Essential Medium**)**

Protocolo

a) Medio al 10% SBF para mantenimiento de células Vero-76. Para suplementar 500 mL de medio se requieren 50 mL de suero bovino fetal, 5.5 mL de solución antibiótico/antimicótico (100X). El medio al 10% es el que se debe utilizar para subcultivar.

b) Medio al 2% SBF para infección viral de células Vero-76. El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% con respecto al SBF. A 500 mL de medio L-15 se añaden 10 mL SBF + 5 mL de antibiótico/antimicótico.

MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

Protocolo de Expansión de Células Vero

1. Tomar un vial de células Vero (-80°C) para descongelar a baño maría de 2 minutos de incubación.
2. Añadir en un tubo falcon de 15 ml con 5 ml de medio de cultivo el vial descongelado de las células Vero.
3. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
4. Desechar el sobrenadante y resuspender el botón de células en 1 mL de

medio de cultivo.

5. Colocar en una botella de T75 10 mL de medio y 1 mL de medio donde se resuspendieron las células

6. Incubar las células a 37°C y 5% CO2, hasta tener un 80-85 % de confluencia.

Pasaje celular

1. Retirar el medio de cultivo viejo por aspiración.

2. Lavar las células con una alícuota de PBS estéril 1X, por cada 25 cm2 de superficie se debe emplear 1 mL de buffer de lavado. Realizar movimientos circulares para permitir que la solución entre en contacto con todas las unidades de la monocapa y pueda remover la mayor cantidad posible de detrito celular.

3. Retirar el PBS 1X por aspiración.

4. Añadir tripsina a las células en una botella de 25 cm^2, se levantan con 1 mL de tripsina. Las de una botella de 75 cm2 se levantan con 3 mL de tripsina.

5. Incubar a 37°C durante 5 minutos. Procurar no exceder el tiempo para que la enzima no comience a degradar la membrana celular.

6. Neutralizar la actividad de la tripsina adicionando un volumen 1:1 de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal.

7. Recolectar la suspensión celular en un tubo falcón de 15 mL.

8. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

9. Cuidadosamente retirar el medio de cultivo utilizado para neutralizar la tripsina.

10. Añadir medio de cultivo nuevo dependiendo del tamaño del botón celular obtenido.

11. Resuspender completamente con ayuda de una pipeta de 2 mL (o con una puntilla de 1000 µL) el botón celular en el medio nuevo hasta observar que no hay cúmulos flotando.

12. Preparar la botella de cultivo a sembrar con la cantidad de medio nuevo correspondiente y depositar en ella el volumen deseado de la suspensión celular.

13. Incubar a 37 °C con 5% CO2 hasta una confluencia de 80-85%.

RECUENTO CELULAR

Protocolo

1. Procesar las botellas de cultivo hasta la resuspensión y disgregación en medio nuevo de las células. Procurar una disgregación completa, sin que el medio presente cúmulos del cultivo flotando o suspendidos.
2. Tomar una alícuota de 60 µL de medio de cultivo nuevo y depositarla en un tubo cónico de 200 µL.
3. Medir una alícuota de 10 µL de la suspensión celular y depositarla en el tubo cónico del 200 µL.

Procurar homogeneizar completamente antes de realizar la medición, puesto que de forma natural las células precipitan volviendo a formar el botón al fondo del tubo donde se centrifugaron.

4. Medir 10 µL del colorante azul tripano y colocarla en el tubo cónico de 200 µL
5. Mezclar con ayuda de una puntilla de 200 µL el volumen del tubo, subiendo y bajando su contenido sin formar burbujas.
6. Depositar 10 µL de la suspensión celular con colorante en la cámara de Neubauer.
7. Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, contar el número de células vivas en las cuatro cuadrículas de 4 x 4 de la cámara (Figura 26, números 1, 2, 3 y 4). Registrar los números.

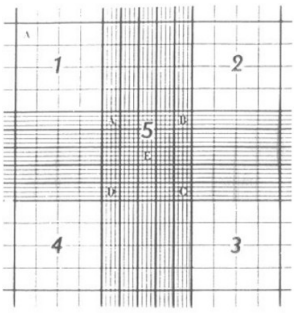


Figura suplementaria 1: Esquema de la cuadricula de la cámara de Neubauer.

8. Contar el número de células en el cuadrante central de 5 x 5 (Figura 26, número 5). Registrar la cantidad.

9. Realizar el cálculo del total de células empleando la siguiente fórmula:

No. células/mL = (Promedio 4 x 4) (Factor de dilución) (1x 10^4)

10. El número obtenido con el promedio de las cuadrículas de 4 x 4 debe ser similar al cálculo realizado con el total de células en la cuadrícula central de 5 x 5.

11. Multiplicar el número de células/mL por el volumen en el cual se resuspendieron y disgregaron las células del cultivo para obtener la cantidad total de células producidas.

12. Con respecto al total de células contabilizadas y el volumen total, colocar el volumen correspondiente al número de células deseado en la botella o placa de cultivo.

CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Protocolo

1. Cosechar células Vero-76 y/o células de Sinoviocitos, siguiendo el protocolo de subcultivo hasta la obtención del botón celular.
2. Remover completamente el medio utilizado para neutralizar la tripsina, empleando una micropipeta de 1000 µL y procurando no romper el botón celular.
3. Resuspender las células en medio de cultivo con 10% de suero bovino fetal, se debe obtener una suspensión con una concentración final de 1 a 1.5 millones de células por mL.
4. Preparar crioviales a congelar, rotular con nombre de la línea celular, así como el número de pasaje y fecha.
5. Depositar en cada criovial 100 µL de DMSO.
6. Depositar en cada vial 900 µL de la suspensión de células en medio y suero.
7. Almacenar las células en el Mr. Frosty y colocarlo en el ultracongelador Revco a - 80°C. Las células congeladas y almacenadas a esta temperatura tienen una caducidad aproximada de un año.

INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON VCHIK

CULTIVO VIRAL: AMPLIFICACIÓN DEL VIRUS CHIKUNGUNYA EN LÍNEAS CELULARES.

1. Sembrar células Vero-76 hasta obtener una monocapa confluente bajo las condiciones indicadas en el protocolo anteriormente descrito.
2. Desechar medio de cultivo por decantación.
3. Lavar células con 3 mL de solución PBS 1X para remover el detrito celular.
4. Agregar medio con 2% SBF (con la finalidad de que las células se mantengan vivas, pero evitar que sigan duplicándose), en un volumen adecuado para cubrir solamente las células.
5. Adicionar al medio 100 – 150 µL del aislado viral o sobrenadantes de cultivos previamente infectados
6. Homogeneizar botella con movimientos circulares para asegurar que el virus tenga contacto con la monocapa celular completa.
7. Incubar a 37ºC durante una hora al menos.
8. Transcurrida la hora de incubación, completar volumen del medio de cultivo a los indicados en el apartado de subcultivo celular.
9. Incubar las células (37°C con 5% de CO_2), los días siguientes se realiza observación microscópica para identificar cambios morfológicos en las células que indiquen muerte celular.

COSECHA Y ALMACENAMIENTO DE AISLADOS VIRALES

1. Transcurridos de 5 a 7 días de la infección celular, se puede cosechar el virus.
2. Si el cultivo se hizo en tubo, vortexear para desprender las células. Si el cultivo se realizó en frascos, raspar con gendarme. No hacer lavados con PBS.
3. Recolectar medio de cultivo y centrifugar para empaquetar las células.
4. Del sobrenadante colectar alícuotas.
5. Preparar la mezcla para congelación de los sobrenadantes.
7. Almacenar a -80ºC hasta su uso.

PROTOCOLO DE TITULACIÓN VIRAL

Carboximetilcelulosa al 1.6%

1. Pesar 2 g de carboximetilcelulosa de viscosidad media y adicionarlos lentamente a 125 mL de agua mili Q. Hacer esta mezcla en un frasco de vidrio de 250 mL de capacidad.
2. Dar agitación mecánica a la suspensión hasta que se disuelva todo el sólido o hasta que la viscosidad de la mezcla impida que el agitador magnético realice su función de forma correcta.
3. Esterilizar inmediatamente y almacenar a 4°C.

Carboximetilcelulosa al 0.8% en medio MEM.

1. En el frasco donde se preparó la carboximetilcelulosa al 1.6%, adicionar bajo condiciones de esterilidad, 125 mL de medio MEM 2X.
2. Empleando agitación magnética homogeneizar la mezcla sin generar muchas burbujas en su interior.
3. Almacenar a 4°C y no abrir la botella fuera de la campana de cultivo celular.

Naphtol Blue Black para tinción de placas

1. Pesar 250 mg de Naphtol Black Blue, 3.4 g de acetato de sodio y disolver en 200 mL de agua miliQ empleando agitación magnética.
2. Adicionar 15 mL de ácido acético glacial y aforar a 250 mL con agua miliQ.
3. Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Almacenar a temperatura ambiente, protegido de la luz con papel aluminio.

MONTAJE DEL ENSAYO E INFECCIÓN VIRAL.

1. Sembrar previamente células Vero-76 en formato de 12 pozos, empleando una densidad de siembra de 2.5 x 10^5 células/pozo y permitir que la confluencia aumente a un 80% en el transcurso de 48 horas antes de infectarse.
2. Preparar diluciones seriadas del concentrado viral, 1:10, 1:1x10^2, 1:1x10^3, 1:1x10^4, 1:1x10^5, 1:1x10^6.

4. Incubar 10 minutos a 37°C las diluciones virales seriadas.
5. Remover por aspiración el medio de cultivo de las células, excepto a las células de los pozos NTC. Rotular la placa con los datos pertinentes.
6. Añadir 200 µL de la dilución viral más baja al pozo correspondiente y su duplicado. Cubriendo con la tapa de la placa los pozos cercanos para que no se contaminen entre ellos.
7. Sin cambiar la puntilla, continuar colocando las siguientes diluciones virales en los pozos correspondientes en orden de concentración creciente.
8. Incubar la placa durante una hora a 37°C.
9. Transcurrido el tiempo, adicionar 1 mL de CMC 0.8% a cada pozo.
10. Incubar durante 3-5 días a 37°C/5% CO2.

TINCIÓN DE PLACAS

1. Remover medio con CMC por aspiración.
2. Añadir Naphtol Black blue a cada pozo cubriendo la monocapa completamente, aproximadamente 1 mL.
3. Incubar a temperatura ambiente las placas durante 30 minutos.
4. Lavar la placa decantando el colorante en la tarja y sumergiéndola en un molde con agua. Repetir tres veces este paso.
5. Sacudir placa teñida en una toalla de papel y una vez seca, realizar el recuento de focos líticos.

RECUENTO DE FOCOS LÍTICOS

1. Contar el número de focos líticos en cada pozo hasta donde se puedan observar bien definidos.
2. Dividir entre 200 µL el número de placas líticas contadas y multiplicarlas por 1000 µL. Multiplicar el resultado obtenido por el valor de la dilución más baja en donde se observan las placas.
3. En caso de que exista disparidad entre los resultados de los duplicados, promediar los títulos obtenidos entre ellos.

PROTOCOLOS PARA MANEJO DE ADN

Extracción ADN

1. Homogenizar la muestra y 300 µl de la muestra y colocarla en un tubo de microcentrífuga.
2. Añadir 20 µl de proteinasa K y 200 µl de Buffer ATL a la muestra.
3. Mezclar suavemente mediante inversión o vortex.
4. Incubar a 56 °C durante 10-30 minutos para permitir la lisis celular completa.
5. Añadir 200 µl de etanol absoluto a la mezcla. Mezclar suavemente.
6. Transferir la mezcla a una columna QIAamp y centrifugar a 6,000 x g durante 1 minuto para que el ADN se adhiera a la membrana de la columna.
7. Desechar el filtrado y añadir 500 µl de Buffer AW1 a la columna. Centrifugar a 6,000 x g durante 1 minuto.
8. Desechar el filtrado nuevamente y añadir 500 µl de Buffer AW2 a la columna.
9. Centrifugar a 20,000 x g durante 3 minutos para eliminar residuos de etanol.
10. Colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga y añadir 200 µl de Buffer AE (o agua libre de nucleasas) en el centro de la membrana.
11. Incubar a temperatura ambiente durante 1-2 minutos y centrifugar a 6,000 x g durante 1 minuto para eluir el ADN.
12. Almacenar el ADN eluido a -20 °C o -80°C para su uso posterior.

Protocolo con el kit de conversión Directo de Metilación de ADN

Preparación de la Mezcla de Conversión Bisulfito:

1. Adicionar 20 ul de la muestra y 130 de CT Conversión Reagent en un tubo de 0.2 mL, mezclar y centrifugar.

2. Colocar los tubos en un termocilcador con los sigueintes pasos:

1. 98° C por 8 minutos
2. 64° C por 3.5 horas

3. Se puede almacenar a 4° C por 20 horas (este es un punto de paro).

4. Agregar 600 ul de M-bindindg buffer en una columna de Symo-spin, colocar la columna dentro de un tubo colector.

5. Invertir la columna varias veces, centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos, descartar el sobrenadante.

6. Agregar 100 ul de M-Wash buffer a la columna, centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos, descartar el sobrenadante.

7. Agregar 200 ul de M-desulphonation buffer a la columna y dejar secar la columna a temperatura ambiente (20-30°C) por 15-20 minutos. Después de la incubación centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos, descartar el sobrenadante.

8. Adicionar otros 200 ul de M-wash buffer y centrifugar por otros 30 segundos adicionales.

9. Coloque la columna dentro de un tubo de 1.5 mL y agregue 10 ul de M-elution buffer directamente a la membrana de la columna, centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos para eluir el ADN.

- Recuperar esta elución esta muestra de ADN está lista para su análisis o puede almacenarse a -20 hasta su uso, para almacenaje prolongado congelar las muestras a -70°C. El ADN eluido puede ser utilizado directamente en técnicas como PCR específica de metilación (MSP), secuenciación sanger o secuenciación de próxima generación (NGS).

Tabla Suplementaria 1: Primers para los cuatro mecanismos epigenéticos (metilación, biogénesis de miRNAs, modificaciones de histonas y regulación de cromatina)

Nombre cebador	Secuencia cebador (5'-3')	Tamaño de producto en pb
DNMT1-F	GGCGGCTCAAAGATTTGGAA	161
DNMT1-R	CAGGTAGCCCTCCTCGGATA	
DNMT3A-F	GGCCATACGGTGGAGCC	120
DNMT3A-R	TATCGTGGTCTTTGGAGGCG	
DNMT3B-F	TCGTGCAGGCAGTAGGAAAT	177
DNMT3B-R	GAAGCCATTTGTTCTCGGCTC	
DNMT3L-F	CGCCCCATGTAAGGACAAGT	128
DNMT3L-R	ATCGGGTGCAATCAGGGTTT	
TET1-F	CGAGTTGGAAAGTTTGCCCG	98
TET1-R	ACACAAGGTTTTGGTCGCTG	
TET2-F	AGCAAGATGGCTGCCCTTTA	99
TET2-R	ATGTTTGCCAGCCTCGTTCT	
TET3-F	GAGTCCCAACTCCGAGGGG	200
TET3-R	CCAGCCTTTATTTCCACCTCC	
MeCP2-F	TGTGTATTTGATCAATCCCCAGG	91
MeCP2-R	GTCCAGGGATGTGTCGCCTA	
MBD1-F	TCTGGTTGCCAAGGTCCAAA	74
MBD1-R	CAGTCTGTAGAAGCCTCCAGT	
MBD2-F	ACAACCGGTAACCAAAGTCACA	94
MBD2-R	CTCCCAGAAAAGCTGACGTG	
MBD4-F	CTCAATCGGACCTCAGGCAA	90
MBD4-R	GTCTGCGGTTCTTGCTACCT	
MBD3-F	GGGAGAGGGAAGAAGTGCCC	80
MBD3-R	CTTCCCGCTCGGGCTATAGTA	
PCGF1-F	GATCAGCCTTTAAGATGGCGT	118
PCGF1-R	ACTCGAACCTCCTCCTCGTTC	
PCGF2-F	TTCACAAACTCCTTTCTTACCGT	150
PCGF2-R	CGTTTCGGCCATCTGGGTT	
PCGF3-F	AAACTCCGGACGGGCTTTTT	136
PCGF3-R	TGCTACATTGTGACGCCTGC	
BMI1-F	TTGTCTTTTCCGCCCGCT	197
BMI1-R	AATACACGTTTTACAGAAGGAATGT	
PCGF6-F	TCTCTCTGAGCTGACCCCAT	200
PCGF6-R	ACTGTCGGTCCAACCTTATGT	
RING1-F	AGATTGCTGTTTCCCCTCGG	153
RING1-R	GACACTCCTTGTTCCCGCTC	
RNF2-F	GCTGTGCAGACAAACGGAAC	95
RNF2-R	GCCATCTGTTATTGCCTCCTGA	
EED-F	TTTCTGGCAAAAGATGCTTGC	197
EED-R	AGCGCCAAATACTGGCATCA	
suz12-F	ACTCGGAATCTCATAGCACCAA	173
suz12-R	AGCTGCAAATGAGCTGACAA	
EZH1-F	GCTGTTGTGTCCTGCCATTC	115
EZH1-R	TGGAGGTAGGGGGATTTGGT	
EZH2-F	GGACTCAGAAGGCAGTGGAG	108
EZH2-R	TCTGGCCCATGATTATTCTTCGT	
KDM6A-F	GAACACAGCACAGCAGGCAT	141
KDM6A-R	GCAGGACTGGACAGGTCATC	
EP300-F	GCAGTGTGCCAAACCAGATG	168
EP300-R	CATAGCCCATAGGCGGGTTG	
KDM5B-F	AAGATGGGGTTTGCTCCTGG	118
KDM5B-R	GCTTCTGCAAACACCTTAGGC	
CREBBP-F	CGTGTCACAGGGACAGGTG	100
CREBBP-R	GTGACTGTGTCACTGGAGGG	
HDAC2-F	CCCCCACGTTTCCCTCAG	177
HDAC2-R	ATAATTTCCAATATCACCGTCGTAG	
SIRT1-F	AGGCCACGGATAGGTCCATA	103
SIRT1-R	GTGGAGGTATTGTTTCCGGC	
KMT2A-F	TCTTTCAGGTACAGAAGATGAGATG	195
KMT2A-R	TAGCGTAGCAAATGGCTGGT	
KMT2D-F	CAGCCCGACGAGGTGATAC	171
KMT2D-R	CAGCAGCTCCTTCCCAAAGA	
KMT2C-F	TTGATCATTCAGATATTGGTCCTGT	188
KMT2C-R	TTTTCCGCCAAGCTCTGGAA	
SMARCA2-F	AGATTCAGCCAGCACACTCC	200
SMARCA2-R	CCATCATGCTGTGGACGGAA	

Nombre cebador	Secuencia cebador (5'-3')	Tamaño de producto en pb
SMARCA1-F	CGGAGAAGGGCGAGAAGAAG	127
SMARCA1-R	GCTCGGTCGGCTTTCATTTT	
SMARCA4-F	CGGCAGAAGCACCAGGAATA	104
SMARCA4-R	GCCTTGGTCAGCTTCTGGAT	
ARID1A-F	AACCCAGACTCGGGGATGTA	182
ARID1A-R	ATTGGCCGCTTGTAATTCTGC	
ARID2-F	AATAATGGCAAACTCGACGGG	106
ARID2-R	AAAAGGCGACCCTCTGCT	
BRD7-F	TGGCCACGTGCCAAGATTAT	174
BRD7-R	GTGGCTCTACTTCTGTAATCTCCA	
PBRM1-F	GAAGGAAGGCTCCAAACGGA	182
PBRM1-R	CCACCCATCATGCCTTCATA	
CHD5-F	TGGATGCTTAAAGGAGCCCAA	116
CHD5-R	AGGCCTTGTAGTTGGTCAGC	
CHD7-F	TCTCGAAGACTAGACAGGAAGGA	151
CHD7-R	TCACACGCTGCACACATTTC	
CHD4-F	CCACCCCACCCAGAAAATGA	155
CHD4-R	TGCCGGCATAAGAGCATACG	
ARID1B-F	GCATGGGCAGTAACCCTCAT	163
ARID1B-R	TACTGAGGTGGCATCTGCTG	
DPF1-F	ACTGTGAAGCACCCCTGAAG	142
DPF1-R	AGCAACTGCTGTTTCTGACA	
PHF10-F	AGGAAATATCCAGATTTAGAGCGAC	117
PHF10-R	ACTGCGCAATGCTGTTAAGC	
BPTF-F	GGAGGGCAAAGAGGTACTGG	190
BPTF-R	GTCTTCTCTGTGCTGGTGCT	
CHD1-F	GGACTCTTGCTTACCCCGAG	135
CHD1-R	ACTCTCCTTTGATTCACCGGC	
HDAC1-F	CATCGCTGTGAATTGGGCTG	119
HDAC1-R	ACCCTCTGGTGATACTTTAGCAG	
HDAC2-F	CCCCCACGTTTCCCTCAG	177
HDAC2-R	ATAATTTCCAATATCACCGTCGTAG	
DROSHA-F	GACAGCTCCTTCAGTGTCTCT	90
DROSHA-R	CGGGAAAAGCAACCTGGAAA	
DGCR8-F	GACAGGCTTTCCAGATGGCT	114
DGCR8-R	GGCACCTTTCTTCTTCTACCTGA	
DICER1-F	GCTTGCTGGTGCCATTTACA	177
DICER1-R	GTTCTCTCAGCCGGGCTAAAT	
AGO2-F	ACCTAGACCCGACTTTGGGA	155
AGO2-R	TGTGTTCCACGATTTCCCTGT	
AGO1-F	GACCTCCGCACGGGTATATG	193
AGO1-R	CCACCTCGTAGTGGTACACG	
AGO4-F	GTCCTGGCCTTGGAACTGT	153
AGO4-R	CCATTGTATCTACTACCTCCCTGT	
TNRC6A-F	CGTAGAAAGAAATCTTAGCAGGGAT	168
TNRC6A-R	CTGAGGCTGGCTTACACTGG	
XPO5-F	AAGACCGGAAGCCCTTGATG	182
XPO5-R	ATCAGAATCTGCACCCAGCA	
TARBP2-F	ACGACCTTCTCAAAGCCGAG	198
TARBP2-R	GGGGAGAAAAAGAACTGCTGTC	
AGO3-F	GCAGGGAAGTGTGGTTTGGA	86
AGO3-R	AGGCAGTGGCAGAAACATCG	
TNRC6C-F	AGCAGCAACAATGGCAAACG	102
TNRC6C-R	TTCTGTTCTTGCTGGCGGAA	
TNRC6B-F	ACTACCCAACGTCAGCCTTG	81
TNRC6B-R	CCATGACTACCGCCTTGTCT	
ACTB-F	CTTCGCGGGCGACGAT	67
ACTB-R	CCACATAGGAATCCTTCTGACC	
GAPDH-F	GACAGTCAGCCGCATCTTCT	104
GAPDH-R	GCGCCCAATACGACCAAATC	
B2M-F	AAGATGAGTATGCCTGCCGT	81
B2M-R	CTGCTTACATGTCTCGATCCCA	
RPLP0-F	CGTCCTCGTGGAAGTGACAT	176
RPLP0-R	CTTGGAGCCCACATTGTCTG	
TBP-F	TCTTTGCAGTGACCCAGCATCA	139
TBP-R	AGAAACCCTTGCGCTGGAA	

Extracción de RNA con TRIzol:

1. Añadir **1 ml de TRIzol** a 50-100 mg de tejido o a células de un cultivo (aproximadamente 1 x 10^6 células).
2. Homogeneizar completamente la muestra usando un homogeneizador, un vórtex, o una pipeta para disgregar completamente la muestra en el TRIzol.
3. Dejar reposar la mezcla a temperatura ambiente durante **5 minutos** para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
4. Añadir **200 µl de cloroformo** por cada ml de TRIzol utilizado.
5. Tapar el tubo y agitar enérgicamente durante **15 segundos**.
6. Dejar reposar el tubo a temperatura ambiente durante **2-3 minutos**.
7. Centrifugar la muestra a **12,000 x g durante 15 minutos** a 4 °C. Tras la centrifugación, se observarán tres fases:
   - **Fase acuosa superior** (contiene el ARN).
   - **Fase intermedia** (contiene el ADN).
   - **Fase orgánica** (contiene proteínas y lípidos).
8. Transferir cuidadosamente la **fase acuosa** (superior) a un tubo limpio de microcentrífuga, evitando arrastrar las otras fases.
9. Añadir un volumen equivalente de **isopropanol** a la fase acuosa para precipitar el ARN.
10. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante **10 minutos**.
11. Centrifugar a **12,000 x g durante 10 minutos** a 4 °C para precipitar el ARN.
12. El RNA precipitado debe aparecer como un pequeño pellet blanco o transparente en el fondo del tubo.
13. Desechar con cuidado el sobrenadante y lavar el pellet de RNA añadiendo **1 ml de etanol al 70%** por cada ml de TRIzol utilizado al inicio.
14. Centrifugar a **7,500 x g durante 5 minutos** a 4 °C.
15. Desechar el etanol y secar el pellet de ARN al aire durante **5-10 minutos** (evita secar en exceso, ya que esto puede dificultar su resuspensión).

16. Resuspender el pellet de RNA en **20-50 µl de agua libre de nucleasas** o en un buffer adecuado para almacenamiento.

17. El RNA extraído puede almacenarse a **-80 °C** para su uso a largo plazo.

Conversión a cDNA

1. Descongelar los reactivos del kit high capacity en hielo.

2. Calcular el volumen de los componentes necesarios para preparar la transcripción inversa en un termociclador, como se muestra en la tabla:

Reactivo	Concentración del Stock	Volumen en µL
RT buffer	10X	2
25X dNTP Mix	100 mM	0.8
RT random primers	10X	2
MultiScribe reverse transcriptase	--	1
Agua libre de nucleasas	100%	4.2
Mezcla maestra 2X		10 µL

3. Coloque la mezcla maestra 2X RT en hielo y mezcle suavemente.

4. Pipetee 10 µL de mezcla maestra 2X RT en cada tubo individual o placa.

5. Pipetee 10 µL de muestra de RNA en cada pozo, pipeteando hacia arriba y hacia abajo dos veces para mezclar.

6. Centrifugar brevemente los tubos para reducir el contenido y para eliminar cualquier burbuja de aire.

7. Colocar la placa o los tubos en hielo hasta que esté listo para poner en el termociclador con las condiciones siguientes de reacción.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	25ºC	10:00 min	1 ciclo
2	37ºC	120 min	1 ciclo
3	85ºC	5:00 min	1 ciclo

8. Al termino de RT-PCR, colocar los tubos a -20°C hasta su uso.

Análisis de expresión génica por qPCR

La expresión génica se midió mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando el sistema de detección Step One Plus (Applied Biosystems™) en un formato de placa de 96 pocillos. Como controles internos se usaron tres genes: Microglobulina Beta-2 (B2M), Deshidrogenasa de Gliceraldehído 3-Fosfato (GAPDH) y Subunidad P0 de la Espiga Lateral de la Proteína Ribosomal (RPLPO). Estos genes también se utilizaron para la normalización de datos.

Se diseñaron primers (Tabla Suplementaria 1) para cada gen de interés de los 4 mecanismos epigeneticos (*DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, TET-1, TET-2, TET-3, MECP-2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 (*Metilación*), AGO1, AGO2, AGO3, AGO4, DGCR8, DICER, DROSHA, TARBP2,TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C, XPO5 (*Biogenesis miRNA*), BMI1, EED, EP300, EZH1, EZH2, KDM5B, KDM6A, PPCGF1, PCGF2, PCRF6, RING1, RNF2, SUZ12, CREBBP, HDAC2, KMT2A, KMT2C, KMT2D, SIRT1 (*Modificación de Histonas*), ARID1B, BPTF, BRD7, CHD1, CHD4, CDH5, CHD7, DPF1, HDAC2-2, PBRM1, PHF10, SMARCA2, ARID2, SMARCA4 (*Regulación de la Cromatina), fueron obtenidas de Applied Biosystems. El protocolo de la reacción de qPCR fue el siguiente:

Paso	Descripción	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización	95ºC	5:00 min	1 ciclo
2	Desnaturalización	95ºC	0:30 seg	50 ciclos
	Alineamiento	60ºC	0:30 seg	
	Extensión	72ºC	0:30 min	
3	Extensión final	60ºC	30:00 min	1 ciclo
	Paso final	25ºC	2:00 min	

Los valores de cuantificación relativa de ARNm se obtuvieron mediante el método de comparación 2^-ΔΔCt. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real sensible a metilación (MS-qPCR)

1. Preparación de las reacciones de digestión:
2. Para analizar el estado de metilación del ADN, prepara tres reacciones:
   - Sin enzima (Control negativo).
   - Digestión con MspI.
   - Digestión con HpaII.

- Cada reacción debe contener los siguientes componentes en un volumen total de 20 µL:
  - ADN: 200-500 ng (dependiendo de la concentración de la muestra).
  - 10X Buffer de digestión: 2 µL.
  - Enzima de restricción (para las reacciones con enzima): 1 µL de MspI o HpaII.
  - Agua nuclease-free: hasta completar 20 µL.

2. Incubación:

- Incuba cada mezcla de reacción en el termociclador a 37°C durante 1-2 horas.
- Después de la digestión, inactiva las enzimas mediante incubación a 65°C durante 20 minutos.

Análisis de MS-qPCR

Para el análisis de la metilación de CpG en un locus CCGG específico mediante qPCR, se realizó lo siguiente:

- Para qPCR, se diseñaron cebadores que flanquean el sitio CCGG de los genes de interés (sitios promotores, islas CpG, sitios factores de transcripción).
- Se utilizó 1-2 µL (2-40 ng) de la plantilla preparada (digestión con enzimas sensibles a metilación).

Recomendaciones para qPCR

- A continuación, se recomiendan los parámetros para qPCR utilizando Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific (#K0221/2/3).

Prepare una mezcla maestra de la reacción añadiendo los siguientes componentes

Reactivos	Volumen (µL)
Maxima™ SYBR Green Master Mix	10
Primer Forward	0.5
Primer Reverse	0.5
Muestra de ADN	1 (2-40 ng)
Agua	cbp 20
Volumen final	20

Programa del termociclador:

Paso	Descripción	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	94ºC	10:00 min	1 ciclo
2	Desnaturalización	94ºC	0:15 seg	40 ciclos
	Alineamiento	60ºC	0:15 seg	
	Extensión	72ºC	0:30 seg	

Interpretación de los datos

Cálculo del porcentaje de 5-mC

$$\% \text{ de 5-mC} = 100/(1+E)^{Cq2-Cq1}$$

Donde:
Cq1 es el ciclo de amplificación de la muestra ADN no digerido
Cq2 es el ciclo de amplificación de la muestra digerida con Epi HpaII Cq3 es el ciclo de amplificación de la muestra digerida con Epi MspI E es el valor de eficiencia de la PCR

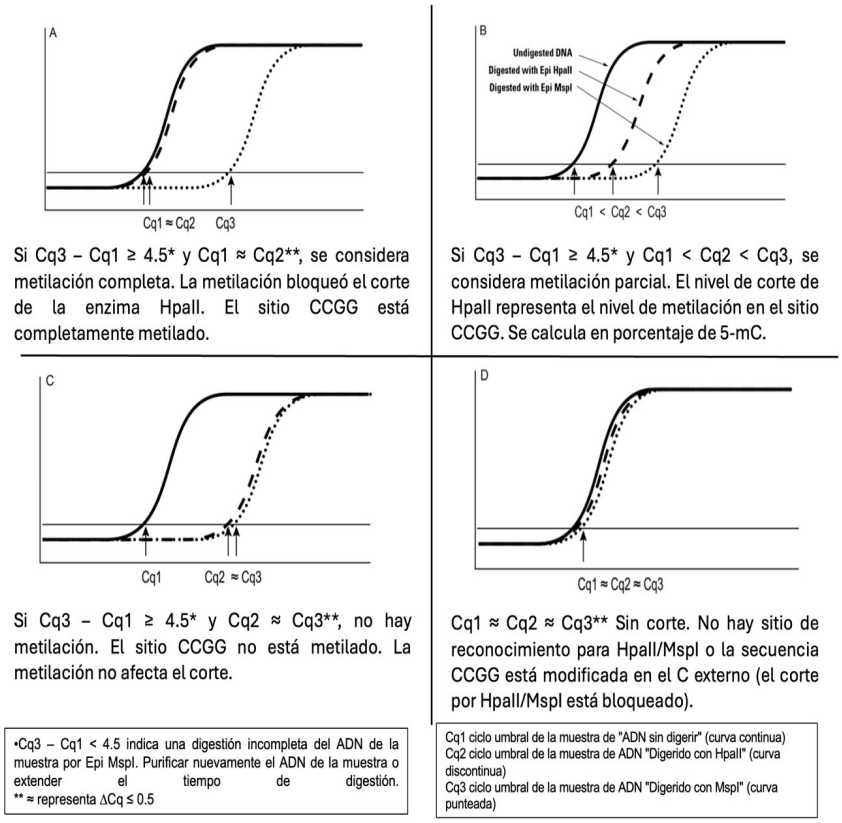


Figura suplementaria 2: Esquema de interpretación de **MS-qPCR.**

Tabla Suplementaria 2: Primers diseñados para la validación de regiones metiladas en la cohorte de seguimiento.

Nombre Cebador	Secuencia cebador (5'-3')	Tamaño de producto en pb
F-PRKCZ	GTGTGGAGGGGCTTGCT	174
R-PRKCZ	CGAGGACCTCCATGCG	
F-CpG64	GAGCAGACCTTCCAGACACC	139
R-CpG64	GTTCAGTTCTGAGCCCGGAT	
F-GH01J086772	TTGCATTATAGCCTCAGTCCTGT	226
R-GH01J086772	GGAATGCACTGTTTGCCAAGAT	
F-GH10J100004	TAACTCCTGACCAACAAGAC	229
R-GH10J100004	ATGGATTACCTACAACATGG	
F-CpG152	CGGCTCGCATTGCTCC	239
R-CpG152	ACCTGTTGTAGCCGCCTG	
F-CpG209	TTCTTCATCGCACTTGCGG	192
R-CpG209	GAACCGAGCTGGATGCCC	
F-CpG100	ACCCCCTTAGTAGCGTCCTT	155
R-CpG100	CTGCCTCTCTGCAGACCAC	
F-CpG46	GGGTGCTTGGTGCCATCTAC	137
R-CpG46	ATGGAGGACACGAATACAGGC	
F-MAP2K3-1	CGTGAACTCACAGGAGCAGA	225
R-MAP2K3-1	CTGCCAGTATGCCAGGTGTC	
F-MAP2K3-2	TGGGGACACCTGGCATACT	200
R-MAP2K3-2	GGGATGCGAATGGTCACACA	
F-CpG116	TGTGGTATACGGGCTTGACG	196
R-CpG116	GTGAGCTTCCAGAAGACGGT	
F-GH17J078733	AGCATTACAACACCACCATCTG	221
R-GH17J078733	GCAGGGTCTGTAGAACTTCCTT	
F-CpG198	AAGCATAAGCTCCACAAAAGCAA	250
R-CpG198	TTTCTCCCTCAGCCGCCC	
F-CpG79-1	GGACTCTGGTGTGACATGGG	168
R-CpG79-1	CCACCCTGAGACTACTCGGA	
F-CpG79-2	GCAAAAACCGCCTACGTC	192
R-CpG79-2	GTCACCCGATCCCAGACC	
F-CpG39	CAGAGGTGTTGGGTGACCTCG	128
R-CpG39	GAATCCTCAGCGGCATGACAAG	
F-CpG33	TAAAGCTCCTCCAGCAGACC	233
R-CpG33	CTGATGCAAGGCATCCAGGT	
F-CpG24	ACCAAGATGTGGGGTCCTCC	135
R-CpG24	CGCCGATCCTCACAAACCAA	
F-GH05J035861	ACAAGCCCTGAATTCCAGTT	80
R-GH05J035861	AAGGACTGCAGCAGAAAGCA	
F-ZFPM2	GGGTTCACGCCATTCTCCTG	263
R-ZFPM2	CGGGTGGATCATGAGGTCAG	
F-CpG30	GTGGCAATGGCAAGACC	219
R-CpG30	TACAGGAATGGAAGAGCCCC	
F-CpG22	GAGGTGAGTGCAGACGAGAG	215
R-CpG22	ACAGGGGAAAGGTGTGCTTG	
F-CpG74	AGGGGGCAGGAAAAACACC	201
R-CpG74	TGTGCGGTCGTGGTGC	
F-GH0XJ068496	TTGGGGCTTGAGCCCGTC	101
R-GH0XJ068496	CACGGCACCTCTAGGAAAGAG	
F-CpG675	GACAGGGTGGCAAGTCTCAA	151
R-CpG675	TTGCGTCCTAGGGAGGAAGG	
F-GH01J008115	CTGAACAAAAGAACGTGCCAG	139
R-GH01J008115	GTAAACCAAGGACACTTCACCC	
F-GH22J027789	TTGGGTCCCTACGATGATGC	162
R-GH22J027789	GACTTGTCCTAGCCACAGCA	

ANEXO B

Tabla Suplementaria 3: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_VCHIK_1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	71.046	70.511	72.312	70.712
NC_000002.12	72.742	72.244	73.938	72.436
NC_000003.12	72.493	71.572	73.776	72.192
NC_000004.12	72.302	71.478	73.633	71.995
NC_000005.10	71.548	69.429	72.634	71.373
NC_000006.12	70.521	69.21	71.713	70.272
NC_000007.14	71.066	69.992	72.292	70.788
NC_000008.11	68.258	64.887	69.039	68.248
NC_000009.12	68.636	68.615	70.088	68.216
NC_000010.11	72.58	72.082	73.96	72.212
NC_000011.10	70.919	69.796	72.131	70.64
NC_000012.12	71.308	70.714	72.725	70.945
NC_000013.11	72.546	71.329	73.675	72.313
NC_000014.9	69.222	67.612	70.135	69.066
NC_000015.10	66.075	64.762	67.156	65.846
NC_000016.10	66.017	65.679	67.165	65.684
NC_000017.11	64.716	63.665	65.966	64.411
NC_000018.10	69.212	67.144	70.259	69.052
NC_000019.10	66.741	67.102	68.374	66.139
NC_000020.11	72.81	71.954	74.235	72.438
NC_000021.9	62.838	59.084	63.593	62.908
NC_000022.11	65.584	65.852	67.367	64.953

Tabla Suplementaria 4: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_CTL_2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	70.656	72.327	72.768	69.926
NC_000002.12	71.988	73.698	74.018	71.313
NC_000003.12	71.523	72.706	73.63	70.876
NC_000004.12	70.956	72.417	73.094	70.309
NC_000005.10	70.471	70.476	72.358	69.952
NC_000006.12	69.471	70.342	71.45	68.875
NC_000007.14	70.466	71.618	72.515	69.802
NC_000008.11	67.425	66.071	68.961	67.077
NC_000009.12	68.359	70.593	70.651	67.543
NC_000010.11	72.212	73.831	74.446	71.45
NC_000011.10	70.478	71.616	72.548	69.803
NC_000012.12	70.625	72.189	72.835	69.896
NC_000013.11	71.305	72.299	73.242	70.724
NC_000014.9	68.595	69.065	70.297	68.077
NC_000015.10	65.882	66.491	67.711	65.298
NC_000016.10	66.433	67.893	68.347	65.697
NC_000017.11	65.377	66.136	67.39	64.655
NC_000018.10	68.302	68.119	70.073	67.819
NC_000019.10	68.161	70.231	70.541	67.106
NC_000020.11	72.955	74.187	75.241	72.159
NC_000021.9	62.494	60.608	64.042	62.191
NC_000022.11	66.831	68.778	69.409	65.765

Tabla Suplementaria 5: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_CHIK1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	73.208	71.66	74.02	73.075
NC_000002.12	75.907	74.353	76.657	75.79
NC_000003.12	76.022	74.185	76.895	75.886
NC_000004.12	77.088	75.139	78.004	76.952
NC_000005.10	75.136	72.077	75.82	75.126
NC_000006.12	73.988	71.635	74.798	73.907
NC_000007.14	73.286	71.125	74.045	73.215
NC_000008.11	71.457	67.081	71.813	71.627
NC_000009.12	71.826	70.661	72.798	71.623
NC_000010.11	74.826	73.431	75.833	74.628
NC_000011.10	73.167	71.011	73.893	73.096
NC_000012.12	73.996	72.24	74.98	73.831
NC_000013.11	76.868	74.685	77.605	76.798
NC_000014.9	71.776	69.092	72.265	71.811
NC_000015.10	67.575	65.705	68.326	67.482
NC_000016.10	66.875	65.831	67.684	66.711
NC_000017.11	65.033	63.388	65.959	64.889
NC_000018.10	72.272	69.232	72.899	72.29
NC_000019.10	67.321	67.219	68.617	66.888
NC_000020.11	73.642	72.088	74.726	73.428
NC_000021.9	65.352	60.652	65.701	65.613
NC_000022.11	65.266	65.262	66.771	64.757

Tabla Suplementaria 6: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_DENV2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	67.369	66.452	68.467	67.11
NC_000002.12	70.531	69.568	71.54	70.306
NC_000003.12	70.724	69.459	71.813	70.495
NC_000004.12	72.148	70.706	73.258	71.933
NC_000005.10	69.968	67.455	70.888	69.862
NC_000006.12	69.001	67.174	70.034	68.827
NC_000007.14	68.06	66.421	69.079	67.88
NC_000008.11	66.473	62.857	67.085	66.524
NC_000009.12	66.206	65.48	67.39	65.912
NC_000010.11	69.16	68.464	70.401	68.846
NC_000011.10	67.444	65.726	68.466	67.259
NC_000012.12	68.636	67.371	69.889	68.364
NC_000013.11	71.953	70.274	72.915	71.793
NC_000014.9	66.338	64.179	67.056	66.274
NC_000015.10	62.19	60.956	63.188	61.981
NC_000016.10	60.932	60.57	62.028	60.618
NC_000017.11	58.978	58.078	60.265	58.648
NC_000018.10	67.418	64.932	68.28	67.336
NC_000019.10	60.27	60.938	62.086	59.57
NC_000020.11	67.374	66.627	68.82	66.987
NC_000021.9	60.557	56.364	61.112	60.719
NC_000022.11	58.589	59.349	60.491	57.87

Tabla Suplementaria 7: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_CTL1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	74.36	75.157	76.338	73.728
NC_000002.12	76.427	77.321	78.353	75.832
NC_000003.12	76.181	76.671	78.197	75.599
NC_000004.12	76.649	77.273	78.713	76.068
NC_000005.10	75.204	74.397	76.977	74.764
NC_000006.12	74.117	74.022	75.979	73.611
NC_000007.14	74.02	74.279	75.934	73.454
NC_000008.11	71.703	69.514	73.122	71.441
NC_000009.12	72.788	74.027	74.912	72.089
NC_000010.11	75.993	76.876	78.168	75.299
NC_000011.10	74.144	74.377	76.045	73.577
NC_000012.12	74.703	75.271	76.795	74.072
NC_000013.11	76.549	76.747	78.368	76.047
NC_000014.9	72.438	72.137	74.04	71.999
NC_000015.10	68.956	69.112	70.747	68.415
NC_000016.10	68.987	69.603	70.808	68.356
NC_000017.11	67.507	67.537	69.434	66.882
NC_000018.10	72.364	71.23	74.054	71.965
NC_000019.10	70.474	71.797	72.727	69.549
NC_000020.11	75.771	76.294	77.969	75.055
NC_000021.9	65.92	63.037	67.291	65.745
NC_000022.11	68.689	70.004	71.235	67.696

Tabla Suplementaria 8: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_CHIK2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	73.731	71.004	74.399	73.719
NC_000002.12	76.35	73.694	76.991	76.331
NC_000003.12	76.511	73.62	77.302	76.457
NC_000004.12	77.388	74.36	78.225	77.332
NC_000005.10	75.559	71.386	76.167	75.635
NC_000006.12	74.415	71.005	75.129	74.423
NC_000007.14	73.613	70.24	74.229	73.666
NC_000008.11	71.832	66.519	72.11	72.083
NC_000009.12	72.135	69.727	72.962	72.058
NC_000010.11	75.31	72.783	76.17	75.232
NC_000011.10	73.664	70.167	74.21	73.732
NC_000012.12	74.437	71.559	75.293	74.382
NC_000013.11	77.104	73.834	77.752	77.123
NC_000014.9	72.189	68.474	72.549	72.329
NC_000015.10	68.132	65.099	68.756	68.159
NC_000016.10	67.006	64.695	67.575	67.03
NC_000017.11	65.36	62.412	66.073	65.408
NC_000018.10	72.543	68.356	73.06	72.665
NC_000019.10	67.294	65.606	68.281	67.15
NC_000020.11	74.128	71.252	74.995	74.081
NC_000021.9	65.422	59.504	65.574	65.834
NC_000022.11	65.396	63.958	66.618	65.125

Tabla Suplementaria 9: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_CTL2

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	74.39	74.094	75.733	74.017
NC_000002.12	76.911	76.611	78.197	76.568
NC_000003.12	76.802	76.188	78.165	76.462
NC_000004.12	77.669	77.006	79.108	77.324
NC_000005.10	75.884	73.96	77.071	75.67
NC_000006.12	74.766	73.517	76.05	74.488
NC_000007.14	74.279	73.373	75.584	73.967
NC_000008.11	72.264	69.006	73.127	72.223
NC_000009.12	72.895	73.027	74.427	72.442
NC_000010.11	75.98	75.831	77.549	75.532
NC_000011.10	74.23	73.25	75.51	73.921
NC_000012.12	74.947	74.527	76.461	74.545
NC_000013.11	77.447	76.388	78.712	77.168
NC_000014.9	72.757	71.244	73.748	72.573
NC_000015.10	68.912	68.105	70.146	68.603
NC_000016.10	68.264	68.165	69.566	67.86
NC_000017.11	66.626	65.936	68.061	66.228
NC_000018.10	72.996	70.941	74.125	72.811
NC_000019.10	68.901	69.71	70.741	68.176
NC_000020.11	75.11	74.694	76.739	74.641
NC_000021.9	66.255	62.513	67.108	66.297
NC_000022.11	67.176	67.93	69.291	66.385

Tabla Suplementaria 10: Cobertura efectiva del genoma completo en SINO_CTL_1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	70.549	72.186	72.651	69.825
NC_000002.12	72.033	73.753	74.104	71.347
NC_000003.12	71.576	72.849	73.746	70.906
NC_000004.12	71.127	72.606	73.417	70.44
NC_000005.10	70.608	70.725	72.565	70.063
NC_000006.12	69.59	70.45	71.649	68.973
NC_000007.14	70.484	71.704	72.58	69.801
NC_000008.11	67.407	65.995	69.003	67.046
NC_000009.12	68.007	70.153	70.304	67.196
NC_000010.11	72.079	73.65	74.299	71.325
NC_000011.10	70.328	71.426	72.414	69.652
NC_000012.12	70.534	72.091	72.799	69.79
NC_000013.11	71.214	72.479	73.289	70.58
NC_000014.9	68.422	68.92	70.17	67.889
NC_000015.10	65.563	66.134	67.376	64.987
NC_000016.10	66.074	67.377	67.899	65.381
NC_000017.11	64.881	65.619	66.812	64.187
NC_000018.10	68.147	67.878	69.994	67.648
NC_000019.10	67.661	69.743	69.928	66.643
NC_000020.11	72.518	73.718	74.738	71.744
NC_000021.9	62.079	60.344	63.678	61.749
NC_000022.11	65.896	67.821	68.393	64.859

Tabla Suplementaria 11: Cobertura efectiva del genoma completo en BLOOD_DENV1

CHR	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
NC_000001.11	66.311	62.939	66.704	66.423
NC_000002.12	69.81	66.587	70.178	69.903
NC_000003.12	70.291	66.903	70.837	70.333
NC_000004.12	71.838	68.206	72.428	71.881
NC_000005.10	69.554	64.938	69.939	69.717
NC_000006.12	68.593	64.722	69.088	68.689
NC_000007.14	67.154	63.131	67.485	67.332
NC_000008.11	66.016	60.373	66.098	66.342
NC_000009.12	65.068	61.85	65.559	65.145
NC_000010.11	68.262	65.293	68.838	68.297
NC_000011.10	66.561	62.474	66.884	66.731
NC_000012.12	67.823	64.234	68.434	67.884
NC_000013.11	71.528	67.739	71.948	71.639
NC_000014.9	65.496	61.048	65.646	65.745
NC_000015.10	61.06	57.789	61.452	61.172
NC_000016.10	59.225	56.469	59.552	59.367
NC_000017.11	57.064	53.85	57.558	57.208
NC_000018.10	66.877	62.481	67.232	67.058
NC_000019.10	57.429	55.584	58.296	57.343
NC_000020.11	65.838	62.55	66.485	65.89
NC_000021.9	59.603	53.485	59.486	60.107
NC_000022.11	56.013	54.517	57.01	55.824

ANEXO C

Tabla Suplementaria 12: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_VCHIK_1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	63.04	62.892	63.163	63.019
Down2k	62.072	59.978	62.813	62.027
Up2k	60.532	58.283	61.497	60.554
mRNA	68.151	66.492	68.929	68.042
repeat	65.395	65.337	66.448	65.09
CpGIsland	52.806	53.279	53.931	51.967

Tabla Suplementaria 13: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_CTL_2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	65.56	67.186	66.115	64.971
Down2k	62.905	62.6	64.394	62.452
Up2k	62.536	63.431	64.269	61.801
mRNA	68.058	68.579	69.627	67.55
repeat	64.848	66.552	66.646	64.201
CpGIsland	58.187	59.302	59.497	56.886

Tabla Suplementaria 14: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_CHIK1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	62.964	61.692	62.789	63.315
Down2k	62.917	60.044	63.301	63.06
Up2k	61.598	58.393	62.209	61.892
mRNA	69.969	67.289	70.315	70.066
repeat	68.278	67.489	68.995	68.123
CpGIsland	52.713	52.646	53.573	52.317

Tabla Suplementaria 15: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_DENV2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	56.872	55.52	57.052	57.089
Down2k	57.216	54.824	57.879	57.225
Up2k	55.197	51.859	56.155	55.393
mRNA	64.543	62.355	65.172	64.519
repeat	63.096	63.146	64.057	62.811
CpGIsland	46.208	46.488	47.266	45.511

Tabla Suplementaria 16: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_CTL1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	67.199	68.041	67.665	66.817
Down2k	65.154	64.094	66.505	64.817
Up2k	64.991	65.342	66.607	64.382
mRNA	71.228	70.874	72.655	70.827
repeat	69.095	69.952	70.814	68.531
CpGIsland	59.608	60.387	60.862	58.528

Tabla Suplementaria 17: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_CHIK2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	62.012	59.474	61.619	62.729
Down2k	63.136	58.987	63.296	63.471
Up2k	61.667	57.341	61.999	62.234
mRNA	70.255	66.359	70.425	70.497
repeat	68.69	66.598	69.262	68.67
CpGIsland	50.573	50.074	51.097	50.594

Tabla Suplementaria 18: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_CTL2

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	65.872	66.193	66.127	65.694
Down2k	64.482	62.724	65.391	64.353
Up2k	63.536	62.471	64.693	63.306
mRNA	71.152	69.743	72.013	70.999
repeat	69.303	69.341	70.487	68.953
CpGIsland	57.507	58.054	58.698	56.591

Tabla Suplementaria 19: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en SINO_CTL_1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	65.339	66.934	65.859	64.772
Down2k	62.573	62.391	64.012	62.124
Up2k	61.961	62.474	63.607	61.315
mRNA	67.762	68.276	69.344	67.25
repeat	64.984	66.639	66.762	64.346
CpGIsland	57.856	58.868	59.201	56.596

Tabla Suplementaria 20: Cobertura efectiva de algunos tipos de elementos en BLOOD_DENV1_1

	Coverage of C (%)	Coverage of CG (%)	Coverage of CHG (%)	Coverage of CHH (%)
CDS	53.029	49.559	52.556	53.982
Down2k	55.434	50.79	55.38	55.884
Up2k	52.949	47.143	53.148	53.793
mRNA	63.338	58.744	63.27	63.703
repeat	62.377	60.166	62.73	62.429
CpGIsland	40.55	40.05	41.097	40.559

ANEXO D

Nivel medio de metilación del genoma completo

El nivel medio de metilación del genoma completo revela las características generales del metiloma. El nivel de metilación se determinó por la proporción del número de lecturas que apoyan la metilación al número de lecturas que cubren cierto sitio de citosina. En general, la metilación de CG se encuentra tanto en los genes como en las repeticiones, y está involucrada en la regulación de la expresión génica. Los dos tipos de metilación no-CG, CHG y CHH, están mayormente ausentes dentro de los genes y se encuentran principalmente en regiones intergénicas y ricas en repeticiones del genoma, y juegan un papel crítico en el silenciamiento de los transposones.

Tabla Suplementaria 21: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_VCHIK_2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.918	66.587	3.444	3.587
NC_000002.12	6.867	68.259	3.441	3.507
NC_000003.12	6.602	67.393	3.437	3.527
NC_000004.12	6.637	64.24	3.509	3.598
NC_000005.10	6.564	63.56	3.423	3.533
NC_000006.12	6.852	68.38	3.455	3.521
NC_000007.14	7.164	67.556	3.45	3.516
NC_000008.11	6.606	65.352	3.413	3.521
NC_000009.12	7.238	68.626	3.434	3.519
NC_000010.11	7.345	67.161	3.456	3.521
NC_000011.10	6.93	67.172	3.407	3.516
NC_000012.12	7.121	69.008	3.437	3.505
NC_000013.11	6.863	64.371	3.416	3.548
NC_000014.9	6.921	67.06	3.441	3.513
NC_000015.10	7.234	69.788	3.462	3.496
NC_000016.10	9.775	58.098	3.46	3.704
NC_000017.11	8.445	69.541	3.442	3.502
NC_000018.10	6.893	65.931	3.416	3.547
NC_000019.10	9.255	69.415	3.459	3.468
NC_000020.11	7.4	65.72	3.433	3.55
NC_000021.9	7.104	62.79	3.413	3.481
NC_000022.11	8.538	69.291	3.444	3.472

Tabla Suplementaria 22: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_VCHIK_1.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.822	66.539	3.688	3.823
NC_000002.12	6.838	68.334	3.726	3.798
NC_000003.12	6.585	67.262	3.709	3.786
NC_000004.12	6.644	64.446	3.822	3.921
NC_000005.10	6.561	63.691	3.737	3.834
NC_000006.12	6.819	68.047	3.754	3.813
NC_000007.14	7.069	67.378	3.67	3.759
NC_000008.11	6.621	65.014	3.735	3.818
NC_000009.12	7.17	69.006	3.664	3.754
NC_000010.11	7.335	67.115	3.786	3.863
NC_000011.10	6.907	67.399	3.689	3.797
NC_000012.12	7.159	68.923	3.786	3.863
NC_000013.11	6.848	63.938	3.684	3.822
NC_000014.9	6.819	67.042	3.681	3.735
NC_000015.10	7.16	69.684	3.687	3.755
NC_000016.10	9.682	57.764	3.753	3.949
NC_000017.11	8.391	70.471	3.701	3.768
NC_000018.10	6.898	65.932	3.693	3.79
NC_000019.10	9.278	70.833	3.725	3.733
NC_000020.11	7.358	66.215	3.706	3.824
NC_000021.9	7.001	62.719	3.676	3.752
NC_000022.11	8.448	70.195	3.671	3.683

T

Tabla Suplementaria 23: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_CTL_2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.875	66.996	3.408	3.52
NC_000002.12	7.003	68.746	3.384	3.461
NC_000003.12	6.735	67.939	3.404	3.464
NC_000004.12	6.747	65.194	3.43	3.53
NC_000005.10	6.683	64.439	3.39	3.475
NC_000006.12	6.972	68.734	3.406	3.471
NC_000007.14	7.322	68.147	3.382	3.456
NC_000008.11	6.722	65.853	3.379	3.458
NC_000009.12	7.374	68.858	3.384	3.448
NC_000010.11	7.419	67.645	3.397	3.457
NC_000011.10	7.076	67.777	3.37	3.458
NC_000012.12	7.269	69.279	3.395	3.449
NC_000013.11	6.947	65.152	3.375	3.481
NC_000014.9	7.06	67.351	3.379	3.445
NC_000015.10	7.347	69.958	3.399	3.442
NC_000016.10	9.462	59.961	3.415	3.581
NC_000017.11	8.51	69.7	3.397	3.446
NC_000018.10	7.009	66.683	3.376	3.481
NC_000019.10	9.324	69.145	3.417	3.404
NC_000020.11	7.477	66.245	3.388	3.465
NC_000021.9	7.299	63.984	3.399	3.429
NC_000022.11	8.603	69.278	3.421	3.393

Tabla Suplementaria 24: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_CHIK1

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.506	83.684	2.673	2.806
NC_000002.12	6.268	83.933	2.644	2.731
NC_000003.12	6.045	83.464	2.65	2.732
NC_000004.12	5.994	82.867	2.672	2.751
NC_000005.10	6.101	83.434	2.629	2.722
NC_000006.12	6.197	83.649	2.656	2.725
NC_000007.14	6.644	84.162	2.657	2.738
NC_000008.11	6.193	83.412	2.627	2.726
NC_000009.12	6.632	83.822	2.649	2.73
NC_000010.11	6.98	84.321	2.67	2.737
NC_000011.10	6.305	82.902	2.632	2.715
NC_000012.12	6.465	83.919	2.648	2.722
NC_000013.11	6.422	82.025	2.648	2.749
NC_000014.9	6.382	83.862	2.634	2.725
NC_000015.10	6.743	83.866	2.685	2.721
NC_000016.10	10.668	84.684	2.712	2.932
NC_000017.11	8.015	83.303	2.682	2.75
NC_000018.10	6.502	83.597	2.666	2.747
NC_000019.10	9.145	83.698	2.707	2.714
NC_000020.11	7.036	82.68	2.662	2.755
NC_000021.9	6.78	82.244	2.661	2.735
NC_000022.11	8.373	84.055	2.684	2.715

Tabla Suplementaria 25: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_DENV2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	8.489	83.73	3.165	3.304
NC_000002.12	6.909	83.326	3.11	3.175
NC_000003.12	6.656	82.767	3.105	3.179
NC_000004.12	6.66	81.602	3.153	3.227
NC_000005.10	6.781	82.813	3.113	3.194
NC_000006.12	6.829	83.2	3.115	3.172
NC_000007.14	7.284	83.56	3.118	3.193
NC_000008.11	6.831	82.603	3.131	3.206
NC_000009.12	7.306	83.679	3.133	3.198
NC_000010.11	7.777	83.898	3.13	3.202
NC_000011.10	6.967	82.459	3.136	3.206
NC_000012.12	7.15	83.622	3.139	3.194
NC_000013.11	6.993	81.445	3.1	3.218
NC_000014.9	7.02	83.413	3.15	3.2
NC_000015.10	7.446	83.465	3.139	3.184
NC_000016.10	12.435	85.183	3.215	3.496
NC_000017.11	8.843	83.176	3.144	3.221
NC_000018.10	7.121	82.981	3.128	3.213
NC_000019.10	10.011	84.065	3.174	3.183
NC_000020.11	7.781	82.219	3.13	3.247
NC_000021.9	7.506	81.558	3.136	3.207
NC_000022.11	9.203	84.004	3.188	3.197

Tabla Suplementaria 26: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_CTL1.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	8.399	82.869	3.35	3.476
NC_000002.12	7.431	83.282	3.32	3.418
NC_000003.12	7.187	83.048	3.332	3.436
NC_000004.12	7.158	82.605	3.343	3.453
NC_000005.10	7.225	82.798	3.315	3.422
NC_000006.12	7.377	83.108	3.329	3.426
NC_000007.14	7.841	83.543	3.326	3.421
NC_000008.11	7.323	83.039	3.312	3.417
NC_000009.12	7.801	82.576	3.327	3.421
NC_000010.11	8.067	83.47	3.329	3.426
NC_000011.10	7.451	81.795	3.31	3.41
NC_000012.12	7.651	83.265	3.33	3.409
NC_000013.11	7.563	82.259	3.315	3.449
NC_000014.9	7.553	82.856	3.323	3.412
NC_000015.10	7.839	82.764	3.335	3.413
NC_000016.10	10.934	83.786	3.344	3.563
NC_000017.11	8.975	81.649	3.344	3.394
NC_000018.10	7.636	83.559	3.346	3.442
NC_000019.10	9.861	80.947	3.353	3.348
NC_000020.11	8.115	81.707	3.332	3.425
NC_000021.9	7.974	81.678	3.322	3.393
NC_000022.11	9.28	82.962	3.353	3.352

Tabla Suplementaria 27: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_CHIK2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.247	82.885	2.864	2.984
NC_000002.12	6.141	83.157	2.843	2.908
NC_000003.12	5.944	82.702	2.844	2.911
NC_000004.12	5.898	82.2	2.852	2.936
NC_000005.10	5.974	82.61	2.82	2.909
NC_000006.12	6.073	82.747	2.835	2.901
NC_000007.14	6.428	83.151	2.839	2.914
NC_000008.11	6.083	82.564	2.82	2.918
NC_000009.12	6.429	83.054	2.837	2.911
NC_000010.11	6.763	83.545	2.849	2.918
NC_000011.10	6.105	81.904	2.812	2.894
NC_000012.12	6.295	83.019	2.833	2.909
NC_000013.11	6.321	81.149	2.812	2.931
NC_000014.9	6.185	82.782	2.819	2.897
NC_000015.10	6.542	82.93	2.846	2.91
NC_000016.10	10.16	84.037	2.898	3.104
NC_000017.11	7.556	82.09	2.874	2.928
NC_000018.10	6.392	82.821	2.849	2.935
NC_000019.10	8.303	81.761	2.869	2.868
NC_000020.11	6.761	81.449	2.839	2.935
NC_000021.9	6.504	81.062	2.848	2.908
NC_000022.11	7.714	82.287	2.873	2.885

Tabla Suplementaria 28: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_CTL2.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	8.328	83.787	3.362	3.473
NC_000002.12	7.27	84.307	3.331	3.399
NC_000003.12	7.011	83.863	3.327	3.404
NC_000004.12	6.958	83.585	3.339	3.428
NC_000005.10	7.07	83.798	3.32	3.407
NC_000006.12	7.186	84.081	3.331	3.395
NC_000007.14	7.674	84.602	3.35	3.41
NC_000008.11	7.175	83.974	3.328	3.404
NC_000009.12	7.649	83.926	3.327	3.41
NC_000010.11	7.936	84.519	3.345	3.405
NC_000011.10	7.296	83.097	3.311	3.393
NC_000012.12	7.491	84.178	3.337	3.399
NC_000013.11	7.337	82.928	3.308	3.432
NC_000014.9	7.375	84.215	3.334	3.395
NC_000015.10	7.742	83.861	3.353	3.399
NC_000016.10	11.157	84.676	3.388	3.588
NC_000017.11	9.053	83.29	3.363	3.407
NC_000018.10	7.457	84.263	3.331	3.429
NC_000019.10	10.162	83.024	3.398	3.38
NC_000020.11	8.022	82.756	3.347	3.42
NC_000021.9	7.88	82.877	3.367	3.406
NC_000022.11	9.442	83.987	3.373	3.375

Tabla Suplementaria 29: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra SINO_CTL_1.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	8.147	67.385	3.526	3.656
NC_000002.12	7.152	68.989	3.514	3.583
NC_000003.12	6.894	68.02	3.523	3.592
NC_000004.12	6.893	65.557	3.564	3.66
NC_000005.10	6.828	64.65	3.515	3.594
NC_000006.12	7.122	68.743	3.524	3.59
NC_000007.14	7.52	68.441	3.512	3.58
NC_000008.11	6.884	65.896	3.504	3.59
NC_000009.12	7.552	69.508	3.521	3.57
NC_000010.11	7.616	67.793	3.523	3.585
NC_000011.10	7.241	68.06	3.495	3.587
NC_000012.12	7.449	69.593	3.527	3.582
NC_000013.11	7.121	65.085	3.504	3.622
NC_000014.9	7.22	67.636	3.515	3.571
NC_000015.10	7.529	70.226	3.52	3.567
NC_000016.10	9.868	59.533	3.551	3.74
NC_000017.11	8.851	70.716	3.548	3.581
NC_000018.10	7.174	66.744	3.507	3.616
NC_000019.10	9.784	70.778	3.544	3.523
NC_000020.11	7.669	66.688	3.507	3.606
NC_000021.9	7.475	64.321	3.514	3.564
NC_000022.11	8.971	70.814	3.526	3.535

Tabla Suplementaria 30: Nivel medio de metilación de cada cromosoma (%), en la muestra BLOOD_DENV1.

Chr	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
NC_000001.11	7.822	83.061	3.013	3.149
NC_000002.12	6.183	82.325	2.989	3.031
NC_000003.12	5.98	81.591	2.986	3.049
NC_000004.12	5.994	80.655	3.01	3.065
NC_000005.10	6.061	81.758	2.984	3.027
NC_000006.12	6.118	82.242	2.997	3.022
NC_000007.14	6.461	82.313	2.992	3.041
NC_000008.11	6.128	81.584	2.975	3.04
NC_000009.12	6.455	82.5	2.984	3.041
NC_000010.11	7.018	83.166	3.017	3.053
NC_000011.10	6.126	81.459	2.976	3.02
NC_000012.12	6.315	82.611	2.972	3.034
NC_000013.11	6.387	80.223	2.974	3.055
NC_000014.9	6.196	82.294	2.979	3.03
NC_000015.10	6.653	82.536	3.034	3.033
NC_000016.10	12.086	84.526	3.104	3.356
NC_000017.11	7.645	81.87	3.019	3.055
NC_000018.10	6.464	81.851	3.021	3.058
NC_000019.10	8.358	82.753	3.05	3.026
NC_000020.11	6.844	81.013	3.004	3.086
NC_000021.9	6.519	79.977	3	3.024
NC_000022.11	7.823	82.462	3.049	3.026

ANEXO E

Tabla Suplementaria 31: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_VCHIK_1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.07	57.792	4.624	5.346
Down2k	8.168	72.006	3.685	3.723
Up2k	8.068	53.682	3.662	3.746
mRNA	7.596	73.538	3.716	3.769
repeat	7.675	72.472	3.769	3.798
CpGIsland	19.074	59.299	3.818	3.999

Tabla Suplementaria 32: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_CTL_2.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.475	54.427	4.728	5.707
Down2k	8.348	70.203	3.403	3.401
Up2k	8.017	47.937	3.355	3.435
mRNA	7.827	72.915	3.393	3.432
repeat	7.992	73.695	3.478	3.48
CpGIsland	16.23	48.649	3.581	3.689

Tabla Suplementaria 33: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_CHIK1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	11.686	72.313	3.119	3.533
Down2k	7.551	82.942	2.667	2.695
Up2k	7.634	63.025	2.666	2.704
mRNA	6.845	84.874	2.653	2.711
repeat	7.153	87.102	2.725	2.76
CpGIsland	20.25	67.427	3.073	3.144

Tabla Suplementaria 34: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_DENV2

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.241	63.649	4.329	5.028
Down2k	8.32	83.647	3.143	3.156
Up2k	8.589	65.399	3.17	3.209
mRNA	7.533	84.891	3.129	3.169
repeat	7.902	86.351	3.203	3.227
CpGIsland	21.976	70.912	3.63	3.704

Tabla Suplementaria 35: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_CTL1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.16	65.476	3.777	4.215
Down2k	8.613	80.17	3.331	3.364
Up2k	8.301	53.693	3.318	3.366
mRNA	8.032	83.287	3.326	3.394
repeat	8.398	87.938	3.41	3.436
CpGIsland	16.134	49.021	3.495	3.591

Tabla Suplementaria 36: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_CHIK2.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	10.397	68.486	3.342	3.699
Down2k	7.095	81.685	2.85	2.876
Up2k	7.075	59.924	2.857	2.885
mRNA	6.565	83.864	2.837	2.891
repeat	6.822	86.183	2.91	2.943
CpGIsland	18.47	61.01	3.28	3.453

Tabla Suplementaria 37: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_CTL2.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	12.714	68.782	3.903	4.418
Down2k	8.586	82.149	3.338	3.377
Up2k	8.529	59.109	3.367	3.389
mRNA	7.909	84.692	3.341	3.385
repeat	8.3	88.186	3.426	3.44
CpGIsland	19.052	59.734	3.618	3.696

Tabla Suplementaria 38: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra SINO_CTL_1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	14.127	60.154	5.183	6.622
Down2k	8.64	71.268	3.534	3.54
Up2k	8.418	50.17	3.532	3.564
mRNA	8.059	73.573	3.523	3.563
repeat	8.172	74.047	3.606	3.608
CpGIsland	17.749	53.524	3.73	3.842

Tabla Suplementaria 39: Nivel medio de metilación de algunos elementos (%), en la muestra BLOOD_DENV1.

	C (%)	CG (%)	CHG (%)	CHH (%)
CDS	10.329	54.532	4.41	5.04
Down2k	7.098	82.751	3.012	2.968
Up2k	7.294	64.614	3.05	3.039
mRNA	6.56	83.964	2.993	3.009
repeat	6.805	84.641	3.066	3.079
CpGIsland	21.74	71.319	3.633	3.783

Tabla Suplementaria 40: Proporción de CG, CHG y CHH en toda la citosina metilada

		mCG	mCHG	mCHH
SINO_VCHIK_1	mC number	4,810,900	389,391	1,355,187
	proportion (%)	73.387	5.94	20.673
SINO_VCHIK_2	mC number	4,498,480	320,572	1,067,621
	proportion (%)	76.418	5.446	18.136
SINO_CTL_1	mC number	5,602,328	382,843	1,221,385
	proportion (%)	77.739	5.312	16.948
SINO_CTL_2	mC number	5,586,187	373,708	1,181,039
	proportion (%)	78.228	5.233	16.539
BLOOD_CTL1	mC number	7,817,937	444,832	1,460,492
	proportion (%)	80.404	4.575	15.021
BLOOD_CTL2	mC number	7,605,719	436,029	1,493,183
	proportion (%)	79.767	4.573	15.66
BLOOD_CHIK1	mC number	6,605,834	275,110	1,019,766
	proportion (%)	83.611	3.482	12.907
BLOOD_CHIK2	mC number	6,151,173	306,770	1,149,172
	proportion (%)	80.861	4.033	15.107
BLOOD_DENV1	mC number	4,009,526	245,142	926,488
	proportion (%)	77.387	4.731	17.882
BLOOD_DENV2	mC number	5,353,360	306,180	1,081,297
	proportion (%)	79.417	4.542	16.041

Figura suplementaria 3. Distribución de los niveles de metilación en el grupo de control SINO_CTL. El gráfico de burbujas muestra el promedio del porcentaje de sitios metilados y no metilados en diferentes contextos genómicos (CG, CHG, CHH, mC, mCG, mCHG y mCHH) distribuidos en rangos del 10% al 100% de nivel de metilación (eje X). El tamaño de los círculos representa el porcentaje relativo de sitios que caen en cada categoría, de acuerdo con la escala indicada en la leyenda inferior.

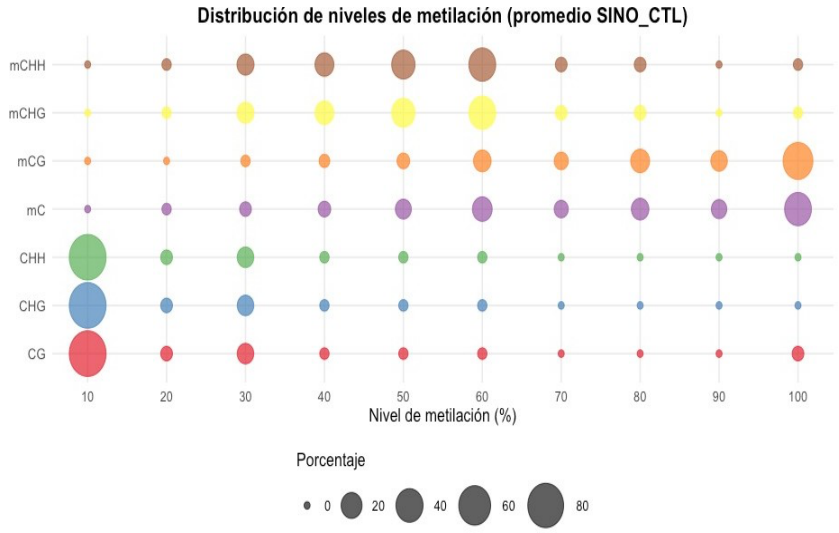


Figura suplementaria 4. Distribución de los niveles de metilación en el grupo de control de sangre (BLOOD_CTL). El gráfico de burbujas muestra el promedio del porcentaje de sitios metilados y no metilados en diferentes contextos genómicos (CG, CHG, CHH, mC, mCG, mCHG y mCHH) distribuidos en rangos del 10% al 100% de nivel de metilación (eje X). El tamaño de los círculos representa el porcentaje relativo de sitios que caen en cada categoría.

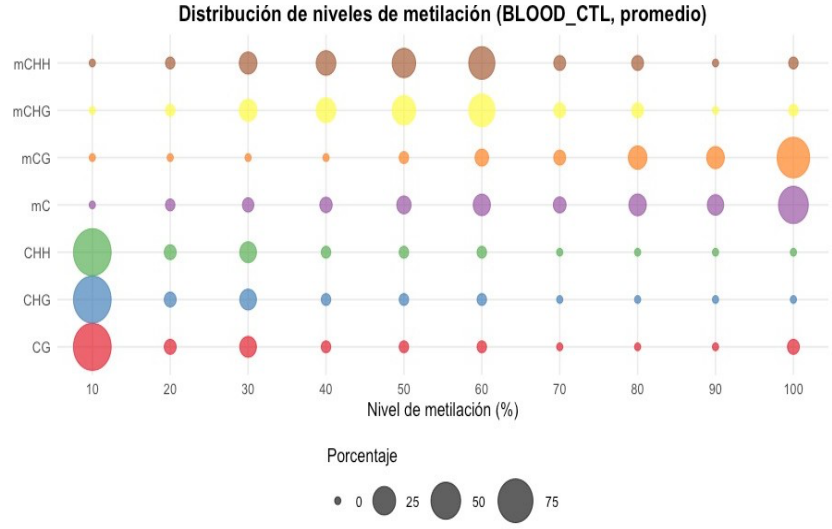
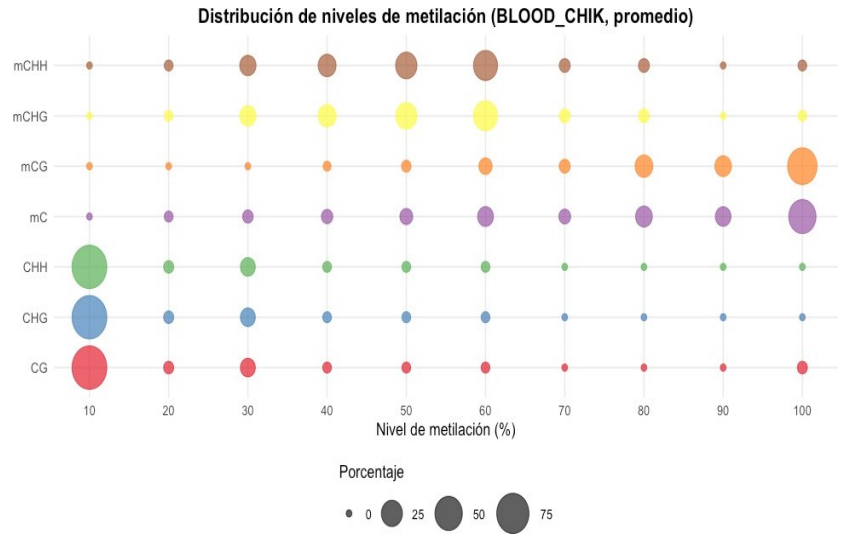


Figura suplementaria 5. Distribución de los niveles de metilación en el grupo de sangre con Chikungunya (BLOOD_CHIK). El gráfico de burbujas muestra el promedio del porcentaje de sitios metilados y no metilados en diferentes contextos genómicos (CG, CHG, CHH, mC, mCG, mCHG y mCHH) distribuidos en rangos del 10% al 100% de nivel de metilación (eje X). El tamaño de los círculos representa el porcentaje relativo de sitios que caen en cada categoría.



ANEXO F

Tabla Suplementaria 41: Evaluación global de la distribución del nivel de metilación de CG en los diferentes elementos.

CG	whole genome	CDS	CDS I %	Downstream 2K	downstream 2K %	Upstream 2K	upstream 2K %	mRNA	mRNA %	repeat	repeat %	CDS	CDS %
blood_CT L1	8397835	327049	3.89	206924	2.46	314569	3.75	3842023	45.75	1508861	17.97	128363	1.53
blood_CT L2	8089420	316124	3.91	188892	2.34	272118	3.36	3661091	45.26	1434778	17.74	121661	1.50
blood_CHI K1	7012159	237978	3.39	157206	2.24	229563	3.27	3103950	44.27	1192415	17.00	94708	1.35
blood_CHI K2	6578425	167492	2.55	140558	2.14	207486	3.15	2862661	43.52	1072512	16.30	71889	1.09
blood_DE NV1	4279250	96689	2.26	80402	1.88	112798	2.64	1775840	41.50	674466	15.76	40044	0.94
blood_DE NV2	5679718	195295	3.44	120081	2.11	173807	3.06	2473600	43.55	1012627	17.83	69382	1.22
SINO_CTL_1	6959147	342068	4.92	188668	2.71	271622	3.90	3346666	48.09	1315175	18.90	135697	1.95
SINO_CTL_2	6976162	319276	4.58	191285	2.74	275962	3.96	3378310	48.43	1333693	19.12	129120	1.85
SINO_CHIK_1	6046983	231988	3.84	151482	2.51	206061	3.41	2847810	47.09	1102859	18.24	98289	1.63
SINO_CHIK_2	5648927	245682	4.35	147348	2.61	209417	3.71	2284771	40.45	1053120	18.64	103265	1.83

Tabla Suplementaria 42: Evaluación global de la distribución del nivel de metilación de CHG en los diferentes elementos.

CHG	whole genome	CGI	CGI %	downstream 2k	Downstream 2k %	upstream 2k	Upstream 2k%	mRNA	mRNA %	repeat	repeat %	CDS	CDS %
blood_CTL1	36555355	377140	1.03	772938	2.11	870705	2.38	15723607	43.01	6965653	19.06	322463	0.88
blood_CTL2	35525164	355982	1.00	704838	1.98	767609	2.16	15052357	42.37	6571151	18.50	296189	0.83
blood_CHIK 1	32180237	261790	0.81	613134	1.91	674589	2.10	13409074	41.67	5715501	17.76	244127	0.76
blood_CHIK 2	32614870	183011	0.56	607212	1.86	658858	2.02	13472932	41.31	5722431	17.55	219194	0.67
blood_DEN V1	21331033	102567	0.48	354270	1.66	370782	1.74	8507356	39.88	3559021	16.68	123193	0.58
blood_DEN V2	25112099	208715	0.83	454182	1.81	494548	1.97	10333293	41.15	4541349	18.08	175164	0.70
SINO_CTL_ 1	27950559	386738	1.38	648581	2.32	718411	2.57	12581050	45.01	5458930	19.53	298947	1.07
SINO_CTL_ 2	28352399	365121	1.29	671633	2.37	740377	2.61	12915729	45.55	5645082	19.91	295430	1.04
SINO_CHIK_1	26437704	255717	0.97	567847	2.15	598612	2.26	11728829	44.36	4980985	18.84	236504	0.89
SINO_CHIK_2	23407148	278255	1.19	520780	2.22	569295	2.43	10486554	44.80	4522522	19.32	237393	1.01

Tabla Suplementaria 43: Evaluación global de la distribución del nivel de metilación de CHH en los diferentes elementos.

CHH	whole genome	CGI	CGI %	Downstream 2k	Downstream 2k %	Upstream 2k	Upstream 2k %	mRNA	mRNA %	repeat	repeat %	CDS	CDS %
blood_CTL1	15383295	76327	0.50	229299	1.49	262715	1.71	6231008	40.51	2096661	13.63	73924	0.48
blood_CTL2	15863571	71829	0.45	229739	1.45	247725	1.56	6355741	40.07	2098540	13.23	71762	0.45
blood_CHIK1	15567251	48006	0.31	220159	1.41	230192	1.48	6164563	39.60	2009572	12.91	62970	0.40
blood_CHIK2	15233212	28841	0.19	211491	1.39	217129	1.43	6012809	39.47	1971467	12.94	56388	0.37
blood_DENV 1	12516616	18836	0.15	162833	1.30	161438	1.29	4810619	38.43	1586800	12.68	41973	0.34
blood_DENV 2	14248489	46104	0.32	195896	1.37	209457	1.47	5573694	39.12	1884336	13.22	55473	0.39
SINO_CTL_1	11403700	84424	0.74	192007	1.68	222282	1.95	4845964	42.49	1600318	14.03	68142	0.60
SINO_CTL_2	11504436	79039	0.69	194763	1.69	220855	1.92	4935610	42.90	1652004	14.36	66646	0.58
SINO_CHIK_ 1	11635667	51989	0.45	184392	1.58	192710	1.66	4900034	42.11	1601125	13.76	57249	0.49
SINO_CHIK_ 2	9983436	58045	0.58	162956	1.63	178770	1.79	4224408	42.31	1389683	13.92	54240	0.54

Con el análisis bioinformático se identificaron diversos sitios diferencialmente metilados como CDS, Down, Up regulados miRNA, islas CpG, ver figura 20.

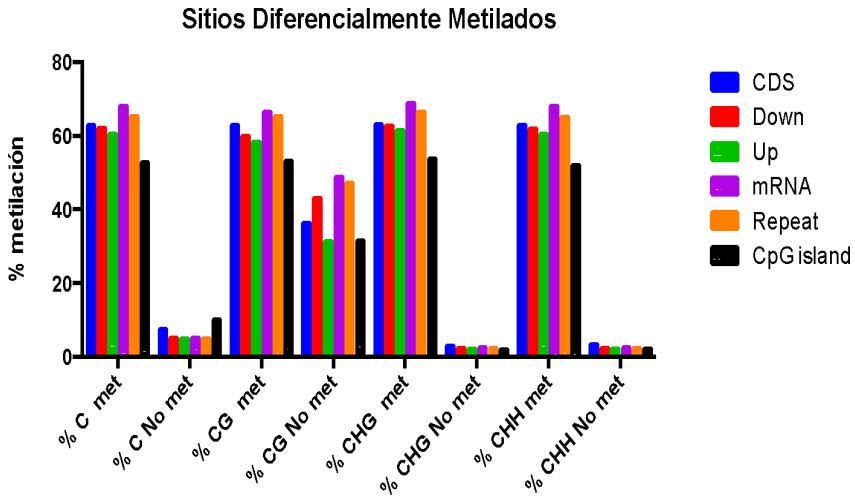


Figura suplementaria 6: Gráfica de los sitios sitios diferencialmente metilados identificados en el análisis bioinformático.

Tabla Suplementaria 44: Enriquecimiento de vías KEGG y Reactome para RDM entre el grupo 1 vs grupo 2.

	#Pathway	Count	Pvalue	Qvalue	gen
Reactome	RHO GTPase cycle	21	3.82E-05	1.42E-02	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;CDC42SE2;DIAPH3;DNMBP;DOCK2;DOCK4;DSP;DST;FMNL2;GOLGA3;MCF2L;NGEF;OPHN1;PCDH7;RHOU;SH3PXD2A;TIAM1;USP9X
Reactome	CDC42 GTPase cycle	13	3.13E-06	2.33E-03	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;CDC42SE2;DIAPH3;DNMBP;FMNL2;MCF2L;NGEF;OPHN1;SH3PXD2A;TIAM1
KEGG	Metabolic pathways	8	0.6114997	0.7323471	PIGK, MGAT4A, INPP5B, PLA2G2C, MTHFD1, B3GALT1, ENTREP1, LDHB
Reactome	RAC2 GTPase cycle	8	1.48E-04	2.74E-02	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;DIAPH3;DOCK2;DOCK4;OPHN1;TIAM1
Reactome	RHOG GTPase cycle	7	3.01E-04	4.48E-02	ARHGAP1;CDC42;DIAPH3;DOCK2;DOCK4;MCF2L;OPHN1
KEGG	Rap1 signaling pathway	6	0.03451792	0.6461343	GNAS; PRKCZ; MAP2K3; MAGI1; LPAR5; CNR1
Reactome	RHOJ GTPase cycle	6	3.77E-04	4.67E-02	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;DIAPH3;OPHN1
KEGG	PI3K-Akt signaling pathway	3	0.8189024	0.8857495	SGK1; XPR1; LPAR5
KEGG	MAPK signaling pathway	2	0.4735297	0.6790758	MAP2K3; CACNA1B
KEGG	mTOR signaling pathway	2	0.6560157	0.7626807	SGK1; XPR1
KEGG	cAMP signaling pathway	2	0.2946427	0.6461343	CNGA1; GNAS
KEGG	Chemokine signaling pathway	2	0.2931908	0.6461343	SH3PXD2A
KEGG	Platelet activation	2	0.5439238	0.6993306	GNAS
KEGG	Influenza A	2	0.2801103	0.6461343	MAP2K3
KEGG	Calcium signaling pathway	2	0.2931908	0.6461343	GNAS; CACNA1B
KEGG	Lysosome	2	0.235058	0.6461343	LGMN, ENTREP1
KEGG	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	2	0.1045393	0.6461343	GNAS; MAP2K3
KEGG	Mismatch repair	2	0.007843073	0.6461343	RPA2; AHNAK
KEGG	Viral myocarditis	2	0.07600791	0.6461343	SGCB; EIF4G3
KEGG	Toll-like receptor signaling pathway	1	0.4103478	0.6790758	MAP2K3
KEGG	Fc gamma R-mediated phagocytosis	1	0.5007078	0.6790758	SH3PXD2A
KEGG	TNF signaling pathway	1	0.4103478	0.6790758	MAP2K3
KEGG	TGF-beta signaling pathway	1	0.3281952	0.6461343	LTBP1
KEGG	FoxO signaling pathway	1	0.4743066	0.6790758	SGK1
KEGG	Wnt signaling pathway	1	0.8883649	0.9250742	XPR1
KEGG	Ras signaling pathway	1	0.741198	0.8264686	PLA2G2C
KEGG	cGMP-PKG signaling pathway	1	0.6219138	0.7323471	CNGA1
KEGG	Arachidonic acid metabolism	1	0.3120896	0.6461343	PLA2G2C
KEGG	Inositol phosphate metabolism	1	0.349092	0.676229	INPP5B
KEGG	Epstein-Barr virus infection	1	0.7338499	0.8255811	MAP2K3
KEGG	MicroRNAs in cancer	1	0.5856947	0.7184915	ZFPM2
KEGG	Lysine degradation	1	0.5007078	0.6790758	PRDM2
KEGG	Fc epsilon RI signaling pathway	1	0.3120896	0.6461343	MAP2K3
KEGG	Fanconi anemia pathway	1	0.2585339	0.6461343	RPA2
KEGG	Nucleotide excision repair	1	0.2407823	0.6461343	RPA2
KEGG	N-Glycan biosynthesis	1	0.2317499	0.6461343	MGAT4A
KEGG	Pentose phosphate pathway	1	0.1251213	0.6461343	RBKS
KEGG	Other glycan degradation	1	0.09714789	0.6461343	ENTREP1

Tabla Suplementaria 45: Enriquecimiento de vías KEGG y Reactome para RDM entre el grupo 3 vs grupo 4.

	#Pathway	Sample1	Pvalue	Qvalue	Genes
Reactome	RHO GTPase cycle	21	3.82E-05	0.01421165	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;CDC42SE2;DIAPH3;DNMBP;DOCK2;DOCK4;DSP;DST;FMNL2;GOLGA3;MCF2L;NGEF;OPHN1;PCDH7;RHOU;SH3PXD2A;TIAM1;USP9X
Reactome	CDC42 GTPase cycle	13	3.13E-06	0.00232676	ARHGAP1;ARHGAP26;CDC42;CDC42BPB;CDC42SE2;DIAPH3;DNMBP;FMNL2;MCF2L;NGEF;OPHN1;SH3PXD2A;TIAM1
KEGG	Rap1 signaling pathway	6	0.03451792	0.6461343	GNAS;PRKCZ;MAP2K3;MAGI1;LPAR5;CNR1
KEGG	Mismatch repair	2	0.00784307	0.6461343	RPA2;AHNAK
KEGG	FoxO signaling pathway	1	0.05071266	0.136261	LOC107987372
KEGG	Fc gamma R-mediated phagocytosis	1	0.05466317	0.136261	TPTE
KEGG	cAMP signaling pathway	1	0.08459616	0.1691923	TPTE
KEGG	Ras signaling pathway	1	0.1036257	0.1884104	TPTE
KEGG	Platelet activation	1	0.1381725	0.2149379	LOC107987372
KEGG	PI3K-Akt signaling pathway	1	0.2250019	0.2368441	LOC107987372, LPAR5
KEGG	Metabolic pathways	1	0.4662364	0.4662364	TPTE, LDHB
KEGG	Ether lipid metabolism	1	0.02142383	0.136261	TPTE
KEGG	Glycerophospholipid metabolism	1	0.04154358	0.136261	TPTE
KEGG	GnRH signaling pathway	1	0.04368961	0.136261	TPTE
KEGG	Glutamatergic synapse	1	0.04796965	0.136261	TPTE
KEGG	Sphingolipid signaling pathway	1	0.04827475	0.136261	TPTE
KEGG	Choline metabolism in cancer	1	0.05557288	0.136261	TPTE
KEGG	Phospholipase D signaling pathway	1	0.06131743	0.136261	TPTE, LPAR5
KEGG	ECM-receptor interaction	1	0.1471209	0.2149379	LOC107987372
KEGG	Endocytosis	1	0.1504565	0.2149379	TPTE
KEGG	Regulation of autophagy	1	0.1694261	0.2259015	TPTE
KEGG	Focal adhesion	1	0.198144	0.227773	LOC107987372
KEGG	Protein digestion and absorption	1	0.201576	0.227773	LOC107987372
KEGG	Amoebiasis	1	0.2049957	0.227773	LOC107987372
KEGG	Propanoate metabolism	1	0.03574766	0.1578808	LDHB
KEGG	Cysteine and methionine metabolism	1	0.04218313	0.1578808	LDHB
KEGG	Pyruvate metabolism	1	0.04857871	0.1578808	LDHB
KEGG	Glycolysis / Gluconeogenesis	1	0.06474324	0.1683324	LDHB
KEGG	Glucagon signaling pathway	1	0.09968095	0.2159754	LDHB
KEGG	Retrograde endocannabinoid signaling	1	0.1308016	0.2231008	CNR1
KEGG	Neuroactive ligand-receptor interaction	1	0.2317414	0.3035266	CNR1
KEGG	Tight junction	1	0.233482	0.3035266	MYH9
KEGG	Pathways in cancer	1	0.6039585	0.6542884	LPAR5

Tabla Suplementaria 46: Top 15 de regiones de factores de transcripción entre el grupo 1 vs grupo 2.

chrom	chromStart	chromEnd	name	score	evidenceSources	elementType	eliteness	Sitios de unión de factores de transcripción	No factores de transcripción
chr1	8115208	8123749	GH01J008115	456	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Enhancer	Elite	KLF6, DPF2, NCOR1, ATF3, KLF9, YY1, CEBPA, NFIC, CE	198
chr12	45356749	45358584	GH12J045356	192	ENCODE(Z-Lab),dbSUPER	Enhancer	Elite	MAFF, ZNF316, RXRA, RARA, MAFK, MAFG, HNF4A, NR2F6, GATA2, CHD2, NR2F2, EMSY,	12
chr17	78733351	78760399	GH17J078733	812	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	KLF6, POLR2A, SP1, ATF2, ZNF580, DPF2, JUND, KLF17	292
chr22	27789815	27792009	GH22J027789	437	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,FANTOM5,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	KLF17, ZIC2, ZNF600, TCF12, FEZF1, ZNF585B, ZNF843	37
chr5	35861582	35862400	GH05J035861	215	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,dbSUPER	Enhancer	Elite	JUND, HIC1, CTCF, CEBPB, TRIM22, EP300, RAD21, IRF4	48
chrX	68496819	68500185	GH0XJ068496	560	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl	Promoter/Enhancer	Elite	HCFC1, POLR2A, ATF2, KLF17, ZNF600, YY1, BRCA1, NF	150
chr1	86772837	86776407	GH01J086772	501	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Enhancer	Elite	ATF2, ZNF580, DPF2, JUND, KLF17, NCOR1, ZNF184, ZI	215
chr10	100004256	100011153	GH10J100004	616	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	DPF2, JUND, ZNF184, CTCF, ZIC2, ZNF600, ZNF10, YY1,	141
chr2	48356201	48357868	GH02J048356	332	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Enhancer	Elite	ZNF592, ZNF316, MYC, ZBTB33, CHAMP1, RFX1, ZNF217, GABPB1, POLR2A, BMI1, CC2D1A,	11
chr2	64402690	64407594	GH02J064402	337	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,dbSUPER	Enhancer	Elite	ATF3, POLR2A, CEBPG, YY1, CEBPA, IRF2, SAP130, HOM	64
chr2	105928464	105928614	GH02J105929	63	ENCODE(Z-Lab),dbSUPER	Enhancer	Elite	KLF9, CEBPA, CHD4, KDM6A, FOXA2, ZNF511, SP1, MA	52
chr3	42936000	42937000	GH03J042936	364	EPDnew,Ensembl	Promoter	Elite	ZBTB40, CREM, L3MBTL2, GABPB1, ATF1, NR2C1, MGA,	7
chr5	131208455	131213672	GH05J131208	409	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl	Promoter/Enhancer	Elite	BCL11A, ZNF207, TRIM22, SIN3A, CHD1, REST, NR2C1,	63
chr1	13699220	13705309	GH01J013699	539	ENCODE(Z-Lab),Ensembl,FANTOM5,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	POLR2A, SP1, BCL11A, ZNF592, RCOR1, MAZ, SIN3A, C	91
chr1	16611168	16614326	GH01J016611	624	ENCODE(Z-Lab),EPDnew,Ensembl,dbSUPER	Promoter/Enhancer	Elite	KLF6, SP1, JUND, POLR2A, KLF9, DNMT3B, YY1, BRCA1	177

Tabla Suplementaria 47: Top 15 de regiones de regiones CTCF entre el grupo 1 vs grupo 2.

chrom	chromStart	chromEnd	name	score	ccre	encodeLabel	zScore	ucscLabel	ccessionLabe	description
chr1	8121077	8121279	EH38E1315771	450	dELS,CTCF-bound	dELS	4.50635792	enhD	E1315771	distal enhancer-like signature
chr12	45357386	45357575	EH38E1607310	278	dELS,CTCF-bound	dELS	2.78149154	enhD	E1607310	distal enhancer-like signature
chr17	78735865	78736117	EH38E1889427	427	dELS,CTCF-bound	dELS	4.27137603	enhD	E1889427	distal enhancer-like signature
chr22	27789780	27789941	EH38E2155761	191	dELS,CTCF-bound	dELS	1.91622467	enhD	E2155761	distal enhancer-like signature
chr5	35861722	35862068	EH38E2365757	419	dELS,CTCF-bound	dELS	4.19055432	enhD	E2365757	distal enhancer-like signature
chrX	68498416	68498628	EH38E2757107	319	PLS,CTCF-bound	PLS	3.19990709	prom	E2757107	promoter-like signature
chrX	68498628	68498782	EH38E2757108	312	PLS,CTCF-bound	PLS	3.12480039	prom	E2757108	promoter-like signature
chr1	86775494	86775706	EH38E1364483	318	dELS	dELS	3.18534999	enhD	E1364483	distal enhancer-like signature
chr10	100007891	100008108	EH38E1493249	251	pELS	pELS	2.5125751	enhP	E1493249	proximal enhancer-like signature
chr2	48356705	48356921	EH38E1996512	408	dELS	dELS	4.08652678	enhD	E1996512	distal enhancer-like signature
chr2	64403392	64403703	EH38E2003781	235	dELS	dELS	2.35679232	enhD	E2003781	distal enhancer-like signature
chr2	105928181	105928528	EH38E2022275	229	dELS	dELS	2.29475271	enhD	E2022275	distal enhancer-like signature
chr3	42936158	42936504	EH38E2195774	388	PLS	PLS	3.88219967	prom	E2195774	promoter-like signature
chr5	131210487	131210745	EH38E2407659	221	dELS	dELS	2.21324227	enhD	E2407659	distal enhancer-like signature
chr1	8116637	8116940	EH38E1315765	375	dELS	dELS	3.75526283	enhD	E1315765	distal enhancer-like signature

Tabla Suplementaria 48: Top 15 de islas CpG entre el grupo 1 vs grupo 2.

chrom	chromStart	chromEnd	name	length	cpgNum	gcNum	perCpg	perGc	obsExp	Genes
chr1	228635026	228635503	CpG: 45	477	45	309	18.9	64.8	0.9	
chr1	228643959	228644442	CpG: 46	483	46	315	19	65.2	0.9	
chr1	16644360	16644997	CpG: 64	637	64	438	20.1	68.8	0.89	CROCCP2
chr1	228644876	228645627	CpG: 70	751	70	509	18.6	67.8	0.82	RHOU, DUSP5P1
chr10	125895680	125896969	CpG: 152	1289	152	898	23.6	69.7	0.97	DHX32, FANK1
chr10	133664428	133685058	CpG: 1524	20630	1524	10996	14.8	53.3	1.04	
chr10	133740607	133761247	CpG: 1524	20640	1524	10980	14.8	53.2	1.04	
chr14	19097382	19099647	CpG: 209	2265	209	1558	18.5	68.8	0.78	DUXAP9
chr15	20294622	20295605	CpG: 100	983	100	627	20.3	63.8	1.02	
chr17	74356688	74357659	CpG: 116	971	116	667	23.9	68.7	1.02	BTBD17
chr17	4782401	4783020	CpG: 46	619	46	389	14.9	62.8	0.75	TM4SF5
chr20	26208002	26209712	CpG: 198	1710	198	1211	23.2	70.8	0.93	MIR663AHG
chr20	63342509	63342945	CpG: 39	436	39	282	17.9	64.7	0.86	
chr20	29410522	29411565	CpG: 79	1043	79	698	15.1	66.9	0.68	
chr20	29410522	29411565	CpG: 79	1043	79	698	15.1	66.9	0.68	

Tabla Suplementaria 49: Top 15 de cirRNA entre el grupo 1 vs grupo 2.

RNA_1.seqna	circRNA_1.start	circRNA_1.end	circRNA_1.width	circRNA_1.strand	circRNA_1.score	rages.start	rages.end	rages.width
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16543890	16543952	63
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-RPA2_0009	16581587	16581653	67
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-KPNA6_0005	16606452	16606470	19
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-SCMH1_0029	16606966	16607012	47
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-SCMH1_0040	16611730	16611822	93
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-SPATA6_0002	16614499	16614518	20
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-FGGY_0009	16614545	16614579	35
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-PRKACB_0011	16622617	16622625	9
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-EVI5_0011	16627709	16627801	93
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-EVI5_0033	16630168	16630182	15
chr1	27894012	27907282	13271	-	hsa-EVI5_0001	27895603	27895663	61
chr1	32154588	32167296	12709	+	hsa-EVI5_0004	32162959	32163060	102
chr1	41113283	41186250	72968	-	hsa-MAN1A2_0021	41181234	41181268	35
chr1	41142878	41186250	43373	-	hsa-MAN1A2_0025	41181234	41181268	35
chr1	48305787	48359770	53984	-	hsa-ASH1L_0068	48316666	48316744	79

Tabla Suplementaria 50: Top 15 de piRNA entre el grupo 1 vs grupo 2.

bdpiRNA.seqnames	bdpiRNA.start	bdpiRNA.end	bdpiRNA.widt	bdpiRNA.stran	bdpiRNA.score	ges.seqname	rages.start	rages.end	rages.width
chr1	103492801	103492828	28	-	hsa-piR-10185	chr1	103492785	103492806	22
chr1	181278336	181278366	31	+	hsa-piR-11298	chr1	181278274	181278457	184
chr1	60289301	60289328	28	+	hsa-piR-12263	chr1	60289285	60289375	91
chr8	46607850	46607877	28	+	hsa-piR-12263	chr8	46607819	46607894	76
chr1	21135936	21135963	28	+	hsa-piR-12263	chr1	21135920	21136139	220
chr5	176151220	176151247	28	-	hsa-piR-12263	chr5	176151183	176151234	52
chr22	25278331	25278357	27	+	hsa-piR-12653	chr22	25278348	25278428	81
chr10	103606777	103606803	27	-	hsa-piR-12653	chr10	103606747	103606784	38
chr14	76915690	76915716	27	-	hsa-piR-13413	chr14	76915664	76915729	66
chr1	179039963	179039991	29	-	hsa-piR-1408	chr1	179039907	179040150	244
chr21	10616421	10616447	27	+	hsa-piR-14451	chr21	10616390	10616608	219
chr6	36367251	36367280	30	-	hsa-piR-1513	chr6	36367253	36367366	114
chrX	115972226	115972254	29	+	hsa-piR-15181	chrX	115972223	115972253	31
chr9	125458948	125458975	28	-	hsa-piR-18630	chr9	125458940	125458953	14
chr2	32294631	32294656	26	-	hsa-piR-18631	chr2	32294619	32294751	133

Tabla Suplementaria 51: Top 15 de lcnRNA entre el grupo 1 vs grupo 2.

lncRNA_1.seqnames	lncRNA_1.start	lncRNA_1.end	lncRNA_1.width	lncRNA_1.strand	rages.start	rages.end	rages.width	lncRNA_1.score
chr1	16629670	16631109	1440	-	16630168	16630182	15	lnc-NBPF1-1
chr1	16620845	16624878	4034	-	16622617	16622625	9	lnc-NBPF1-1
chr1	16605418	16607691	2274	-	16606452	16606470	19	lnc-NBPF1-2
chr1	16605418	16607691	2274	-	16606966	16607012	47	lnc-NBPF1-2
chr1	629062	629433	372	+	629115	629221	107	lnc-SAMD11-15
chr1	629082	629284	203	-	629115	629221	107	lnc-OR4F16-8
chr1	629832	630220	389	-	630061	630201	141	lnc-OR4F16-8
chr1	631317	631399	83	-	631246	631367	122	lnc-OR4F16-8
chr1	633641	633963	323	-	633712	633944	233	lnc-OR4F16-8
chr1	633641	633963	323	-	633751	634170	420	lnc-OR4F16-8
chr1	633641	633963	323	-	633951	634194	244	lnc-OR4F16-8
chr1	629640	630683	1044	+	629657	629826	170	lnc-SAMD11-14
chr1	629640	630683	1044	+	630061	630201	141	lnc-SAMD11-14
chr1	631084	632680	1597	+	631246	631367	122	lnc-SAMD11-13
chr1	633535	633741	207	+	633712	633944	233	lnc-SAMD11-12

Tabla Suplementaria 52: Top 15 de regiones de factores de transcripción entre el grupo 3 vs grupo 4.

chr	chromStart	chromEnd	name	score	strand	reserved	idenceSourc	elementType	eliteness
chr1	64136369	64139506	GH01J064136	195	.	95,95,95	)E(Z-Lab),Er	Enhancer	Elite
chr10	33261747	33266818	GH10J033261	379	.	95,95,95	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chr12	50783975	50790525	GH12J050783	421	.	95,95,95	nsembl,FAI	Enhancer	Elite
chr16	68655900	68661722	GH16J068655	322	.	95,95,95	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chr19	48780246	48783173	GH19J048780	387	.	95,95,95	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chr2	69692301	69698024	GH02J069692	241	.	95,95,95	)E(Z-Lab),Er	Enhancer	Elite
chr3	30679217	30685883	GH03J030679	344	.	95,95,95	nsembl,FAI	Enhancer	Elite
chr5	59542655	59544916	GH05J059542	228	.	95,95,95	)E(Z-Lab),Er	Enhancer	Elite
chr7	139131200	139132400	GH07J139131	178	.	95,95,95	embl,dbSUI	Enhancer	Elite
chr8	95086800	95089345	GH08J095086	235	.	95,95,95	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chrX	115843220	115889529	GH0XJ115843	125	.	160,160,160	Lab),Ensem	Enhancer	Elite
chr1	16611168	16614326	GH01J016611	624	.	204,0,0	EPDnew,En	Promoter/Enhancer	Elite
chr1	66329493	66338779	GH01J066329	692	.	204,0,0	ew,Ensemb	Promoter/Enhancer	Elite
chr10	11160825	11184915	GH10J011160	800	.	204,0,0	ew,Ensemb	Promoter/Enhancer	Elite
chr11	61391000	61394018	GH11J061391	622	.	204,0,0	Lab),EPDne	Promoter/Enhancer	Elite

Tabla Suplementaria 53: Top 15 de regiones de regiones CTCF entre el grupo 3 vs grupo 4.

#chrom	chromStart	chromEnd	name	score	ccre	encodeLabel	zScore	ucscLabel	description
chr13	38045781	38046128	EH38E1668865	348	CTCF-only,CTCF-bound	CTCF-only	3.48688856	CTCF	CTCF-only
chr15	20252613	20252835	EH38E1747678	170	CTCF-only,CTCF-bound	CTCF-only	1.70202163	CTCF	CTCF-only
chr2	91500625	91500782	EH38E2015814	174	CTCF-only,CTCF-bound	CTCF-only	1.74955622	CTCF	CTCF-only
chr21	9017283	9017527	EH38E2130301	184	CTCF-only,CTCF-bound	CTCF-only	1.84664329	CTCF	CTCF-only
chr1	16608284	16608629	EH38E1322544	429	dELS	dELS	4.29916381	enhD	distal enhancer-like signature
chr1	64138414	64138764	EH38E1354938	351	dELS,CTCF-bound	dELS	3.51373271	enhD	distal enhancer-like signature
chr1	117822167	117822511	EH38E1380722	308	dELS	dELS	3.08183793	enhD	distal enhancer-like signature
chr10	89351006	89351350	EH38E1487115	329	dELS	dELS	3.29189045	enhD	distal enhancer-like signature
chr11	72962144	72962425	EH38E1551257	320	dELS	dELS	3.20107944	enhD	distal enhancer-like signature
chr12	50788582	50788932	EH38E1611258	465	dELS	dELS	4.65434193	enhD	distal enhancer-like signature
chr12	97473458	97473804	EH38E1636133	221	dELS,CTCF-bound	dELS	2.21111025	enhD	distal enhancer-like signature
chr12	131090697	131091039	EH38E1656579	326	dELS	dELS	3.26312982	enhD	distal enhancer-like signature
chr13	77290379	77290727	EH38E1684742	181	dELS	dELS	1.81073721	enhD	distal enhancer-like signature
chr14	97409445	97409684	EH38E1740389	384	dELS	dELS	3.84884341	enhD	distal enhancer-like signature
chr16	55624705	55625046	EH38E1817505	330	dELS,CTCF-bound	dELS	3.30713038	enhD	distal enhancer-like signature

Tabla Suplementaria 54: Top 15 de islas CpG entre el grupo 3 vs grupo 4.

chr	chromStart	chromEnd	name	length	cpgNum	gcNum	perCpg	perGc	obsExp
chr1	16534378	16535801	CpG: 105	1423	105	847	14.8	59.5	0.84
chr1	16646990	16648550	CpG: 131	1560	131	1012	16.8	64.9	0.8
chr1	156216446	156216856	CpG: 44	410	44	275	21.5	67.1	0.95
chr1	228635026	228635503	CpG: 45	477	45	309	18.9	64.8	0.9
chr1	228644876	228645627	CpG: 70	751	70	509	18.6	67.8	0.82
chr10	125895680	125896969	CpG: 152	1289	152	898	23.6	69.7	0.97
chr10	133030938	133031430	CpG: 41	492	41	299	16.7	60.8	0.91
chr19	11033299	11033573	CpG: 22	274	22	179	16.1	65.3	0.75
chr22	10741251	10742442	CpG: 124	1191	124	811	20.8	68.1	0.9
chr22	12693669	12694075	CpG: 33	406	33	297	16.3	73.2	0.61
chr3	75668965	75670008	CpG: 94	1043	94	729	18	69.9	0.74
chr3	75672143	75672758	CpG: 59	615	59	419	19.2	68.1	0.83
chr4	53304	53778	CpG: 46	474	46	325	19.4	68.6	0.83
chr4	131975205	131975729	CpG: 38	524	38	287	14.5	54.8	0.97

Tabla Suplementaria 55: Top 15 de cirRNA entre el grupo 3 vs grupo 4.

circ_gr.seqnames	circ_gr.start	circ_gr.end	circ_gr.width	circ_gr.strand	circ_gr.circAltas_ID	dmr_gr.start	dmr_gr.end	dmr_gr.width
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16535799	16536004	206
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16606266	16606298	33
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16608324	16608334	11
chr1	16484823	16631109	146287	-	hsa-CROCCP2_0001	16612929	16612943	15
chr1	42227883	42278672	50790	-	hsa-FOXJ3_0004	42232727	42232762	36
chr1	42227883	42311110	83228	-	hsa-FOXJ3_0003	42232727	42232762	36
chr1	42227883	42323827	95945	-	hsa-FOXJ3_0035	42232727	42232762	36
chr1	48305787	48359770	53984	-	hsa-SPATA6_0002	48316824	48316853	30
chr1	50655442	50781044	125603	-	hsa-FAF1_0060	50762210	50762312	103
chr1	59315592	59378837	63246	+	hsa-FGGY_0035	59373460	59373751	292
chr1	59316146	59378837	62692	+	hsa-FGGY_0032	59373460	59373751	292
chr1	59321536	59378837	57302	+	hsa-FGGY_0006	59373460	59373751	292
chr1	59321536	59457076	135541	+	hsa-FGGY_0012	59373460	59373751	292
chr1	59321536	59474202	152667	+	hsa-FGGY_0016	59373460	59373751	292
chr1	59331843	59378837	46995	+	hsa-FGGY_0030	59373460	59373751	292

Tabla Suplementaria 56: Top 15 de piRNA entre el grupo 3 vs grupo 4.

chr	bdpiRNA.start	bdpiRNA.end	bdpiRNA.width	bdpiRNA.stra	score	grupo3_rages.start	grupo3_rages.end	grupo3_rages.width
chr2	187557418	187557445	28	+	hsa-piR-1138	187557396	187557662	267
chr21	10331183	10331211	29	-	hsa-piR-11617	10331030	10331287	258
chr2	187557585	187557614	30	+	hsa-piR-11707	187557396	187557662	267
chr2	218527026	218527053	28	-	hsa-piR-12263	218526977	218527039	63
chr3	85394033	85394060	28	-	hsa-piR-12263	85394041	85394087	47
chr1	155577326	155577353	28	-	hsa-piR-12263	155577322	155577379	58
chr1	25415405	25415432	28	+	hsa-piR-12263	25415417	25415606	190
chr13	64329420	64329447	28	-	hsa-piR-12263	64329402	64329471	70
chr1	55117481	55117508	28	+	hsa-piR-12263	55117465	55117555	91
chr1	217704488	217704515	28	-	hsa-piR-12263	217704500	217704545	46
chr22	48045996	48046023	28	-	hsa-piR-12263	48045995	48046028	34
chr7	55729957	55729984	28	-	hsa-piR-12263	55729909	55729966	58
chr9	40998518	40998545	28	-	hsa-piR-12263	40998481	40998566	86
chr3	196243816	196243842	27	-	hsa-piR-12653	196243777	196243866	90
chr2	187557658	187557686	29	+	hsa-piR-1408	187557396	187557662	267

Tabla Suplementaria 57: Top 15 de lcnRNA entre el grupo 3 vs grupo 4.

chr	lncRNA_1.end	lncRNA_1.width	lncRNA_1.strand	lncRNA_1.score	grupo3_rages.end	grupo3_rages.width	grupo3_rages.strand	score
chr1	16647399	16648684	1286	-	16648378	16648448	71	lnc-NBPF1-3
chr1	16605418	16607691	2274	-	16606266	16606298	33	lnc-NBPF1-2
chr1	16534826	16536988	2163	-	16535799	16536004	206	LINC01783
chr1	16535760	16538174	2415	+	16535799	16536004	206	lnc-NECAP2-3
chr1	16605406	16607691	2286	-	16606266	16606298	33	lnc-NBPF1-2
chr1	16607310	16608717	1408	+	16608324	16608334	11	lnc-CROCC-8
chr1	16647463	16648664	1202	+	16648378	16648448	71	lnc-CROCC-3
chr1	16647784	16648664	881	+	16648378	16648448	71	lnc-CROCC-3
chr1	16535780	16536172	393	-	16535799	16536004	206	LINC01783
chr10	41841272	41841907	636	-	41841536	41841550	15	lnc-ZNF33B-13
chr10	94612287	94613904	1618	+	94612756	94612768	13	lnc-CYP2C18-1
chr11	63251257	63252185	929	+	63251356	63251405	50	lnc-SLC22A9-2
chr12	7516185	7516260	76	+	7516234	7516241	8	lnc-ACSM4-4
chr12	97473356	97482545	9190	+	97473620	97473661	42	lnc-NEDD1-8